

**Identifizierung pflanzlicher Interaktoren  
des Typ III-Effektors XopG  
aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Tina Hoppe

geb. am 06.01.1988 in Wolmirstedt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. S. Rosahl
3. Prof. Dr. G. Döhlemann

Verteidigung: 16. Mai 2019

## Zusammenfassung

Das Gram-negative Phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen. Essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist das Typ III-Sekretionssystem (T3SS), welches Typ III-Effektorproteine (T3E) direkt in die Pflanzenzelle transloziert. T3E variieren in ihrer molekularen Funktionsweise und steuern innerhalb der Pflanzenzelle verschiedene Wirtsziele an, um zelluläre Prozesse zum Vorteil des Pathogens zu manipulieren. Der T3E XopG (*Xanthomonas outer protein G*) weist Homologie zu Zink-abhängigen Metalloproteasen auf. XopG-Homologe kommen in einigen Xanthomonaden sowie in Vertretern der Gattungen *Pseudomonas* und *Ralstonia* vor. Jedoch wurde ihre Rolle in der Interaktion mit der Pflanze bislang nicht geklärt. Die XopG Aminosäure (AS)-Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu den Zink-Metalloproteasen BoNT/A (Botulinum-Neurotoxin A) aus *Clostridium botulinum* und NleD (*non-locus of enterocyte effacement effector D*) aus EPEC (enteropathogene *Escherichia coli*). Essentielle AS für die Zink-Koordination und Proteolyse sind auch in XopG konserviert (H142, E143, H146, E174 und Y208). Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass XopG als Zink-Metalloprotease wirken könnte und die konservierten AS ein katalytisches Zentrum bilden. Die konservierten AS sind für die XopG-induzierte Zelltodreaktion in der Wirtspflanze *Capsicum annuum* sowie in der Nicht-Wirtspflanze *Nicotiana tabacum* nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression essentiell. Um XopG auf die vermutete Proteaseaktivität zu testen, sollten in dieser Arbeit pflanzliche Interaktoren von XopG identifiziert werden. In Y2H-Sichtungen wurden 30 Kandidatenproteine identifiziert. Interaktionsstudien in Hefe, *in planta* sowie *in vitro* bestätigten drei XopG-Interaktoren mit nachfolgend aufgeführter Homologie bzw. vorhergesagter Funktion: CaJoka2 (Autophagie-Rezeptor), SMD40 (*WD40 repeat-like superfamily protein*) und CaATM-like (Serin/Threonin-Proteinkinase). In der Pflanze ko-lokalisieren nach transienter Expression sowohl CaJoka2, SMD40 als auch CaATM-like mit XopG im Zellkern. Nähere *in planta*-Untersuchungen in Anwesenheit von XopG zeigten potentielle Spaltprodukte für SMD40 und CaATM-like. Mutationsstudien ergaben, dass die AS E143, Y208 und E174 im vorhergesagten katalytischen Zentrum für die XopG-vermittelte Proteolyse von SMD40 und CaATM-like notwendig sind. Untersuchungen mit NES-Fusionen lassen vermuten, dass die XopG-vermittelte Zelltodinduktion und die SMD40-Proteolyse durch XopG unabhängig von der XopG-Kernlokalisierung sind. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass XopG als aktive Zink-Metalloprotease fungiert und eine Korrelation zwischen der Proteaseaktivität sowie der XopG-vermittelten Zelltodinduktion besteht.

## Summary

The Gram-negative phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of the bacterial spot disease on pepper and tomato plants. The type III secretion system (T3SS) is essential for pathogenicity of *Xcv*, which translocates type III effector proteins (T3E) directly into the plant cell. T3Es vary in their molecular functions, targeting different host cell processes, and manipulating the cell to the benefit of the pathogen. The T3E XopG (*Xanthomonas* outer protein G) shows similarity to zinc-dependent metalloproteases. Although XopG homologs occur in some xanthomonads and in members of the genera *Pseudomonas* or *Ralstonia*, their role in the plant-interaction has not yet been elucidated. The XopG amino acid (aa) sequence reveals similarities to the zinc metalloproteases BoNT/A (botulinum neurotoxin A) from *Clostridium botulinum* and NleD (non-locus of enterocyte effector D) from EPEC (enteropathogenic *Escherichia coli*). Essential aa for zinc coordination and proteolysis are also conserved in XopG (H142, E143, H146, E174, and Y208), leading to the working hypothesis that XopG could act as zinc metalloprotease in which conserved aa form a catalytic site. The conserved aa are essential for the XopG-induced cell death reaction in the host plant *Capsicum annuum* and in the non-host plant *Nicotiana tabacum*, after *Agrobacterium*-mediated expression. To test the proposed XopG protease activity, the aim of this study was to identify plant interactors of XopG. In Y2H screens, 30 candidate proteins were identified. Interaction studies in yeast, *in planta* and *in vitro* confirmed three XopG interactors with the following homology or predicted function: CaJoka2 (autophagy receptor), SMD40 (WD40 repeat-like superfamily protein) and CaATM-like (serine/threonine protein kinase). *In planta* transiently expressed CaJoka2, SMD40 and CaATM-like co-localized with XopG to the nucleus. Further analyses revealed potential cleavage products for SMD40 and CaATM-like *in planta* in the presence of XopG. Analysis of XopG derivatives showed that the aa E143, Y208, and E174 in the predicted catalytic site are necessary for XopG-mediated proteolysis of SMD40 and CaATM-like. Studies with NES fusions suggest that XopG-mediated cell death induction and SMD40 cleavage by XopG are independent of nuclear localization of XopG. In summary, the results of this study suggest that XopG acts as zinc metalloprotease and that protease activity and XopG-mediated cell death induction are correlated.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II	
Summary.....	III	
Abkürzungsverzeichnis .....	IX	
Tabellenverzeichnis.....	XVI	
Abbildungsverzeichnis.....	XVII	
1	Einleitung .....	1
1.1	Pflanzen leisten Widerstand: Abwehrsysteme der Pflanze .....	1
1.2	Bakterielle Phytopathogene schlagen zurück: Strategien der Pflanzenmanipulation .....	3
1.3	Das Pflanzenpathogen <i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> als Modellorganismus .....	5
1.3.1	Effektorrepertoire von <i>Xcv</i> .....	6
1.4	Der Typ III-Effektor XopG.....	9
1.4.1	Zink-Metalloproteasen.....	9
1.4.1.1	Das <i>Clostridium</i> -Neurotoxin BoNT/A .....	10
1.4.1.2	Der EPEC-Effektor NleD .....	11
1.4.2	Vorarbeiten zur Charakterisierung des T3Es XopG.....	12
1.5	Ziele dieser Arbeit .....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien .....	15
2.1.1	Verwendete Nährmedien, Zusätze und Stämme .....	15
2.1.2	Oligonukleotide .....	17
2.1.3	Vektoren und Plasmide .....	17
2.1.4	Pflanzenmaterial .....	17
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	17

2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	17
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	17
2.2.1.2	Isolierung von RNA aus <i>C. annuum</i> und <i>S. lycopersicum</i> .....	17
2.2.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten .....	18
2.2.3	cDNA-Synthese .....	18
2.2.4	<i>Quantitative reverse transcription</i> -PCR .....	19
2.2.5	Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen .....	20
2.2.6	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme .....	20
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	20
2.2.8	DNA-Sequenzierung .....	20
2.2.9	Herstellung kompetenter Zellen.....	20
2.2.9.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	20
2.2.9.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> - und <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	21
2.2.9.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	21
2.2.10	Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA .....	21
2.2.10.1	Chemische Transformation von <i>E. coli</i> .....	21
2.2.10.2	Chemische Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.2.10.3	Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	22
2.2.11	<i>Blunt end</i> -Klonierung in pUC57 ( <i>Bsa</i> I).....	22
2.2.12	<i>Golden-Gate</i> -Klonierung .....	23
2.2.13	Klonierung mittels GATEWAY®-System .....	23
2.2.14	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte transiente Expression <i>in planta</i> .....	24
2.2.15	Virus-induziertes Gen- <i>silencing</i> .....	24
2.3	Biochemische Methoden .....	25
2.3.1	Proteinextraktion aus verschiedenen Organismen .....	25
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.3.3	Immunoblot-Analyse (Western Blot) .....	26
2.4	Methoden für Interaktionsstudien .....	27
2.4.1	Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System .....	27

2.4.2	Interaktionsstudien mittels Y2H-System .....	28
2.4.3	Interaktionsstudien mittels GST-Pull-down .....	29
2.4.4	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) .....	29
2.4.5	Interaktionsstudien mittels Ko-Immünpräzipitation.....	30
2.4.6	Reporter-genaktivierungsstudien .....	30
2.4.6.1	Quantitative GUS-Assay .....	31
2.4.6.2	Histologische GUS-Färbung.....	31
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Identifizierung möglicher pflanzlicher Interaktorproteine von XopG .....	33
3.1.1	Y2H-Sichtung zur Identifizierung möglicher XopG-Interaktoren.....	33
3.1.2	Klonierung der Gene für XopG-Interaktorkandidaten in voller Länge.....	35
3.1.3	Interaktionsstudien zwischen XopG und pflanzlichen Interaktoren in Hefe .	36
3.1.4	XopG und die Varianten EY <sup>-</sup> , HEHEY <sup>-</sup> interagieren direkt mit CaJoka2, SMD40 und CaATM-like .....	42
3.1.5	<i>In planta</i> -Interaktionsstudien mit XopG und möglichen Interaktoren.....	45
3.1.5.1	Etablierung des AvrBs3-basierten „Split-TALE-Assay“ für Interaktionsstudien in <i>N. benthamiana</i> .....	45
3.1.5.1.1	Prinzip des Split-TALE-Systems .....	46
3.1.5.1.2	Funktionstest des Split-TALE-Systems .....	48
3.1.5.1.3	Optimierung der Split-TALE-vermittelten Genaktivierung .....	50
3.1.5.1.4	Funktionaler Test des optimierten Split-TALE-Systems.....	53
3.1.5.2	CaJoka2, SMD40 und CaATM-like interagieren <i>in planta</i> mit der XopG-Variante EY <sup>-</sup> .....	58
3.1.6	Bilden die XopG-Interaktoren CaJoka2, SMD40 und CaATM-like Proteinkomplexe? .....	60
3.1.7	Biologische Relevanz der pflanzlichen XopG-Interaktoren .....	62
3.1.7.1	Gen-silencing von pflanzlichen XopG-Interaktoren in <i>C. annuum</i> .....	63
3.1.7.2	Überexpression der Interaktoren CaJoka2, SMD40 und CaATM-like hat keinen Einfluss auf den XopG-induzierten Zelltod.....	64

3.2	Untersuchungen zur möglichen proteolytischen Aktivität von XopG in der Pflanze .....	66
3.2.1	XopG ko-lokalisiert mit <i>CaJoka2</i> , <i>CaATM-like</i> oder <i>SMD40</i> im pflanzlichen Zellkern .....	66
3.2.2	<i>CaATM-like</i> und <i>SMD40</i> stellen mögliche XopG-Substrate dar.....	68
3.2.3	Ein C-terminales Epitop an XopG reduziert die proteolytische Aktivität .....	70
3.2.4	Substitutionen im vorhergesagten katalytischen Zentrum von XopG beeinflussen dessen Proteaseaktivität .....	75
3.2.5	Einfluss der subzellulären Lokalisierung auf die XopG-Aktivität.....	77
3.2.6	<i>CaJoka2</i> hat einen negativen Einfluss auf die XopG-Proteaseaktivität.....	79
3.2.7	Interaktionsstudien mit Autophagie-relevanten Proteinen.....	80
4	Diskussion und Ausblick .....	84
4.1	XopG spaltet die pflanzlichen Substrate <i>ATM-like</i> und <i>WD40</i> .....	85
4.1.1	Aminosäuren des postulierten katalytischen Zentrums sind wichtig für die XopG-Aktivität <i>in planta</i> .....	85
4.1.2	Das XopG-Substrat <i>CaATM-like</i> .....	87
4.1.3	Das XopG-Substrat <i>WD40</i> .....	88
4.2	Welche Rolle spielt die pflanzliche Autophagie in der <i>Xcv</i> -Infektion? .....	90
4.2.1	XopG interagiert mit dem Autophagie-Rezeptor <i>Joka2</i> .....	90
4.2.2	Der Autophagie-Rezeptor <i>Joka2</i> interagiert mit den XopG-Substraten <i>SMD40</i> und <i>CaATM-like</i> .....	92
4.3	Der XopG-induzierte Zelltod in der Pflanze .....	93
4.3.1	Die mögliche XopG-Erkennung in der Pflanze ist abhängig von dessen Proteaseaktivität .....	93
4.3.2	Ist die XopG-vermittelte Zelltodinduktion Autophagie-bedingt?.....	95
5	Literaturverzeichnis .....	97
6	Anhang.....	109
6.1	Verwendete Oligonukleotide .....	109
6.2	Verwendete Vektoren und Plasmide .....	113

6.3	Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen.....	120
6.4	AS-Sequenzen von XopG und dessen Derivaten.....	122
6.5	AS-Sequenzen der XopG-Interaktoren.....	123
6.6	<i>AS-Alignment</i> von <i>CaATM-like</i> mit Homologen .....	124
6.7	AS-Sequenzen zum Split-TALE-System .....	128
	Lebenslauf .....	130
	Danksagung.....	131
	Eidesstattliche Erklärung.....	132



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid
AD	<i>acidic activation domain</i> , saure Aktivierungsdomäne
ADc/n	N-terminale/C-terminale Aktivierungsdomäne von AvrBs3
AD <sub>GAL4</sub>	GAL4-Aktivierungsdomäne
AIM	<i>Agrobacterium</i> Inokulationsmedium
AIM-Motiv	<i>Atg8-family interacting</i> -Motiv
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>At/A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATG	<i>autophagy-related</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>att</i>	<i>attachement sites</i>
Avr	Avirulenz
BAK1	<i>brassinosteroid-insensitive 1-associated receptor kinase 1</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BD <sub>GAL4</sub>	GAL4-DNA-Bindedomäne
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
BoNT/A	Botulinum-Neurotoxin A
bp	Basenpaare
C	Cytosin-Nukleotid
<i>Ca/C.a.</i>	<i>Capsicum annuum</i> (Paprika)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CC	<i>coiled coil</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CIB1	<i>cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix</i>
cm	Zentimeter
ConA	Concanamycin-A
COR	Coronatin
CRD	<i>central repeat domain</i> , zentrale <i>repeat</i> -Region
CRY2	Cryptochrom 2
CTR	C-terminale Region
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DBD	DNA-Bindedomäne
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i>
EBE	Effektorbindeelement
EBE <sub>AvrBs3</sub>	Effektorbindeelement von AvrBs3
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECW	<i>Early Cal Wonder</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDS1	<i>enhanced disease susceptibility 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFR	EF-Tu-Rezeptor
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERF4	<i>ethylene-responsive transcription factor 4</i>
ERK	extrazelluläre Signal-verwandte Kinase
ET	Ethylen
ETI	<i>effector-triggered immunity</i> , Effektor-induzierte Immunität
EtOH	Ethanol
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i> , Effektor-induzierte Suszeptibilität
f	<i>forward</i>
FAT	FRAP, ATM und TRRAP
FATC	FAT C-terminal
FLS2	<i>flagellin sensing 2</i>
FRAP	<i>FKBP12-rapamycin complex-associated protein</i>
g	Gramm
G	Guanin-Nukleotid
GG	<i>Golden-Gate</i>
Gent <sup>R</sup>	Gentamycin-Resistenz
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase

h	Stunde(n)
HC	<i>heavy chain</i>
Hop	<i>Hrp outer protein</i>
HMM	<i>hidden Markov model</i>
HR	hypersensitive Reaktion
Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JNK	c-Jun-Amino-terminale Kinase
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC	<i>light chain</i>
LITEs	Licht-induzierbare Transkriptionseffektoren
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
-LW	ohne Leucin, Tryptophan
-LWA	ohne Leucin, Tryptophan und Adenin
-LWH	ohne Leucin, Tryptophan und Histidin
m	Mili
M	Molar
M	Metallo
MAMP	<i>microbial-associated molecular pattern</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBT	<i>malignant brain tumor</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
MIN7	HopM1-Interaktor 7
MKK	MAPK-Kinase
ml	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNA</i>

MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronidhydrat
3-MA	<i>3-Methyladenine</i>
4-MU	4-Methylumbelliferon
Nb/N.b.	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NB	Nukleotid-bindend
NBR1	<i>neighbour of brca 1</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NleD	<i>non-locus of enterocyte effacement effector D</i>
NLR	NB/LRR
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssignal
NLS <sub>m</sub>	mutierte NLS
nM	Nanomol
NO	Nitritoxid
<i>Nt/N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
nt	Nukleotid(e)
NTR	N-terminale Region
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
<i>OX11</i>	<i>oxidative signal-inducible 1</i>
PA	Phosphatidsäure
PAD4	<i>phytoalexin deficient 4</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PB1	<i>Phox and Bem 1</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PHD	<i>PHD finger family protein</i>
PIP	<i>plant-inducible promoter</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PM	Plasmamembran
pmol	Picomol
PR	<i>pathogenesis-related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> , PAMP-vermittelte Immunität
pv.	Pathovar
PWWP	Pro-Trp-Trp-Pro

qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription-PCR</i>
r	<i>reverse</i>
R, R	Resistenz
Rsp	T3E in <i>Ralstonia solanacearum</i>
Rif <sup>R</sup>	Rifampicin-Resistenz
RIN4	<i>RPM1-interacting protein 4</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAP	RNA-Polymerase
Roq1	<i>recognition of XopQ 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RPM1	<i>resistance to Pseudomonas syringae pv. maculicola 1</i>
RPS2	<i>resistance to Pseudomonas syringae 2</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i> , reverse Transkription-PCR
S	Suszeptibilität
SA	Salicylsäure
SAG101	<i>senescence-associated gene 10</i>
Sl/S.l.	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)
SOG1	<i>suppressor of gamma response 1</i>
SNAP25	synaptosomales-assoziiertes Protein von 25 kDa
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
St/S.t.	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Spec <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
spp.	<i>species pluralis</i>
ssp.	Subspezies
SWEET	<i>sugars will eventually be exported transporters</i>
T	Thymin-Nukleotid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	<i>transcription activator-like</i>
TALE	TAL-Effektor
TARK1	<i>tomato atypical receptor kinase 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> + Tween20

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TMV	<i>tobacco mosaic leaf virus</i>
TPY	Threonin-Prolin-Tyrosin
TRRAP	<i>transactivation/transformation-domain-associated protein</i>
TRV	<i>tobacco rattle virus</i>
TuMV	<i>turnip mosaic virus</i>
TXRF	<i>total X-ray fluorescence</i>
T3E	Typ III-Effektor
T3S	Typ III-Sekretions- und Translokationssignal
T2SS	Typ II-Sekretionssystem
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
U	<i>units</i> , Einheiten
UV	Ultraviolett
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>ubiquitin associated</i>
UHC	<i>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 1 protein</i>
UPA	<i>upregulated by AvrBs3</i>
V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
VIGS	Virus-induzierte Gen- <i>silencing</i>
VP16	<i>Herpes-Simplex-Virus</i> -Protein 16
VP64	tetrameres Derivat von VP16
Vol.	Volumen
WD	Tryptophan, Aspartat
WT	Wildtyp
WU	<i>Weiss unit</i>
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
YEB	<i>Yeast Extract Broth</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Xop	<i>Xanthomonas outer protein</i>
YEP	<i>Yeast Extract Peptone</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen-Base</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , Hefe-2-Hybrid
ZAR1	<i>HopZ activated resistance 1</i>

ZED1	<i>HopZ-ETI-deficient 1</i>
% (v/v)	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
μ	Mikro
α	Alpha; anti
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gamma</i>
Δ	<i>Delta</i> ; Deletion
λ	<i>Lambda</i>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Identifizierte T3E von Xcv. ....	7
Tabelle 2: In Vorarbeiten identifizierte XopG-Interaktoren. ....	14
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien. ....	15
Tabelle 4: Verwendete Medienzusätze. ....	16
Tabelle 5: Konzentrationen von Aminosäuren und Nukleinbasen. ....	16
Tabelle 6: Verwendete Bakterien- und Hefestämme. ....	16
Tabelle 7: Reaktionsansatz und PCR-Programm. ....	18
Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele. ....	26
Tabelle 9: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper. ....	27
Tabelle 10: Ko-Transformanden der neuen Y2H-Sichtung. ....	33
Tabelle 11: Ergebnisse der zweiten Y2H-Sichtung mit den Ködern XopG <sub>WT</sub> und XopG <sub>EY</sub> . .....	34
Tabelle 12: Klonierte potentielle XopG-Interaktoren. ....	36
Tabelle 13: Ergebnisse der Interaktionsstudien von XopG und Derivaten mit pflanzlichen Kandidatenproteinen ( <sup>a</sup> ) in Hefe. ....	41
Tabelle 14: Eigenschaften von XopG und dessen Derivaten. ....	85
Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide. ....	109
Tabelle 16: Verwendete Vektoren und Plasmide. ....	113
Tabelle 17: Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen. ....	120



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen nach <i>Xcv</i> -Infektion.....	6
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von Zink-Metalloproteasen. ....	10
Abbildung 3: Modellierung der 3D-Struktur von XopG. ....	12
Abbildung 4: CaJoka2 interagiert in Hefe mit XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub> und XopG <sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> . ....	38
Abbildung 5: SMD40 interagiert in Hefe ausschließlich mit XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub> . ....	39
Abbildung 6: CaATM-like interagiert in Hefe ausschließlich mit XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub> . ....	40
Abbildung 7: CaJoka2 und SMD40 interagieren <i>in vitro</i> direkt mit XopG <sub>WT</sub> , XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub> sowie XopG <sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> . ....	43
Abbildung 8: CaATM-like interagiert <i>in vitro</i> direkt mit XopG <sub>WT</sub> , XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub> sowie XopG <sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> . ....	44
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Split-TALE-Systems. ....	47
Abbildung 10: Split-TALE-vermittelte Reporter-gen-Aktivierung nach Interaktion zwischen AtEDS1 und AtPAD4. ....	49
Abbildung 11: Untersuchung der Split-TALE-vermittelten HR-Induktion in <i>Bs3</i> -transgenen <i>N.b.</i> -Pflanzen. ....	50
Abbildung 12: Mögliche Optimierung der Split-TALE-vermittelten Genaktivierung durch Modifikation der Reporter- oder <i>Prey</i> -Konstrukte. ....	51
Abbildung 13: Steigerung der Genaktivierung durch Verwendung multipler AvrBs3-Bindestellen. ....	52
Abbildung 14: Generierung neuer Split-TALE-Vektoren. ....	54
Abbildung 15: Split-TALE-vermittelte Reporter-genaktivierung unter Verwendung der neuen Konstrukte. ....	55
Abbildung 16: Funktionaler Test des optimierten Split-TALE-Systems anhand der Joka2-ATG-Interaktion bzw. LaminC-Dimerisierung. ....	56
Abbildung 17: <i>In planta</i> interagieren CaJoka2, SMD40 und CaATM-like mit der XopG-Variante EY <sup>-</sup> . ....	59
Abbildung 18: CaJoka2 sowie SMD40 bilden in Hefe Homodimere aus. ....	61
Abbildung 19: CaATM-like und SMD40 interagieren mit CaJoka2 in Hefe. ....	62
Abbildung 20: <i>Silencing</i> von CaATM-like in ECW-Paprikapflanzen. ....	63
Abbildung 21: Ko-Expression von CaJoka2, SMD40 und CaATM-like haben keinen Einfluss auf den XopG-induzierten Zelltod in <i>N. tabacum</i> . ....	65
Abbildung 22: Ko-Lokalisierung von XopG mit CaJoka2, CaATM-like sowie SMD40 im pflanzlichen Zellkern. ....	67
Abbildung 23: Mögliche Spaltung von CaATM-like durch XopG <sub>WT</sub> . ....	69

Abbildung 24: Mögliche Spaltung von SMD40 durch XopG <sub>WT</sub> . .....	70
Abbildung 25: XopG-vermittelte Zelltodreaktionen in <i>N. tabacum</i> und <i>C. annuum</i> unter Verwendung N- und C-terminale Epitope.....	71
Abbildung 26: C-terminal markiertes XopG weist eine schwächere Proteaseaktivität für SMD40 auf. ....	73
Abbildung 27: C-terminal markiertes XopG weist eine schwächere proteolytische Aktivität für <i>CaATM-like</i> auf.....	74
Abbildung 28: Substitutionen im vorhergesagten katalytischen XopG-Zentrum führen zu einer stark reduzierten SMD40-Proteolyse. ....	76
Abbildung 29: Substitutionen im vorhergesagten katalytischen Zentrum von XopG resultieren in einer stark verminderten <i>CaATM-like</i> -Proteolyse. ....	77
Abbildung 30: NES-Fusion hat keinen Einfluss auf die XopG-vermittelte Zellinduktion in <i>N.t.</i> und <i>C.a.</i> ECW. ....	78
Abbildung 31: Die Proteolyse von SMD40 durch XopG ist Zellkern-unabhängig. ....	79
Abbildung 32: Bei Anwesenheit von <i>CaJoka2</i> findet vermutlich ein verminderte mögliche Proteolyse von SMD40 durch XopG statt. ....	80
Abbildung 33: Im Y2H-Test interagiert <i>CaJoka2</i> mit <i>StJoka2</i> und <i>StATG8CL</i> .....	82
Abbildung 34: Im Y2H-Test interagiert ausschließlich die XopG-Variante EY <sup>-</sup> mit <i>StJoka2</i> und <i>StJoka2AIM</i> . ....	83
Abbildung 35: Modell zur indirekten NLR-vermittelten Erkennung des T3Es XopG. ....	94

# 1 Einleitung

Pflanzen stellen für den Menschen eine lebenswichtige Grundlage dar, da sie als Nahrung, Sauerstoff-, Energie- sowie Rohstofflieferant dienen und auch für die Pharmazie sowie Medizin essentiell sind. Durch ihre sessile Lebensweise müssen sich Pflanzen an die Umwelt mit ihren biotischen (z. B. Pathogene) und abiotischen Faktoren (z. B. extreme Temperaturen, Trockenheit, Nässe) anpassen. Weltweit werden Nutzpflanzen durch eine Vielzahl von Phytopathogenen wie Bakterien, Pilzen, Viren oder Nematoden befallen, was Ertragsreduzierungen bis hin zu vollständigen Ernteaussfällen zur Folge hat (Oerke, 2006; Savary *et al.*, 2012). Pflanzen besitzen jedoch Abwehrmechanismen, wodurch eine erfolgreiche Infektion durch Phytopathogene eher eine Ausnahme darstellt. So gelingt es spezialisierten Pathogenen die pflanzliche Abwehr zu überwinden, was ein ständiges Wettrüsten zwischen Pflanzen und Pathogenen nach sich zieht. Da das Verständnis dieser Abläufe wichtig zur Schädlingsbekämpfung und zum Schutz von Nutzpflanzen ist, sind pflanzliche Abwehrmechanismen sowie Infektionsstrategien der Pathogene Gegenstand der aktuellen Forschung. Gram-negative pflanzenpathogene Bakterien, die stets extrazellulär agieren, dienen aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit für molekularbiologische Untersuchungen als Modellorganismen in der Phytopathologie (Mansfield *et al.*, 2012). Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung eines Effektorproteins aus *Xanthomonas*, daher liegt der Fokus der folgenden Abschnitte auf Gram-negativen bakteriellen Phytopathogenen und entsprechenden pflanzlichen Reaktionen.

## 1.1 Pflanzen leisten Widerstand: Abwehrsysteme der Pflanze

Im Gegensatz zu Säugetieren besitzen Pflanzen kein adaptives Immunsystem, sondern eine „angeborene Immunität“ („innate immunity“; Jones & Dangl, 2006). Die Koevolution zwischen Pflanzen und Pathogenen hat zu ausgeklügelten Abwehrmechanismen geführt. So dienen der Pflanze z. B. die Kutikula oder die Zellwand als erste physikalische Barrieren gegenüber Phytopathogenen (Underwood, 2012; Yeats & Rose, 2013). Werden diese durch Phytopathogene überwunden, kann die Pflanze mittels verschiedener Erkennungssysteme Abwehrreaktionen induzieren. Die Perzeption von Pathogen- oder Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs oder MAMPs) erfolgt durch spezifische Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) und führt zur basalen Abwehr der Pflanze, die als PAMP-vermittelte Immunität (PTI, *PAMP-triggered immunity*) bezeichnet wird (Jones & Dangl, 2006; Yu *et al.*, 2017). Bakterielle PAMPs, z. B. Flagellin, Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), Peptidoglykan (PGN) oder Lipopolysaccharide, sind meist konservierte Moleküle und für das Überleben des Pathogens unentbehrlich (Zipfel, 2009). Außerdem können wirtseigene Moleküle (DAMPs, *damage-associated molecular pattern*),

die durch mikrobielle Enzyme oder Toxine freigesetzt werden, eine PRR-abhängige Abwehrreaktion auslösen. PRRs sind in der Regel transmembrane Proteine mit einer extrazellulären LRR (*leucine-rich repeat*)-Domäne für die Ligandenbindung und einer zytoplasmatischen Kinase-Domäne zur Signalweiterleitung (Böhm *et al.*, 2014; Zipfel, 2014). Zu den am besten charakterisierten PRRs in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zählen *Flagellin-sensing 2* (FLS2), welches ein 22 Aminosäure-langes Peptid des Flagellinproteins (flg22) aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) erkennt, sowie der EF-Tu-Rezeptor (EFR), welcher das vom bakteriellen EF-Tu stammende Elf18-Peptid erkennt (Böhm *et al.*, 2014; Zipfel, 2014). Nach Ligandenbindung bilden FLS2 sowie EFR einen Komplex mit dem Ko-Rezeptor BAK1 (*brassinosteroid-insensitive 1-associated receptor kinase 1*), was in einer schnellen Phosphorylierung beider Proteine resultiert. Daraufhin werden zytoplasmatische Proteinkinasen, wie z. B. BIK1 (*Botrytis-induced kinase 1*), phosphoryliert und dissoziieren vom PRR-BAK1-Komplex. Diese Interaktions- und Phosphorylierungsereignisse führen innerhalb kurzer Zeit zur Aktivierung von Immunreaktionen in der Pflanze (Macho & Zipfel, 2014; Segonzac *et al.*, 2014). Hierzu zählen der Anstieg der Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration im Zytosol, das Schließen der Stomata, die Zellwandverstärkung durch Kalloseeinlagerung sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Nitritoxid (NO), Phosphatidsäure (PA), Phytoalexinen und Phytohormonen. Weiterhin wird eine MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen)-Kaskade eingeleitet, die in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF) und Abwehr-assoziiierter Gene (*pathogenesis-related*, *PR*) resultiert (Couto & Zipfel, 2016; Yu *et al.*, 2017). Die PTI dient zum Schutz der Pflanze vor Infektionen mit nicht adaptierten Pathogenen und stellt daher eine grundlegende Barriere gegenüber Krankheitserregern dar (Dodds & Rathjen, 2010; Yu *et al.*, 2017). Als Gegenmaßnahme verfügen spezialisierte Phytopathogene über erworbene Virulenzfaktoren (Effektoren), welche in die Pflanzenzelle übertragen werden, um die PTI-Antwort zu unterdrücken und somit die bakterielle Virulenz zu fördern, was in der Effektor-induzierten Suszeptibilität (ETS, *effector-triggered susceptibility*) resultiert (Jones & Dangl, 2006). Um der ETS entgegenzuwirken, kann die Pflanze eine zweite Stufe der Verteidigung einleiten, die als Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) bezeichnet wird (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). Dabei erkennen intrazelluläre Immunrezeptoren spezifische Effektoren in der Pflanzenzelle. Diese pflanzlichen Rezeptoren besitzen in der Regel eine variable N-terminale Domäne, eine zentrale Nukleotid-bindende (NB)-Domäne sowie eine C-terminale LRR-Domäne und werden als NLR-Proteine (NLRs) bezeichnet. NLRs können Effektorproteine direkt oder indirekt perzipieren. Bei einer indirekten Erkennung werden entweder Effektorzielproteine (*guardees*) oder Lockproteine (*decoys*), welche Zielproteine von Effektoren nachahmen, durch die NLRs gebunden bzw. überwacht. In beiden Fällen detektieren die NLRs

Effektor-vermittelte Modifikationen der *guardees* oder *decoys* (Cui *et al.*, 2015; Cesari, 2017). Darüber hinaus kann eine Effektor-Perzeption auch an der pflanzlichen DNA, z. B. von TALEs (*transcription activator-like effectors*), erfolgen. In diesem Fall enthalten die Resistenz (*R*)-Gene Promotormotive, an die ein bestimmtes Effektorprotein sequenz-spezifisch bindet und so die Expression des *R*-Gens induziert (Römer *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2015). Die ETI ist eine stärkere, langanhaltendere Immunantwort mit ähnlichen Signalwegen und Ergebnissen (z. B. MAPK-Aktivierung, ROS-Produktion oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom) als die PTI und geht häufig mit einem schnellen, lokalen Zelltod des infizierten Pflanzengewebes einher. Diese sogenannte hypersensitive Reaktion (HR) verhindert eine Ausbreitung des Pathogens (Dodds & Rathjen, 2010; Cui *et al.*, 2015).

## 1.2 Bakterielle Phytopathogene schlagen zurück: Strategien der Pflanzenmanipulation

Für eine erfolgreiche Besiedlung der Wirtspflanze müssen bakterielle Phytopathogene die basale pflanzliche Abwehr unterdrücken. Bakterien wie Subspezies von *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* und *Xanthomonas* sowie *Ralstonia solanacearum* sekretieren Virulenzfaktoren (z. B. Toxine oder Enzyme) in das extrazelluläre Milieu oder direkt in das pflanzliche Zytosol. Bakterien exprimieren bis zu sieben verschiedene Sekretionssysteme (Green & Meccas, 2016). Das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) ist in den meisten Gram-negativen Pathogenen konserviert und essentiell für deren Pathogenität (Hueck, 1998; Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Das T3SS transloziert sogenannte Typ III-Effektoren (T3E) direkt in die eukaryotische Zelle (Chang *et al.*, 2014; Büttner, 2016). Die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation hängt von einem Exportsignal ab, welches meist in der N-terminalen Region der Substrate lokalisiert, aber nicht auf AS (Aminosäure)-Ebene konserviert ist (Büttner, 2016). Phytopathogene Bakterien besitzen in der Regel ein großes variables T3E-Repertoire. Beispielsweise exprimieren *P. syringae*-Stämme 9 bis 39 verschiedene T3E. *R. solanacearum*-Stämme besitzen 60 bis 75 T3E. In *Xanthomonas* spp. zeigten vergleichende Genomsequenzanalysen, dass es auf 3 bis 32 *core*-Effektoren gibt (Büttner, 2016). T3E manipulieren die zelluläre Maschinerie der Pflanze, sodass sich die Bakterien im pflanzlichen Gewebe vermehren, was zur Ausbildung von Krankheitssymptomen führt (Deslandes & Rivas, 2012; Büttner, 2016). Einige T3E [Avirulenz (Avr)-Proteine] werden in resistenten Wirtspflanzen erkannt, was eine ETI-vermittelte Abwehr, meist HR, auslöst (Klement, 1982; Jones & Dangl, 2006). T3E steuern innerhalb der Pflanzenzelle verschiedene Wirtsziele an und variieren in ihrer molekularen Funktionsweise. So fungieren Effektorproteine beispielsweise als Kinasen, E3-Ligasen, TF oder Proteasen und können u. a. Signaltransduktion, Genexpression, Proteasom-abhängigen Proteinabbau, Hormonsignalwege oder den Metabolismus der

Pflanze manipulieren (Büttner, 2016; Macho, 2016; Toruno *et al.*, 2016). Bislang bekannte Zielproteine von T3E lokalisieren vorwiegend an der Membran (40 %), im Kern (31 %) bzw. im Zytoplasma (24 %), während andere subzelluläre Kompartimente, wie Chloroplasten (2 %), Mitochondrien (1 %), Vakuolen (1 %), Peroxisomen (1 %), frühe Endosomen (1 %) und endoplasmatisches Retikulum (ER; 1 %), lediglich einen geringen Anteil ausmachen (Khan *et al.*, 2018).

T3E zielen frühzeitig auf die pflanzliche Abwehr, indem sie PRRs bzw. deren Ko-Rezeptoren abbauen und/oder hemmen. Dies führt zur Suppression der PAMP-vermittelten Aktivierung. So ubiquitiniert die E3-Ubiquitin-Ligase AvrPtoB aus *Pseudomonas* mehrere PRRs und fördert deren Proteasom-vermittelten Abbau. Dagegen inhibiert AvrPto die Kinaseaktivitäten der PRRs FLS2 sowie EFR und blockiert dadurch die Signalweiterleitung. Ein weiteres Beispiel ist die Tyrosin-Phosphatase HopAO1, welche durch Dephosphorylierung von EFR die Signaltransduktion stört. Auch der Ko-Rezeptor BAK1 wird von mehreren Effektoren, darunter HopF2, AvrPto und AvrPtoB, angesteuert, was die Immunantwort supprimiert (Macho & Zipfel, 2015; Büttner, 2016; Toruno *et al.*, 2016).

Des Weiteren können MAPK-Kaskaden von T3E manipuliert werden, um die stromabwärts liegende Signalkette zu unterbrechen, die eine PTI-Antwort auslöst. So zielt die ADP-Ribosyltransferase HopF2 auf MKK5 (MAPK-Kinase 5) und verhindert deren Aktivierung. Die Phosphothreonin-Lyase HopA11 inaktiviert mehrere MAPKs (MPK3, MPK4 und MPK6) durch deren irreversible Dephosphorylierung. Im Gegensatz dazu aktiviert AvrB die MPK4, stört die Hormonsignalübertragung und fördert die Infektion (Macho & Zipfel, 2015; Büttner, 2016; Toruno *et al.*, 2016).

Pflanzenhormone wie z. B. Ethylen (ET), Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) besitzen eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der pflanzlichen Abwehr. Daher stellen auch Phytohormonsignalwege Angriffsziele von Effektoren dar (Kazan & Lyons, 2014; Ma & Ma, 2016). Einige *Pseudomonas*-Stämme produzieren das Phytotoxin Coronatin (COR), ein Analog des Pflanzenhormons JA, und manipulieren so hormonregulierte Signale, was u. a. zur Öffnung der Stomata führt. Andere Effektoren, wie HopX1 und HopZ1a, aktivieren die pflanzliche JA-Signaltransduktion und supprimieren somit die SA-vermittelte Abwehr. Im Allgemeinen wirken die SA- und JA-Abwehrwege in der Pflanze antagonistisch (Kazan & Lyons, 2014; Ma & Ma, 2016). XopD aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) desumoyliert ERF4 (*ethylene-responsive transcription factor 4*), was zu einer Störung der ETI-vermittelten Immunantwort in Tomatenpflanzen führt (Kim *et al.*, 2013).

Eine weitere Strategie bakterieller Phytopathogene ist die direkte Manipulation der Genexpression. TALEs aus *Xanthomonas* spp. und *Ralstonia* spp. werden in den pflanzlichen Zellkern transportiert und wirken als Transkriptionsaktivatoren (Boch & Bonas,

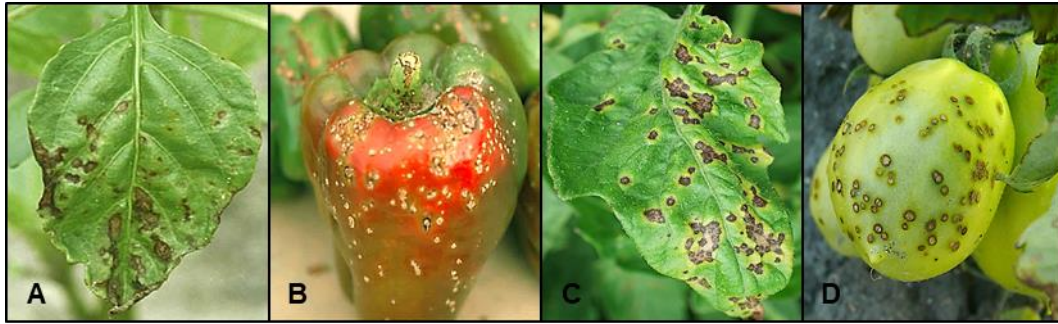
2010; Scholze & Boch, 2011). So induziert der TALE AvrBs3 aus *Xcv* *UPA20* (*upregulated by AvrBs3*), dessen Expression zu einer Hypertrophie in suszeptiblen Paprikapflanzen (*Capsicum* spp.) führt (Kay *et al.*, 2007). Hingegen zielen andere T3E, wie XopD aus *Xanthomonas* spp., PopP2 aus *R. solanacearum* oder HopU1, HopD1 sowie HopM1 aus *P. syringae*, auf pflanzliche TF und RNA-bindende Proteine und beeinflussen die Genexpression indirekt (Büttner, 2016).

Die meisten bakteriellen Phytopathogene vermehren sich extrazellulär im Apoplasten infizierter Pflanzen. Eine erfolgreiche Kolonisierung beruht auf der Fähigkeit diesen Lebensraum auf ihre physiologischen Erfordernisse (z. B. Wassergehalt oder Konzentration an Zucker) anzupassen. Neueste Studien legen nahe, dass einige T3E hierbei eine Rolle spielen. So aktivieren die TALEs PthXo1 und AvrXa7 aus *Xanthomonas* die Expression von Suszeptibilitäts (S)-Genen, wie z. B. *SWEET* (*sugars will eventually be exported transporters*), der Pflanze, wodurch die Zuckerkonzentration im Apoplasten steigt (El Kasmi *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu modifizieren die *Pseudomonas*-T3E AvrE und HopM1 den Wassergehalt im Apoplasten. Der TALE AvrHah1 aus *Xanthomonas gardneri* ermöglicht durch die transkriptionelle Aktivierung einer Pektatlyase eine erhöhte Wasseraufnahme in den Apoplasten (Beattie, 2016; El Kasmi *et al.*, 2018).

Der Vesikeltransport in pflanzlichen Zellen spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr und ermöglicht u. a. den Transport von Rezeptoren an die Plasmamembran (PM) und die Sekretion antimikrobieller Moleküle wie PR-Proteine, Phytotoxine oder Zellwand-verstärkende Komponenten (Kallose). Der *Pseudomonas*-T3E HopM1 inhibiert den Vesikeltransport und somit die basale Abwehr in *A. thaliana*, indem HopM1 mit MIN7 (HopM1-Interaktor 7) interagiert und dessen Proteasom-vermittelten Abbau fördert (Macho & Zipfel, 2015; Toruno *et al.*, 2016). Auch für die *Xanthomonas*-Effektoren XopB und XopJ wurde ein Einfluss auf den Vesikeltransport beschrieben (Bartetzko *et al.*, 2009; Schulze *et al.*, 2012).

### **1.3 Das Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* als Modellorganismus**

Ein bedeutender Vertreter zur Erforschung der Pathogen-Pflanzen-Interaktionen stellt das Gram-negative  $\gamma$ -Proteobakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) dar, das in die Familie *Xanthomonadaceae* und Gattung *Xanthomonas* eingeordnet wird. *Xanthomonas*-Bakterien leben unter obligat aeroben Bedingungen und sind meist gelb-pigmentierte Stäbchen mit einem polaren Flagellum (Dye & Lelliott, 1974). *Xcv*, auch als *X. euvesicatoria* bezeichnet (Jones *et al.*, 2004), ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika- (*Capsicum annuum*) und Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) (Dye *et al.*, 1980; Abbildung 1).



**Abbildung 1: Bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen nach *Xcv*-Infektion.**

Das Pflanzenpathogen *Xcv* löst Krankheitssymptome in *Capsicum annuum* (A, B) und *Solanum lycopersicum* (C, D) aus. Charakteristische Symptome sind braune, nekrotische Flecken auf Blättern (A, C) und Früchten (B, D). Bildquellen: (A, B) <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspt.aspx>; (C, D) <http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/tomatoes/diseases-and-disorders/bacterial-spot.html>.

Die bakterielle Fleckenkrankheit tritt weltweit auf und führt besonders in feucht-warmen Anbaugeländen zu hohen Ernteverlusten (Jones *et al.*, 1998). Die Krankheitssymptome infizierter Blätter und Früchte sind wässrige Läsionen, die später nekrotisch werden (Abbildung 1 A-D). Die natürliche Ausbreitung erfolgt in Aerosolen und durch Regen. *Xcv* dringt über natürliche Öffnungen (Stomata) oder Wunden in den Apoplasten des pflanzlichen Gewebes ein, verbreitet sich aber nicht systemisch in der Pflanze (Cox *et al.*, 1956; McInnes *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1991; Stall, 1995). Essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist das T3SS, welches durch das chromosomale *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*)-Gencluster kodiert wird (Bonas *et al.*, 1991; Büttner & Bonas, 2002). Die Expression des *hrp*-Genclusters wird durch den Regulator HrpG aus der OmpR-Familie sowie den AraC-ähnlichen Transkriptionsaktivator HrpX kontrolliert. Bei der *Xcv*-Infektion wird HrpG durch ein unbekanntes pflanzliches Signal aktiviert, was zur Induktion des *hrpX*-Gens führt. HrpX bindet an PIP (*plant inducible promoter*)-Boxen im Promotorbereich von *hrp*- und weiteren Genen, welche u. a. Effektorproteine kodieren, und induziert deren Expression (Noël *et al.*, 2001; Koebnik *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Effektorrepertoire von *Xcv*

Wie andere pflanzenpathogene Bakterien exprimiert *Xcv* ein großes T3E-Repertoire. Gegenwärtig sind 40 Effektoren bekannt, die hauptsächlich im *Xcv*-Stamm 85-10 identifiziert wurden (Noël *et al.*, 2001; Roden *et al.*, 2004a; Thieme *et al.*, 2005; Teper *et al.*, 2016). Die Effektorproteine von *Xcv* werden als sogenannte *Xanthomonas outer proteins* (Xops) bezeichnet (Tabelle 1). Einige T3E wie AvrBs1 oder AvrBs2 sind mit dem Kürzel „Avr“ versehen, da sie aufgrund ihrer Avr-Aktivität in Pflanzen identifiziert wurden (Ronald & Staskawicz, 1988; Bonas *et al.*, 1989; Minsavage *et al.*, 1990). Neun T3E (AvrBs2, XopK, XopL, XopN, XopP, XopQ, XopR, XopX und XopZ) sind in einer Vielzahl sequenzierter *Xanthomonaden* konserviert und wurden als *core*-Effektoren bezeichnet (White *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2011; Tabelle 1 grau unterlegt).



Tabelle 1: Identifizierte T3E von *Xcv*.

Effektor	(Vorhergesagte) Funktion/Merkmal/Homologie	Referenz
AvrBs1	Unbekannte Funktion, AvrA <sup>a</sup> , erkannt durch <i>Bs1-R</i> -Gen	(Ronald & Staskawicz, 1988; Escolar <i>et al.</i> , 2001; Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
AvrBs2	Glycerolphosphodiesterase	(Kearney & Staskawicz, 1990; Zhao <i>et al.</i> , 2011)
AvrBs3 <sup>e</sup>	Transkriptionsaktivator (TALE), AvrBs3-Proteinfamilie	(Bonas <i>et al.</i> , 1989; Boch & Bonas, 2010)
AvrBs4 <sup>e</sup>	Transkriptionsaktivator (TALE), AvrBs3-Proteinfamilie	(Bonas <i>et al.</i> , 1993)
AvrBsT <sup>e</sup>	Acetyltransferase, YopJ <sup>c</sup> /AvrRxv-Familie	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; Kim <i>et al.</i> , 2010; Szczesny <i>et al.</i> , 2010; Cheong <i>et al.</i> , 2014)
AvrRxo1	NAD Kinase	(Salomon <i>et al.</i> , 2011; Shidore <i>et al.</i> , 2017)
AvrRxv	Cystein-Protease, 14-3-3-Bindung, YopJ <sup>c</sup> /AvrRxv-Familie	(Whalen <i>et al.</i> , 1993; Bonshtien <i>et al.</i> , 2005; Whalen <i>et al.</i> , 2008)
AvrXv3	Unbekannte Funktion, 14-3-3-Bindung; HopAF1 <sup>a</sup>	(Scott <i>et al.</i> , 1995; Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a; Dubrow <i>et al.</i> , 2018)
AvrXv4	SUMO protease, YopJ <sup>c</sup> /AvrRxv-Familie	(Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000b; Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopB	unbekannte Funktion, HopD1 <sup>a</sup>	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Schulze <i>et al.</i> , 2012; Priller <i>et al.</i> , 2016)
XopC	HAD-like Hydrolase, Phosphoribosyltransferase, RSp1239 <sup>b</sup>	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Salomon <i>et al.</i> , 2011)
XopD	SUMO-Protease, Tomaten-Zielprotein ERF4	(Noël <i>et al.</i> , 2002; Hotson <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2013)
XopE1/E2	Transglutaminase, 14-3-3-Bindung, HopX <sup>a</sup> -Familie	(Thieme <i>et al.</i> , 2007; Dubrow <i>et al.</i> , 2018)
XopF1/F2	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004a)
XopG	Zink-Metalloprotease, HopH <sup>a</sup> -Familie	(Thieme <i>et al.</i> , 2005; Potnis <i>et al.</i> , 2011; Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopH	1-Phytase, InsP <sub>6</sub> -Hydrolyse, HopAO <sup>a</sup> -Familie	(Potnis <i>et al.</i> , 2012; Blüher <i>et al.</i> , 2017)
XopI	F-Box Protein	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopJ	Protease/Acetyltransferase, YopJ <sup>c</sup> /AvrRxv-Familie, Zielprotein RPT6	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Thieme <i>et al.</i> , 2007; Üstün <i>et al.</i> , 2013; Üstün & Börnke, 2015)
XopK	E3-Ubiquitin-Ligase <sup>d</sup>	(Schulze <i>et al.</i> , 2012; Qin <i>et al.</i> , 2018)
XopL	E3-Ubiquitin-Ligase, Stromuli-Suppression	(Singer <i>et al.</i> , 2013; Erickson <i>et al.</i> , 2018)
XopM	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopN	Unbekannte Funktion, Interaktion mit TARK1 und TFT1, 14-3-3-Bindung, HopAU <sup>a</sup>	(Roden <i>et al.</i> , 2004a; Kim <i>et al.</i> , 2009; Taylor <i>et al.</i> , 2012)
XopO	Unbekannte Funktion, 14-3-3-Bindung, AvrRps4 <sup>a</sup>	(Roden <i>et al.</i> , 2004a; Dubrow <i>et al.</i> , 2018)
XopP	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004a)
XopQ	Nukleosid-Hydrolase, 14-3-3-Bindung, EDS1-abhängige Erkennung in <i>N.b.</i> , HopQ <sup>a</sup> -Familie	(Roden <i>et al.</i> , 2004a; Teper <i>et al.</i> , 2014; Adlung <i>et al.</i> , 2016; Dubrow <i>et al.</i> , 2018)
XopR	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopS	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopV	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopX	Unbekannte Funktion	(Metz <i>et al.</i> , 2005; Stork <i>et al.</i> , 2015)
XopZ	Unbekannte Funktion	(Ryan <i>et al.</i> , 2011)
XopAA	Unbekannte Funktion, <i>Early chlorosis factor</i>	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
XopAD	Nukleotidyltransferase, RipS <sup>b</sup>	(Teper <i>et al.</i> , 2016)
XopAE	E3-Ubiquitin-Ligase	(White <i>et al.</i> , 2009; Popov <i>et al.</i> , 2018)
XopAI	Unbekannte Funktion	(White <i>et al.</i> , 2009)
XopAK	Deaminase, HopK1 <sup>a</sup>	(Teper <i>et al.</i> , 2016)
XopAP	Klasse III-Lipase, Homologie zu AtDAD1, RipAL <sup>b</sup>	(Teper <i>et al.</i> , 2016)
XopAU	Protein-Kinase, MKK2-Phosphorylierung, 14-3-3-Bindung	(Teper <i>et al.</i> , 2016; Dubrow <i>et al.</i> , 2018; Teper <i>et al.</i> , 2018)
XopAV	Unbekannte Funktion	(Teper <i>et al.</i> , 2016)
XopAW	Kalzium-bindendes Protein	(Teper <i>et al.</i> , 2016)
XopAX	Unbekannte Funktion	(Teper <i>et al.</i> , 2016)

Homologie zu Effektoren aus *Pseudomonas* spp. (<sup>a</sup>), *Ralstonia solanacearum* (Rsp; <sup>b</sup>), *Yersinia pestis* (*Yersinia outer protein*, Yop; <sup>c</sup>); XopK aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* zeigt E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (<sup>d</sup>); AvrBs3, AvrBs4 und AvrBsT werden nicht von *Xcv* 85-10 kodiert (<sup>e</sup>), sondern von *Xcv* 75-3 (AvrBs4, AvrBsT) bzw. *Xcv* 82-8 (AvrBs3). Die *core*-Effektoren von *Xanthomonas* spp. sind grau unterlegt (White *et al.*, 2009; Ryan *et al.* (2011); TALE (*transcription activator-like effector*), RPT6 (*regulatory particle ATPase 6*), TARK1 (*tomato atypical receptor kinase 1*), TFT1 (*tomato 14-3-3 1*), EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*), *N.b.* (*N. benthamiana*), AtDAD1 (*defective in anther dehiscence 1* aus *A. thaliana*), MKK5 (MAPK-Kinase 5).

Nach ihrer Translokation in die Pflanzenzelle lokalisieren T3E entsprechend ihrer pflanzlichen Zielproteine in verschiedenen subzellulären Kompartimenten. So zielt z. B. der T3E XopN auf die PM-ständige Kinase TARK1 (*tomato atypical receptor kinase 1*) und die 14-3-3-Isoform TFT1 (*tomato 14-3-3 1*), einen positiven Regulator der PTI, was zur Suppression der PTI führt (Kim *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). Neueste Studien belegen, dass XopAU als Proteinkinase die MAPK-Signaltransduktion manipuliert, indem es MKK2 phosphoryliert und aktiviert (Teper *et al.*, 2016; Teper *et al.*, 2018). Die E3-Ubiquitin-Ligase XopL erfüllt gleich mehrere Funktionen. So ermöglicht XopL die Bindung an Pflanzenproteine durch die N-terminale LRR-Domäne, führt zur Ubiquitinierung noch unbekannter Substrate und ist relevant für die Unterdrückung der PTI-Abwehr (Singer *et al.*, 2013). Zudem zeigen neueste Studien, dass XopL, abhängig von dessen E3-Ligase-Aktivität, ein Stromuli-Suppressor ist und die Verlagerung von Plastiden um den pflanzlichen Zellkern induziert (Erickson *et al.*, 2018). Der T3E XopQ, welcher zur HopQ1-Familie gehört und Ähnlichkeiten zu Nukleosid-Hydrolasen aufweist, spielt eine Rolle als Virulenz- und Avirulenzfaktor. XopQ fördert das *Xcv*-Wachstum in resistenten Pflanzen, interagiert mit 14-3-3-Proteinen der pflanzlichen Immunität und unterdrückt die ETI, die durch andere Effektoren ausgelöst werden (Teper *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2015; Adlung & Bonas, 2017). Außerdem wird XopQ in Nicht-Wirtspflanzen EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*)-abhängig durch das TLR (*toll-like receptors*)-Protein Roq1 (*recognition of XopQ 1*) erkannt (Adlung *et al.*, 2016; Schultink *et al.*, 2017). Interessanterweise ist die XopQ-Erkennung für die Zelltod-supprimierende Aktivität in der Pflanze erforderlich (Adlung & Bonas, 2017). Aber auch andere Effektorproteine, z. B. XopB und XopX, sind von großer Bedeutung, da sie die Immunantwort des Wirtes unterdrücken (Metz *et al.*, 2005; Schulze *et al.*, 2012; Stork *et al.*, 2015; Priller *et al.*, 2016). Die *Xcv*-T3E XopD und XopJ modulieren Pflanzenhormon-assoziierte Prozesse. Beispielsweise unterdrückt XopD als SUMO-Protease die Ethylen-induzierte Transkription, welche für die pflanzliche Abwehr gegenüber *Xcv* erforderlich ist. Hierbei wird ERF4 durch XopD desumoyliert (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass XopJ durch die Degradation der Proteasom-Untereinheit RPT6 (*regulatory particle ATPase 6*) die Proteasom-Aktivität inhibiert, was in einer Hemmung der SA-abhängigen Immunantwort resultiert (Üstün *et al.*, 2013; Üstün & Börnke, 2015).

Bislang wurde lediglich für einige *Xcv*-Effektoren die molekulare Funktionsweise aufgeklärt (Tabelle 1). Daher ist es Ziel der laufenden Forschung, pflanzliche Zielproteine von *Xcv*-T3E zu identifizieren, deren Funktion näher zu charakterisieren und somit eine mögliche Rolle in der pflanzlichen Abwehr nachzuweisen.

## 1.4 Der Typ III-Effektor XopG

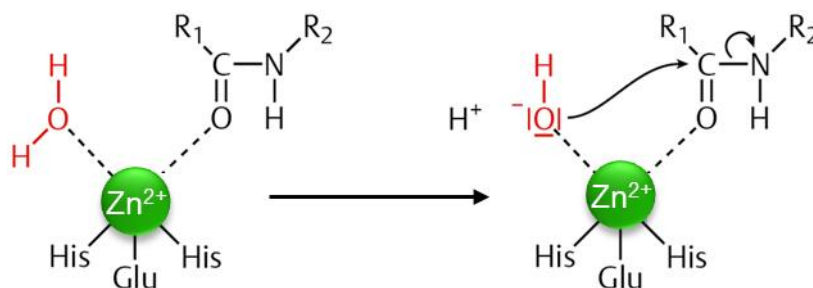
Bei der Suche nach neuen T3E war die Genom-Entschlüsselung des *Xcv*-Stammes 85-10 von großer Bedeutung und führte u. a. zur Identifizierung des Effektor Kandidaten XCV1298 (Thieme *et al.*, 2005). Die Analyse der T3-abhängigen Sekretion sowie Translokation bestätigte XopG (XCV1298) als T3E (Thieme, 2006; Potnis *et al.*, 2011). Das *xopG*-Gen ist auf dem *Xcv*-Chromosom lokalisiert, flankiert von Insertionselementen (IS1477, IS1479, und ISXac2) und einem tRNA-Gen (Thieme, 2006). Während die Expression vieler Effektorgene (z. B. *xopC*, *xopE1*, *xopE2*, *xopH*, *xopI* und *xopJ*) durch HrpG und HrpX reguliert wird, ist *xopG* konstitutiv exprimiert und besitzt keine PIP-Box im Promotorbereich (Thieme, 2006). Interessanterweise kodiert das *xopG*-Gen für eine mögliche Zink-abhängige Metalloprotease mit einer Größe von 213 AS. Homologe des Effektorproteins kommen in anderen Xanthomonaden (*X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. vesicatoria* oder *X. gardneri*) sowie in *P. syringae* und *R. solanacearum* vor (Thieme *et al.*, 2005; Potnis *et al.*, 2011). Jedoch ist über diese XopG-Homologe bislang nichts bekannt. Bei der Suche nach weiteren Homologen stellte sich heraus, dass XopG jeweils Ähnlichkeiten zu der katalytischen Region von Botulinum-Neurotoxin A (BoNT/A, Proteasedomäne) aus *Clostridium botulinum* (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten) bzw. dem Effektorprotein NleD aus dem enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamm (EPEC) aufweist. BoNT/A sowie NleD werden den Metalloendopeptidasen zugeordnet und als Zink-Metalloproteasen bezeichnet (Fujii *et al.*, 1992; Montecucco & Schiavo, 1995; Baruch *et al.*, 2011).

Unter Standard-Laborbedingungen zeigte eine *xopG*-Deletionsmutante von *Xcv* im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10 keine Unterschiede bei der Ausbildung von Krankheitssymptomen oder der HR in Wirtspflanzen (Schulze *et al.*, 2012; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Interessanterweise induziert XopG nicht nur in der Wirtspflanze *C. annuum* (ECW, ECW-10R), sondern auch in einigen Nicht-Wirtspflanzen der Gattungen *Nicotiana* und *Nicandra* einen schnellen Zelltod nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression. Diese XopG-vermittelte Zelltodinduktion kann in Anwesenheit des T3Es XopB unterdrückt werden (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013; Adlung *et al.*, 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass XopG im pflanzlichen Zellkern und vereinzelt im Nukleolus lokalisiert ist (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013).

### 1.4.1 Zink-Metalloproteasen

Proteasen (Peptidasen) sind Enzyme, die Peptidbindungen von Polypeptiden und Proteinen hydrolysieren. Proteasen kommen in allen lebenden Organismen vor, sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt und werden in zwei Gruppen unterteilt: Exopeptidasen, welche die Amino- oder Carboxyl-Kettenenden spalten, und

Endopeptidasen (z. B. Metalloproteasen), die spezifische Stellen innerhalb der AS-Kette spalten (Lopez-Otin & Bond, 2008). Der nukleophile Angriff auf die Peptidbindung wird durch ein Wassermolekül vermittelt (Abbildung 2). Dabei aktiviert meist ein zweiwertiges Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ ) das Wassermolekül, aber auch Kobalt, Mangan, Nickel und Kupfer können als Übergangsmetallionen dienen (Barrett *et al.*, 2012). Aufgrund unterschiedlicher Primärstruktur der katalytischen Zentren werden die Zink-Metalloproteasen in fünf Gruppen (Metzinkine, Gluzinkine, Inverzinkine und zwei verschiedene Carboxypeptidasen) unterteilt. Die Gluzinkine besitzen ein HEXXH-Motiv, welches die ersten zwei Zink-Liganden (Histidin, H) und das katalytisch aktive Glutamat (E) umfasst. Der zweite Zink-Ligand (E) befindet sich stromabwärts des Motivs (HEXXH-(X)<sub>n</sub>-E) (Hooper, 1994; Fukasawa *et al.*, 2011). Da BoNT/A, NleD und XopG ein HEXXH-Motiv besitzen, gehören sie zu den Gluzinkinen. Eine weitere hierarchische, strukturbasierte Klassifizierung der Zink-Metalloproteasen erfolgt durch die MEROPS-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/merops/>), welche Informationen über bekannte Peptidasen sowie deren Substrate und Inhibitoren enthält. Auf Basis von statistisch signifikanten Ähnlichkeiten in der AS-Sequenz werden die Proteasen in Familien (Nummerncode) eingeordnet (Rawlings *et al.*, 2018). So gehört z. B. BoNT/A in die M (Metallo)27-Familie, NleD und XopG hingegen in die M91-Familie (Rawlings *et al.*, 2018).



**Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von Zink-Metalloproteasen.**

Das zweiwertige Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) wird durch zwei Histidine (His) und ein Glutamat (Glu) koordiniert. Bei Anlagerung eines Wassermoleküls ( $H_2O$ ) an  $Zn^{2+}$  kommt es zu dessen Polarisierung und Abgabe von einem Proton ( $H^+$ ). Das zinkgebundene  $OH^-$ -Ion greift das C-Atom der zu hydrolysierenden Peptidbindung an und spaltet sie (modifiziert nach Rassow *et al.*, 2012).

#### 1.4.1.1 Das *Clostridium*-Neurotoxin BoNT/A

Das anaerobe Bakterium *C. botulinum* produziert immunologisch verschiedene Formen von BoNT, die in sieben Serotypen (A-G) unterschieden werden (Hatheway, 1990; Lacy & Stevens, 1999). BoNT gehören zu den stärksten bekannten Giften, werden aber auch zu therapeutischen sowie kosmetischen Zwecken beim Menschen eingesetzt (Montecucco & Molgó, 2005). Die aktive Form der Toxine besteht aus einer leichten Kette (*light chain*, LC) und einer schweren Kette (*heavy chain*, HC), die über eine Disulfidbrücke verbunden sind.

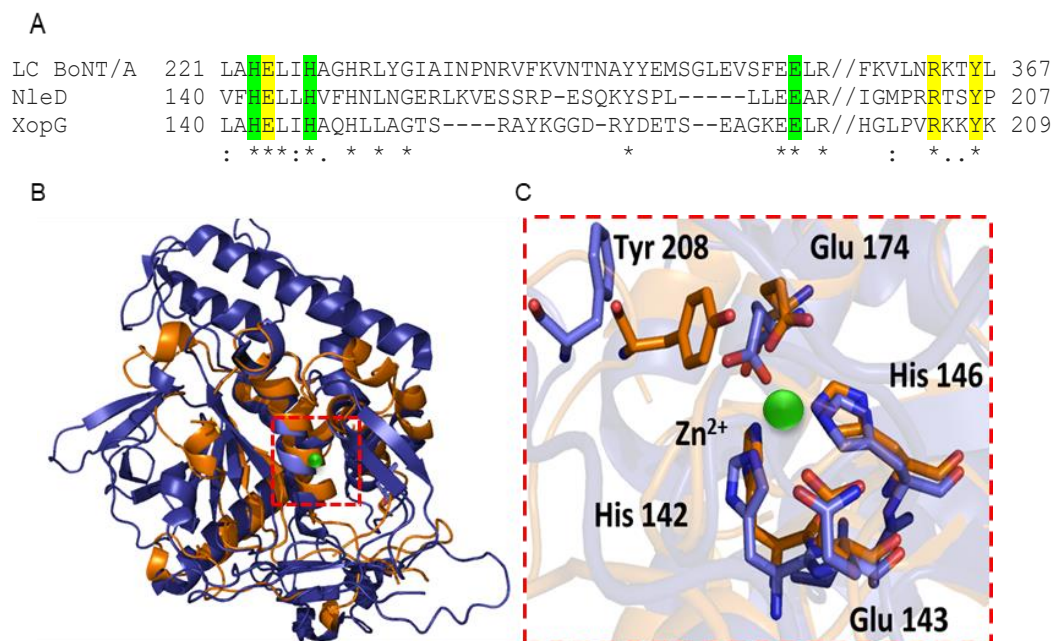
Die N-terminale, katalytische LC ist eine Zink-abhängige Metalloprotease, während die HC aus Rezeptorbindungs- und Translokationsdomäne besteht (Montecucco & Schiavo, 1995). BoNT wirken schrittweise: Mittels HC bindet das BoNT an die Zellmembran und dringt durch Endozytose in die Nervenzellen ein. Dann wird die LC pH-induziert transloziert und im Zytosol freigesetzt, wo es zur proteolytischen Spaltung der SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Komplexproteine Synaptobrevin, SNAP25 (synaptosomal-assoziiertes Protein von 25 kDa) bzw. Syntaxin kommt. Dies führt dazu, dass der Botenstoff Acetylcholin nicht mehr in den präsynaptischen Spalt exozytiert wird, was letztendlich die Signalübertragung von der Nervenzelle zum Muskel verhindert (Montecucco & Schiavo, 1994; Simpson, 2004). Alle BoNT-Serotypen zeigen eine einzigartige Substratspezifität. Mit Ausnahme von BoNT/C haben die anderen Toxine lediglich ein bestimmtes SNARE-Protein als Ziel. Interessanterweise werden die Substrate jedes Serotyps an einer anderen Stelle spezifisch hydrolysiert, z. B. spaltet BoNT/A das Zellmembran-verankerte Protein SNAP25 im C-terminalen Bereich zwischen Glutamin 197 (Q197) und Arginin 198 (R198) (Schiavo *et al.*, 1992; Blasi *et al.*, 1993; Binz *et al.*, 1994; Montecucco & Schiavo, 1995).

#### 1.4.1.2 Der EPEC-Effektor NleD

Das Gram-negative Bakterium EPEC ist ein Krankheitserreger, der sich an Darmepithelzellen anheftet und schwere Darminfektionen auslöst. Dies beruht auf der Injektion von T3E über das T3SS in die Wirtszellen, wodurch zahlreiche zelluläre Prozesse supprimiert werden (Chen & Frankel, 2005). Der T3E NleD (*non-locus of enterocyte effacement effector D*) ist eine 26 kDa Zink-Metalloprotease, die einen MAPK-Signalweg in der Wirtszelle manipuliert (Garmendia *et al.*, 2005; Baruch *et al.*, 2011; Creuzburg *et al.*, 2017). In Säugetieren gibt es drei MAPK-Familien, die c-Jun-Amino-terminale Kinase (JNK), p38 und die extrazelluläre Signal-verwandte Kinase (ERK). Baruch *et al.* (2011) zeigten, dass NleD JNK sowie p38, aber nicht ERK, an unterschiedlichen Positionen spaltet. So wurde die JNK-Spaltstelle innerhalb der Aktivierungsschleife im TPY (Threonin-Prolin-Tyrosin)-Motiv identifiziert, während die Proteolyse von p38 auf die Region der AS 187 und 213 eingegrenzt werden konnte und nicht innerhalb der Aktivierungsschleife. Letztendlich führt die Spaltung der beiden Substrate durch NleD zur Hemmung der Entzündungsreaktion während einer EPEC-Infektion (Baruch *et al.*, 2011; Creuzburg *et al.*, 2017).

### 1.4.2 Vorarbeiten zur Charakterisierung des T3Es XopG

Während für BoNT/A und NleD gezeigt wurde, dass sie aktive Zink-Metalloproteasen sind (Blasi *et al.*, 1993; Baruch *et al.*, 2011), war zu Beginn dieser Arbeit eine proteolytische Aktivität von XopG hypothetisch. Basierend auf dem katalytischen Mechanismus von Zink-Metalloproteasen sind bestimmte AS für deren proteolytische Aktivität bedeutsam. BoNT/A und NleD koordinieren  $Zn^{2+}$  durch zwei Histidine (H223 und H227<sub>BoNT/A</sub>; H142 und H146<sub>NleD</sub>) im HEXXH-Motiv und durch ein stromabwärts liegendes Glutamat (E262<sub>BoNT/A</sub>; E174<sub>NleD</sub>). Dagegen koordiniert das Glutamat (E224<sub>BoNT/A</sub>; E143<sub>NleD</sub>) im HEXXH-Motiv ein Wassermolekül, um auf diese Weise einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung zu vermitteln. Arginin 363 (R363) und Tyrosin 366 (Y366) in BoNT/A helfen, im Gegensatz zu E224, das Substrat in der aktiven Stelle zu positionieren und zu stabilisieren (Li *et al.*, 2000; Binz *et al.*, 2002; Breidenbach & Brunger, 2004; Baruch *et al.*, 2011; Kreuzburg *et al.*, 2017). Ein Vergleich der AS-Sequenzen der LC von BoNT/A, NleD und XopG zeigt, dass AS, welche für die Zink-Koordination (grün) und Proteolyse (gelb) von NleD und BoNT/A essentiell sind, auch in der AS-Sequenz von XopG (H142, H146 und Glu174 bzw. E143, R205 und Y208) konserviert vorliegen (Abbildung 3 A).



**Abbildung 3: Modellierung der 3D-Struktur von XopG.**

(A) Partielles Aminosäure (AS)-Alignment der BoNT/A-LC, NleD und XopG. Basierend auf BoNT/A und NleD sind wichtige AS zur Zink-Koordination (grün) sowie für die Proteaseaktivität (gelb) gekennzeichnet. (B) Modellierung der Kristallstruktur von XopG mittels SAM-T08 *web server* auf Grundlage der LC von BoNT/A und Überlagerung beider Kristallstrukturen (BoNT/A blau, XopG orange) mit dem koordinierten  $Zn^{2+}$  (grüne Kugel) (modifiziert nach Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). (C) Vergrößerter Ausschnitt von B (rotes gestricheltes Viereck) mit dem postulierten katalytischen Zentrum von XopG (orange, AS H142, E143, H146, E174 und Y208) und korrespondierenden AS der LC von BoNT/A (blau) (modifiziert nach Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten).

Für Strukturvergleiche wurde eine HMM (*hidden Markov model*)-basierte Kristallstruktur von XopG mittels SAM-T08 *web server* modelliert. Als Grundlage diente die Kristallstruktur der LC von BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998; Abbildung 3 B). In XopG befinden sich die AS H142, E143, H146, E174 sowie Y208 in räumlicher Nähe zueinander und könnten ein katalytisches Zentrum bilden. H142, H146 und E174 könnten  $Zn^{2+}$  koordinieren. Des Weiteren könnten E174 und Y208 eine wichtige Rolle bei der möglichen katalytischen Aktivität von XopG spielen (Abbildung 3 C).

Angesichts der Übereinstimmungen von XopG und der LC von BoNT/A wurden in Vorarbeiten Einzel- und Mehrfachmutanten von XopG generiert. So wurden die konservierten AS H142, E143, H146, E174 sowie Y208 aus XopG gegen Alanin (A), Glutamin (Q) bzw. Phenylalanin (F) ausgetauscht. Die XopG-Varianten EY<sup>-</sup> (E143Q/Y208F), HEHEY<sup>-</sup> (H142A/E143A/H146A/E174A/Y208A), HE<sup>-</sup> (H142A/E143A), E174A und Y208A lösten nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression keinen Zelltod in *C. annuum* ECW bzw. *N. tabacum* aus (Schonsky, 2013; Szczesny, Nagel, Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Somit sind die konservierten AS für die Zelltodinduktion in der Pflanze essentiell. Außerdem wurde in TXRF (*total X-ray fluorescence*)-Messungen gezeigt, dass sowohl XopG-Wildtyp (XopG<sub>WT</sub>) als auch die EY<sup>-</sup>-Variante Zink im Verhältnis 1:1 binden, während für XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> keine Zink-Bindung nachgewiesen wurde (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten; Kooperation mit A. von Bohlen, ISAS Dortmund).

Für BoNT/A wurde gezeigt, dass das humane Protein SNAP-25 gespalten wird (Blasi *et al.*, 1993; Binz *et al.*, 1994). Infolgedessen erfolgten erste Untersuchungen mit dem pflanzlichen Homolog SNAP33 aus *C. annuum* und *A. thaliana* (CaSNAP33; AtSNAP33, nach Kwon *et al.*, 2008). In Lokalisierungsstudien wurde keine Ko-Lokalisierung von XopG mit CaSNAP33 bzw. AtSNAP33 im Zellkern nachgewiesen (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). In ersten *in vitro* Protease-Assays war kein proteolytischer Abbau von CaSNAP33 bzw. AtSNAP33 durch XopG detektierbar (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten).

Dennoch könnte XopG als Zink-Metalloprotease agieren. Um potentielle Substrate von XopG zu identifizieren, wurde eine erste Hefe-2-Hybrid (Y2H, *Yeast Two-Hybrid*)-Sichtung unter Verwendung einer Paprika-cDNA-Bibliothek durchgeführt, in der XopG<sub>WT</sub> bzw. die XopG-Variante EY<sup>-</sup> als Köder eingesetzt wurde (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Diese Bibliothek repräsentiert ein cDNA-Gemisch aus nicht infizierten und mit *Xcv*-infizierten Paprikapflanzen (*C. annuum* ECW-10R und ECW-30R; Szczesny *et al.*, 2010). Die vermutlich enzymatisch inaktive EY<sup>-</sup>-Variante wurde ausgewählt, da diese basierend auf der enzymatisch-inaktiven Variante der LC von BoNT/A (E224Q/Y366F) generiert wurde und im gleichen Maße wie das WT-Protein Zink bindet, jedoch im Vergleich zu XopG<sub>WT</sub> keine Zelltodreaktion in *C. annuum* (ECW) oder *Nicotiana tabacum* nach

transienter Expression auslöst (Breidenbach & Brunger, 2004; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Daher sollten potentielle XopG-Substrate durch die XopG-Variante EY<sup>-</sup> gebunden, aber nicht proteolytisch gespalten werden. In der ersten Sichtung der cDNA-Bibliothek wurden sechs mögliche XopG-Interaktoren identifiziert (Tabelle 2; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Die schlechte Transformationseffizienz von  $8,4 \times 10^5$  KBE (Koloniebildende Einheiten) für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> und  $1,07 \times 10^6$  KBE für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> ergab vermutlich lediglich einen Teil der potentiellen XopG-Interaktoren bzw. -Substrate (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten).

**Tabelle 2: In Vorarbeiten identifizierte XopG-Interaktoren.**

Interaktor	[n]	Interaktion mit BD <sub>GAL4</sub> -XopG		Vorhergesagte Funktion	Organismus <sup>a</sup> , Akzessionsnummer
		WT	EY <sup>-</sup>		
DUF869	16	+	+	<i>Filament-like plant protein</i>	SI, XP_004242028
RIC1	6	-	+	<i>Protein RIC1 homolog/quinoprotein amine dehydrogenase</i>	SI, XP_004229879
ATM-like	5	+	+	<i>Serine/threonine-protein kinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated)</i>	SI, XP_004241490
LHW	3	+	+	<i>LONESOME HIGHWAY LIKE 3</i>	SI, XP_004242114
TDI-65	1	-	+	<i>Cysteine protease TDI-65</i>	SI, NP_001234324
KRP1	1	+	-	<i>P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily</i>	SI, XP_004234760

[n] Anzahl der gefundenen cDNA-Fragmente; + spezifische Interaktion mit BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> bzw. BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>; - keine spezifische Interaktion; Analyse und Auswertung erfolgte mittels der Datenbank *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten); <sup>a</sup> SI, *Solanum lycopersicum*.

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung möglicher pflanzlicher Substrate von XopG durch eine erneute Y2H-Sichtung mit höherer Effizienz und Verwendung der Köderproteine XopG<sub>WT</sub> sowie XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>. Interaktoren sollten spezifisch in Hefe, in der Pflanze und *in vitro*-Studien getestet werden. Verifizierte Interaktoren stellen potentielle Substrate von XopG dar und sollten daher auf ihre Proteinstabilität analysiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Methode für Protein-Interaktionsstudien *in planta*, die u. a. für den Nachweis von XopG-spezifischen Interaktionen verwendet werden sollte. So sollte ein auf AvrBs3-basiertes 2-Hybrid-System etabliert werden, das neben einem quantitativen Nachweis auch eine schnelle phänotypische Analyse der potentiellen Interaktion zweier Proteine in der Pflanze ermöglicht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Nährmedien, Zusätze und Stämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB (*Lysogeny Broth*)-Medium kultiviert (Miller, 1972). Die Inkubation der Flüssigkulturen und beimpften Nähr-Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Anzucht von *A. tumefaciens*-Stämmen erfolgte in YEB (*Yeast Extract Broth*)-Medium bei 30 °C für 48 h (Vervliet *et al.*, 1975), die Inokulation dieser Stämme in AIM (*Agrobacterium* Infiltrationsmedium). Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte bei 30 °C in Vollmedium (YPD) oder in verschiedenen supplementierten Minimalmedien (YNB), wie in Tabelle 5 angegeben, wobei zur Selektion auf Auxotrophiemarker die entsprechende Aminosäure/Nukleinbase nicht zugesetzt wurde (Gietz & Schiestl, 2007). Die Medienzusammensetzung ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Alle verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht hitzebeständige Medienzusätze wurden sterilfiltriert. Zur Herstellung von Nährplatten wurde 1,5 % (w/v) Agar den Bakterienmedien bzw. 2 % (w/v) Agar den Hefemedien zugegeben. Für die selektive Kultivierung von Bakterien wurden Flüssigmedien bzw. Nährplatten mit Antibiotika in unter Tabelle 4 angegebener Konzentration versetzt. Zur Blau-Weiß-Selektion ( $\beta$ -Galactosidase-Aktivität) wurde dem Festmedium 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) zugesetzt (Ausubel *et al.*, 1995).

**Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien.**

Organismus	Medium	Zusammensetzung
<i>E. coli</i>	<i>Lysogeny Broth</i> (LB)	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Yeast Extract Broth</i> (YEB)	0,5 % (w/v) Bakto-Fleisch-Extrakt; 0,1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,2 % (v/v) 1 M MgSO <sub>4</sub> ; pH 7,2
	<i>Agrobacterium</i> Infiltrationsmedium (AIM)	10 mM MES (pH 5,4), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 150 $\mu$ M Acetosyringon
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (YPD)	2 % (w/v) Bakto-Pepton; 1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 2 % (v/v) Glukose;
	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB)	0,67 % (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base w/o amino acids</i>

**Tabelle 4: Verwendete Medienzusätze.**

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml (Nährplatte) 50 µg/ml (Flüssigkultur)
Chloramphenicol (Cam)	5 µg/ml
Gentamycin (Gent)	15 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml ( <i>E. coli</i> ) 100 µg/ml ( <i>A. tumefaciens</i> )
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 µg/ml
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	40 µg/ml

**Tabelle 5: Konzentrationen von Aminosäuren und Nukleinbasen.**

Aminosäuren/Nukleinbasen	Konzentration
L-Adenin-Hemisulfat	200 mg/l
L-Arginin	200 mg/l
L-Histidin	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Leucin	1000 mg/l
L-Lysin	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Uracil	200 mg/l

In Tabelle 6 sind die verwendeten Bakterien- und Hefestämme aufgelistet. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien bei -80 °C wurden *E. coli*- bzw. *Agrobacterium*-Suspensionen mit 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt.

**Tabelle 6: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.**

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> OneShot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ElectroMAX™ DH10B™	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>a-</i> <i>ra</i> D139Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt
BL21-CodonPlus-RIL	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> ( <i>rB-</i> <i>mB-</i> ) <i>dcm+</i> <i>Tetr</i> <i>gal</i> Δ <i>endA</i> <i>Hte</i> [ <i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> <i>Cam</i> <sup>R</sup> ]	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58-Derivat, Ti-Plasmid pMP90 (pTiC58-Derivat), Nopalinsynthesegene, Rif <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	(Holsters <i>et al.</i> , 1980)
<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4a	MATa <i>trp1</i> -Δ901 <i>leu2-3,112</i> 901 <i>ura3-52</i> <i>his3</i> -Δ200 <i>gal4</i> Δ <i>gal80</i> Δ <i>GAL2-ADE2</i> <i>LYS2::GAL1-HIS3</i> <i>met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)

<sup>R</sup>-Resistenz

### 2.1.2 Oligonukleotide

Die Tabelle 15 der verwendeten Oligonukleotide ist in Anhang 6 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (Köln) bezogen.

### 2.1.3 Vektoren und Plasmide

Die Tabelle 16 der verwendeten Vektoren und Plasmide ist in Anhang 6 aufgeführt.

### 2.1.4 Pflanzenmaterial

Es wurden Tabakpflanzen der Linien *Nicotiana benthamiana*, Bs3-transgene *N. benthamiana* (Schreiber *et al.*, 2015) und *N. tabacum* verwendet. Diese resistenten *N. benthamiana*-Pflanzen zeichnen sich durch das Vorhandensein des Resistenzgens Bs3 mit nativem Promotor aus. Von Paprika (*C. annuum*) wurden Pflanzen der nahezu isogenen Linien ECW (*Early Cal Wonder*) verwendet (Minsavage *et al.*, 1990). Die Anzucht von *N. benthamiana* und *N. tabacum* erfolgte bei 23 °C/19 °C (Tag/Nacht) und für *C. annuum*, wenn nicht anders beschrieben, bei 25 °C/19 °C in vollklimatisierten Gewächshauskammern mit einer 16-stündigen Lichtperiode und einer relativen Luftfeuchte von 40 % bis 60 %.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *S. cerevisiae*

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mithilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich), sowie die Plasmid-Isolierung aus *S. cerevisiae* unter Einsatz des *EZ Yeast™ Plasmid Prep Kit* (*G-Biosciences*, St. Louis, USA) jeweils nach Herstellerprotokoll. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.2.1.2 Isolierung von RNA aus *C. annuum* und *S. lycopersicum*

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen wurde das *RNeasy Plant Mini Kit* (*Qiagen*, Hilden) verwendet. Sowohl für *C. annuum* als auch *S. lycopersicum* wurden 16 Blattscheiben (Durchmesser 0,2 cm; Korkbohrer 2) geerntet, was einem Gewicht von ca. 50 mg entspricht. Die Blattscheiben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels Mörsers homogenisiert. Die enthaltene RNA wurde laut Herstellerprotokoll isoliert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Um gezielte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide und thermostabiler DNA-Polymerasen genutzt. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit Heizdeckel (*FlexCycler*, Analytik Jena) durchgeführt. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit anschließender Klonierung wurde die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich) mit *proofreading*-Funktion und der zugehörige *Phu*-Puffer verwendet. Zur Durchführung von Kolonie-PCR-Reaktionen wurde eine laborintern hergestellte *Taq* (*Thermus aquaticus*)-Polymerase mit 10×PCR-Puffer [100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) Gelatine] genutzt. In Abhängigkeit der DNA-Fragmentgröße und den jeweiligen Oligonukleotiden wurden die *annealing*-Temperatur X sowie die Elongationszeit Y angepasst. Der Reaktionsansatz sowie die PCR-Programme sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Reaktionsansatz und PCR-Programm.**

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration	Programm
<b>Phusion-PCR</b>			
5×HF-Puffer	4 µl	1×	98 °C 3 min
2 mM dNTPs	1 µl	0,2 mM	98 °C 15 s
1 µM <i>forward</i> Oligonukleotid	3 µl	150 nM	X °C 15 s
1 µM <i>reverse</i> Oligonukleotid	3 µl	150 nM	72 °C Y s
<i>Phusion</i> -Polymerase	0,2 µl	0,4 U	72 °C 1 min
<i>template</i>	x µl	10-50 ng DNA	4 °C ∞
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl		
<b>Kolonie-PCR</b>			
10× <i>Taq</i> -Puffer	2 µl	1×	95 °C 4 min
2 mM dNTPs	2 µl	0,2 mM	95 °C 30 s
1 µM <i>forward</i> Oligonukleotid	3 µl	150 nM	X °C 30 s
1 µM <i>reverse</i> Oligonukleotid	3 µl	150 nM	72 °C Y s
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	Unbekannt (Eigenproduktion)	72 °C 1 min
<i>template</i>	-	Zellmaterial <i>E. coli</i> -Einzelkolonie	12 °C ∞
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl		

### 2.2.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich) nach Herstellerangaben und unter Verwendung von oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotiden genutzt. Dabei wurde 2 µg RNA für die Synthese eingesetzt und die erhaltene cDNA 1:50 verdünnt.

#### 2.2.4 Quantitative reverse transcription-PCR

Für *quantitative reverse transcription*-PCR (qRT-PCR)-Reaktionen wurde der *ABsolut Blue QPCR SYBR Green ROX Mix* (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich) verwendet. Durch Nutzung von *SYBR Green I* als interkalierender Farbstoff wurde in Echtzeit die Zunahme des Fluoreszenzsignals, welche proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts ist, mittels des *CFX Connect™ Real-Time System* (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München) verfolgt. Die Erstellung der Oligonukleotide erfolgte unter verschiedenen Kriterien und mithilfe des *Biocalculator* (<http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/>). Die *annealing*-Temperatur der einzelnen Nukleotidpaare wurde für 57 °C optimiert und die Länge der Amplifikate auf 250 bis maximal 500 nt begrenzt. Zudem wurden die Oligonukleotide nach Möglichkeit über eine bestehende Intron-Exon-Grenze gelegt, um eine Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden.

Reaktionsansatz:            8 ng cDNA  
                                  10 µl SYBR-Green I-Mix  
                                  0,14 µM *forward* Oligonukleotid  
                                  0,14 µM *reverse* Oligonukleotid  
                                  ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Programm:	Denaturierung	95 °C 15 min	
	Denaturierung	95 °C 15 s	} 60 Zyklen
	Anlagerung	57 °C 15 s	
	Elongation	72 °C 25 s	
	Messung der Fluoreszenz		

Die Spezifität der Oligonukleotid-Paare wurde durch Schmelzkurvenanalysen (in 0,5 °C-Schritten für jeweils 10 s von 50 °C bis 100 °C) überprüft. Die Effizienz der PCR-Amplifizierung wurde durch Standardkurven verschiedener Verdünnungsstufen der cDNA (1:5, 1:25, 1:125 und 1:625) kontrolliert. Für die Bestimmung der relativen Transkriptmenge wurden  $C_t$  (*cycle threshold*)-Werte von technischen Duplikaten von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten herangezogen. Zur Normalisierung wurden die zwei Referenzgene PHD (*PHD finger family protein*) und UHC (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 1 protein*) aus *C. annuum* verwendet (Müller *et al.*, 2015).

### 2.2.5 Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer Nanodrop®ND-1000 (*Fisher Scientific-Germany GmbH*, Schwerte). Dabei wurde die UV-Absorption der Probe bei 260 nm gemessen ( $OD_{260} = 1,0$  entspricht 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA).

### 2.2.6 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Die DNA-Spaltung erfolgte mithilfe von Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) nach Herstellerangaben (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich; *New England BioLabs GmbH*; Frankfurt am Main). Im Anschluss wurde der Restriktionsverdau der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) überprüft.

### 2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- oder RNA-Proben wurden mit 5×DNA-Probenpuffer [50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) SDS (*sodium dodecyl sulfate*); 0,05 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und mittels horizontaler Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1×TAE (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA) für DNA und 1×TBE (90 mM Tris, pH 8,0; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA) für RNA. Zur Herstellung 1 %iger (w/v) Agarosegele wurde Agarose in 1×TAE bzw. 1×TBE gelöst und Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) zugesetzt. Als Größenstandard wurde eine 1 Kb-DNA-Leiter (*GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*; *Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich) verwendet. Die Visualisierung der aufgetrennten Fragmente erfolgte unter UV-Licht im Transilluminator (*Alphalmager®*, *Alpha Innotech Corp.*, San Leandro, USA).

### 2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzreaktion erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (*Sanger et al.*, 1977) und wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz).

### 2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen

#### 2.2.9.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur (10 ml LB-Medium) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde eine Hauptkultur (meist 1 l LB-Medium) mit der Vorkultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,5 angezogen. Die Bakterienkultur wurde für 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss durch Zentrifugation (4000 rpm; 10 min) bei 4 °C geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 1/3 Vol. gekühltem

Puffer TFBI [30 mM KOAc; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8] resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1/25 Vol. kaltem Puffer TFBI [10 mM NaMOPS, pH 7; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin] resuspendiert und die aliquotierten Zellen bei -80 °C gelagert.

### **2.2.9.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Zellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- bzw. *A. tumefaciens*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur (10 ml LB- bzw. YEB-Medium) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur (meist 1 l LB- bzw. YEB-Medium) mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 bei entsprechender Temperatur kultiviert. Die Bakterienkultur wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 1/3 Vol. gekühltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Daraufhin wurde das Bakterienpellet in 1/10 Vol. gekühltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und die aliquotierten Zellen bei -80 °C gelagert.

### **2.2.9.3 Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen**

Die Anzucht des *S. cerevisiae*-Stammes PJ69-4A erfolgte im YEP-Medium bei 30 °C. Die Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurde nach Gietz und Schiestl (2007) durchgeführt. Im Anschluss wurden die kompetenten Zellen für mindestens 4 bis zu 24 h bei -20 °C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C in FCC-Lösung [5 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) DMSO].

## **2.2.10 Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA**

### **2.2.10.1 Chemische Transformation von *E. coli***

Zur Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA vermischt. Nach einer Inkubation von 15 bis 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 45 s. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 500 µl LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Selektion auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die LB-Nährplatten wurden für 12 bis 24 h bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.10.2 Chemische Transformation von *S. cerevisiae***

Die Transformation in chemisch kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach Gietz und Schiestl (2007). Anschließend wurden die transformierten Zellen auf selektivem Medium ausplattiert und für 3 bis 6 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 2.2.10.3 Elektroporation von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Zur Transformation wurden elektrokompente *E. coli*- bzw. *A. tumefaciens*-Zellen mit Plasmid-DNA gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine 2 mm-Elektroporationsküvette überführt und mittels elektrischen Impulses im *MicroPulser™ Electroporator* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) transformiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 250 µl LB- bzw. YEB-Medium und die Inkubation für 1 h bei 37 °C bzw. 30 °C. Die Bakterien wurden auf LB- bzw. YEB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und 1 (*E. coli*) bis 2 Tage (*A. tumefaciens*) bei 37° C bzw. 30 °C inkubiert.

### 2.2.11 *Blunt end*-Klonierung in pUC57 (Bsal')

Um amplifizierte DNA-Fragmente (Module) in den Vektor pUC57 (Bsal') zu klonieren, erfolgten Restriktion und Ligation in einem Reaktionsansatz (*cut-ligation*). Hierbei wurden *blunt end*-Restriktionsenzyme (z. B. SmaI; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) und die T<sub>4</sub> DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) verwendet. Für die *cut-ligation* wurde ein Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (*FlexCycler*, Analytik Jena) genutzt.

Reaktionsansatz:     5,5 µl PCR-Produkt  
                            50 ng pUC57 (Bsal')  
                            2 µl 10×*Tango Buffer*  
                            2 µl 10 mM ATP  
                            0,5 µl SmaI (10 U)  
                            1 µl T<sub>4</sub> DNA Ligase (30 WU)  
                            ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Programm:	Restriktion	30 °C 10 min	} 6-10 Zyklen
	Ligation	16 °C 10 min	
	Restriktion	30 °C 20 min	
	Inaktivierung	65 °C 20 min	
	Kühlen	12 °C ∞	

Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Da sich die MCS (*multiple cloning site*) des pUC57 (Bsal')-Vektors im *lacZ*-Gen (kodiert für β-Galaktosidase) befindet, wurden positive Transformanden durch Blau-Weiß-Selektion auf Festmedium mit X-Gal identifiziert. Weiße Transformanden wurden *via* Kolonie-PCR getestet und erhaltene Plasmide mittels Sequenzierung überprüft.



### 2.2.12 Golden-Gate-Klonierung

Die *Golden-Gate* (GG)-Klonierung ermöglicht die Assemblierung von bis zu neun Modulen in einem Zielvektor und in gerichteter Reihenfolge (Engler & Marillonnet, 2014). Bei dieser Methode erfolgte eine *cut-ligation* unter Verwendung von Typ II-Restriktionsenzymen (z. B. Bsal; *New England BioLabs GmbH*; Frankfurt am Main) im Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (*FlexCycler*, Analytik Jena), wobei in dieser Arbeit das Restriktionsenzym Bsal genutzt wurde. Für die Generierung von GG-Modulen wurden Oligonukleotide genutzt, bei denen das PCR-Produkt von Bsal-Restriktionsschnittstellen flankiert wird.

Reaktionsansatz:     50 ng 1-8 GG-Module (pUC57 (Bsal<sup>-</sup>)-Derivate)  
                           50 ng Zielvektor  
                           2 µl 10×*CutSmart Buffer*  
                           2 µl 10 mM ATP  
                           1 µl Bsal (10 U)  
                           1 µl T<sub>4</sub> DNA Ligase (30 WU)  
                           ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Programm:	Restriktion	37 °C 10 min	} 6-10 Zyklen
	Ligation	16 °C 10 min	
	Restriktion	37 °C 20 min	
	Inaktivierung	65 °C 20 min	
	Kühlen	12 °C ∞	

Der Reaktionsansatz wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Im Folgenden wurden die erhaltenen Transformanten *via* Kolonie-PCR bzw. die isolierten Plasmide mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

### 2.2.13 Klonierung mittels GATEWAY®-System

Die GATEWAY®-Klonierung-Technologie basiert auf der Eigenschaft des Bakteriophagen λ zur spezifischen Rekombination. Für die Klonierung wurden zuerst DNA-Fragmente mittels GG in den Donorvektor pEGG (WS), einem pENTR/D-Derivat, kloniert. In diesem Vektor befinden sich zwei *attL-sites* (*attachment sites*), die das zu rekombinierende DNA-Fragment flankieren und eine effiziente Klonierung, basierend auf der LR-Rekombination, in GATEWAY®-Zielvektoren mit *attR-sites* (z. B. Hefe-Expressionsvektoren) ermöglichen. Für die LR-Reaktion wurde der *Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix* nach Herstellerangaben verwendet (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich). Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und

anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Daraufhin wurden die Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalysen sowie Sequenzierung überprüft.

Reaktionsansatz: 150 ng Ausgangsvektor  
150 ng Zielvektor  
1 µl Gateway® LR Clonase® Enzyme mix  
ad 10 µl 1×TE-Puffer [0,1 M EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0]

#### **2.2.14 *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression *in planta***

*Agrobacterium*-Stämme mit entsprechenden Expressionsplasmiden wurden auf selektiven YEB-Festmedien für 1 bis 2 Tage bei 30 °C angezogen und zur Inokulation im AIM resuspendiert. Die gewünschte Zelldichte wurde photometrisch (OD<sub>600</sub>) eingestellt und die Suspension wurde mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseiten von Versuchspflanzen inokuliert. Um pflanzliches Gen-*silencing* zu unterdrücken, wurde zusätzlich ein *Agrobacterium*-Stamm verwendet, welcher die transiente Expression des viralen *silencing*-Inhibitors p19 vermittelt. Für die transiente Ko-Expression *via Agrobacterium* wurden bis zu vier Stämme vor der Inokulation zu gleichen Teilen bzw. in beschriebenen Verhältnissen (2:1:1 oder 2:1:1:1) gemischt. Für Immunoblot-Analysen wurden aus infizierten Blättern zwei bis drei Blattscheiben (Durchmesser 0,9 cm; Korkbohrer Größe 5) 1 bis 3 Tage nach der Inokulation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.15 Virus-induziertes Gen-*silencing***

In dieser Arbeit wurden Virus-induzierte Gen-*silencing* (VIGS)-Experimente mittels *tobacco rattle virus* (TRV) in *C. annuum* durchgeführt. Bei dieser Methode ist das Virusgenom, bestehend aus TRV-RNA1 und TRV-RNA2, auf zwei Binärvektoren (pTRV1, pTRV2) zur transienten Transformation *via Agrobacterium* lokalisiert (Liu *et al.*, 2012). Der Vektor pTRV1 kodiert vier virale Proteine: RNA-abhängige RNA-Polymerase, *movement*-Protein, Cystein-reiches Protein und selbstschneidendes Ribozym. Der pTRV2-Vektor kodiert das virale Hüllprotein. Die Integration der *transfer* (T)-DNAs beider Plasmide in das pflanzliche Genom ermöglicht die Replikation der Viruskomponenten und die Assemblierung von Viruspartikeln, was in einer systematischen Ausbreitung des Virus in der Pflanze resultiert. Bei der Transkription des *silencing*-Fragmentes wird virale mRNA synthetisiert, die komplementär zu der endogenen pflanzlichen mRNA ist. Dies führt zu einer Bildung von doppelsträngiger mRNA, die das post-transkriptionelle Gen-*silencing* auslöst.

Zur Generierung der jeweiligen *silencing*-Konstrukte wurde das VIGS-Tool von *Sol Genomics* (<http://solgenomics.net/>) verwendet. Einen Tag vor der Infektion wurden die

ECW-Paprikapflanzen in eine Gewächshauskammer überführt, mit einer Temperatur zwischen 20 °C bis 22 °C und einer 16-stündigen Lichtperiode. Für die Analyse wurden die entsprechenden *Agrobacterium*-Stämme, welche die Plasmide pTRV1 oder pTRV2a::*CaATM-like*, pTRV2a::*CaWD40* bzw. pTRV2a::*CaJoka2* tragen, mit einer OD<sub>600</sub> von 0,8 im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Keimblätter von je fünf ECW-Paprikapflanzen inokuliert. Die fünf Kontrollpflanzen wurden zugleich mit *Agrobacterium*-Stämmen behandelt, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a::*gfp* tragen, sodass die GFP-kodierende Sequenz durch den Virus verbreitet wurde. Die behandelten ECW-Paprikapflanzen wuchsen 7 bis 8 Wochen unter den angebenen Bedingungen in der Gewächshauskammer. Daraufhin erfolgte eine transiente Expression *via Agrobacterium* von *gfp-xopG<sub>WT</sub>* oder *gfp* unter Kontrolle des 35S-Promotors in den jeweiligen Versuchspflanzen. Die XopG-vermittelte Zelltodinduktion wurde 3 Tage nach Inokulation phänotypisch mithilfe eines Lichttisches analysiert und dokumentiert. Für die RNA-Isolierung (2.2.1.2) wurden pro Pflanze je 16 Blattscheiben (Durchmesser 0,2 cm; Korkbohrer Größe 2) geerntet. Die isolierte RNA wurde für die nachfolgende cDNA-Synthese (2.2.3) eingesetzt, umgeschrieben und mittels qRT-PCR (2.2.4) die relative Transkriptmenge der Interaktoren untersucht.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinextraktion aus verschiedenen Organismen

Für die Proteinextraktion aus infizierten Blättern wurden zwei bis drei Blattscheiben (Durchmesser 0,9 cm; Korkbohrer Größe 5) geerntet. Für den Aufschluss wurde das Blattmaterial im gefrorenen Zustand mittels Mörser homogenisiert und anschließend mit 100 µl 2xLaemmli-Puffer [125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Die Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte nach Kushnirov (2000). Hierfür wurden die zu untersuchenden *S. cerevisiae*-Stämme für zwei Tage in entsprechenden Flüssigkulturen bei 30 °C angezogen und 2,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten der Zellen pelletiert. Zum Schluss wurden die Proben mit 100 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt. Für Proteinextrakte aus *E. coli* wurden Zellysate bzw. Zellpellets mit 50 µl 2xLaemmli-Puffer ersetzt. Alle Proteinextrakte wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Probenvolumina betragen 12-25 µl und als Größenstandard diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V und

25 mA pro Polyacrylamidgel in 1xTANK-Puffer [25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0.1 % (w/v) SDS]. Verwendet wurden Polyacrylamidgele, die sich aus Sammelgel (4 %ig) und Trenngel (10 bis 12 %ig) zusammensetzen (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.**

Komponente	8-12 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	26,6-40 % (v/v)	13,3 % (v/v)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	250 mM	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	125 mM
10 % (w/v) SDS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	0,025 % (v/v)	0,025 % (v/v)

### 2.3.3 Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Zum Nachweis von Proteinen erfolgte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ein Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (*Whatman® Protran®*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Der Proteintransfer wurde mittels *semidry-blot*-Apparatur (*Owl Semi-Dry Blotter*, *Daigger Scientific*, Vernon Hills, USA) in 1xTransfer-Puffer [20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol] für 90 min und 1,2 mA pro cm<sup>2</sup> durchgeführt. Mittels reversibler Ponceau-Färbung wurde die Effizienz des Proteintransfers überprüft. Hierfür wurde die Membran in Ponceau-Lösung [0,2 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure] für 1 min inkubiert und durch Spülen der Membran mit Wasser wieder entfärbt. Um freie Bindungsstellen von Proteinen auf der Oberfläche zu sättigen, wurde die Membran für 1 h in 1xTBST [10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20] mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in 1xTBST gewaschen und danach mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tabelle 9) über Nacht oder 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils für 10 min in 1xTBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 9) für 2 bis 3 h bei RT inkubiert. Folgend wurde die Membran viermal für jeweils 5 min in 1xTBST gewaschen und die Proteinsignale mittels ECL-Reaktion (*enhanced chemoluminescence*) detektiert. Hierbei wurde die Membran für 1 min mit ECL-Lösung [100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 225 mM para-Cumarsäure; 1,25 mM 3-Aminophtalhydrazid; 0,1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die katalysierte Chemolumineszenzreaktion durch Belichtung eines Röntgenfilms (*Kodak® BioMax® light film*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) detektiert. Bei Reinkubation der Membran mit einem zweiten spezifischen Primär-Antikörper (Tabelle 9) erfolgten zuvor mehrere Waschschrte und eine zusätzliche Inkubation in 1xTBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver, um spezifische Antikörperkomplexe der ersten Inkubation zu entfernen. Molekulare Massen der jeweiligen Fusionsproteine sind in Kilodalton in Tabelle 17 (Anhang 6) aufgezeigt.

**Tabelle 9: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.**

Primäre Antikörper	Verdünnung <sup>a</sup>	Hersteller	Sekundäre Antikörper <sup>b</sup> (Hersteller)
α-c-Myc	1:200	Santa Cruz, Heidelberg	α-Kaninchen (GE Healthcare, Pittsburgh, USA)
α-GFP	1:2000	Life Technologies,	α-Kaninchen
α-GFP	1:2000	Roche, Mannheim	α-Maus (GE Healthcare, Pittsburgh, USA)
α-GST	1:40000	GE Healthcare, Freiburg	α-Ziege (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
α-Strep <sup>c</sup>	1:5000	Merk KGaA, Darmstadt	-
α-xopG	1:5000	621 <i>final bleeding</i> Peptidantikörper (unpublizierte Daten)	α-Kaninchen
α-BD <sub>GAL4</sub>	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	α-Kaninchen
α-HA	1:2000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	α-Ratte (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

<sup>a</sup> Verdünnung in 1×TBST; <sup>b</sup> 1:10000 Verdünnung in 1×TBST; <sup>c</sup> Strep Tag® II Antibody HRP Conjugate

## 2.4 Methoden für Interaktionsstudien

### 2.4.1 Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Sichtung erfolgte nach dem Prinzip des MATCHMAKER-GAL4-Hefe-Dihybrid-Systems und Herstellerangaben (Clontech, Heidelberg). In dieser Arbeit wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A genutzt, der die Reportergene *HIS3*, *ADE2* sowie *lacZ* unter der Kontrolle verschiedener GAL4-bindenden Promotoren trägt (James *et al.*, 1996). Liegt demnach ein aktiver GAL4-Transkriptionsfaktor, bestehend aus GAL4-DNA-Bindedomäne (BD<sub>GAL4</sub>) und GAL4-Aktivierungsdomäne (AD<sub>GAL4</sub>), vor, werden die entsprechenden Reportergene induziert, was in einem Wachstum der Ko-Transformanden auf den jeweiligen Selektionsmedien (ohne Adenin, Histidin; mit X-Gal) resultiert. So erlaubt das *ADE2*-Reportergen eine sehr stringente Selektion (starke Interaktionen detektierbar), während die Selektion mit dem *HIS3*-Reportergen weniger stringent (weniger starke Interaktionen detektierbar) ist. Die verwendete cDNA-Bibliothek wurde aus Paprikapflanzen-RNA generiert. Hierfür wurde ein Blattmaterial-Gemisch nicht infizierter und mit *Xcv*-infizierter Paprikapflanzen (ECW-10R und ECW-30R) genutzt (Szczyzny *et al.*, 2010). In zwei unabhängigen Ansätzen wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit je 10 µg der Plasmid-DNA der cDNA-Bibliothek und 10 µg der Plasmid-DNA der jeweiligen Köderplasmide (BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> bzw. BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY-</sub>), wie in 2.2.10.2 beschrieben, ko-transformiert. Der Transformationsansatz wurde für 3 h in YEP-Medium bei 30 °C inkubiert und anschließend zur Selektion auf das Reportergen *ADE2* auf Selektivmedium ohne die Zugabe der Aminosäure Adenin plattiert und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Transformationseffizienz, wobei eine 10<sup>-4</sup>-Verdünnung des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium ohne Leucin und

Tryptophan plattiert und nach Inkubation von 2 Tagen bei 30 °C ausgezählt wurde. Die erhaltenen Ko-Transformanten der Adenin-Selektion wurden erneut auf Selektivmedium (ohne Adenin, Leucin und Tryptophan) übergestrichen und die Beuteplasmide der positiven Ko-Transformanten isoliert (2.2.1.1). Anschließend wurden 2 µl der isolierten Plasmid-DNA in elektrokompetente *E. coli*-Zellen (ElectroMAX™ DH10B™; Life Technologies GmbH; Darmstadt) transformiert (2.2.10.3) und die Plasmid-DNA erneut isoliert. Die Beuteplasmide wurden erneut auf Vermittlung spezifischer Interaktion mit BD<sub>GAL4</sub>-Xop<sub>GWT</sub> bzw. BD<sub>GAL4</sub>-Xop<sub>GEY</sub> in *S. cerevisiae*-Zellen untersucht. Um unspezifische Interaktionen auszuschließen, wurde als Kontrolle das Köderkonstrukt BD<sub>GAL4</sub>-ev (kodiert ausschließlich BD<sub>GAL4</sub>) mitgeführt. Für den Spezifitätstest wurden je zwei Ko-Transformanten in Flüssigmedium bei 30 °C für 1 bis 2 Tage angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf Selektivmedien (ohne Leucin und Tryptophan bzw. ohne Leucin, Tryptophan und Adenin) getropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert und Interaktionen zwischen Beute- und Köderproteinen anhand des Wachstums beurteilt. Die cDNA-Fragmente der Beuteplasmide, die spezifisch mit BD<sub>GAL4</sub>-Xop<sub>GWT</sub> bzw. BD<sub>GAL4</sub>-Xop<sub>GEY</sub> interagierten, wurden darauffolgend sequenziert. Die Analyse und Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels der Datenbanken *Sol Genomics* (<http://solgenomics.net/>) und *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 2.4.2 Interaktionsstudien mittels Y2H-System

Für Interaktionsstudien mittels Y2H-System wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden, wie unter 2.2.10.2 beschrieben, ko-transformiert. Für den Spezifitätstest wurden je zwei Ko-Transformanten getestet. Hierfür wurden die jeweiligen Hefestämme in Flüssigmedium bei 30 °C für 1 bis 2 Tage angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf verschiedene Selektivmedien getropft. Als Transformationskontrolle diente das Wachstum auf dem Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan. Das Wachstum auf den Selektionsmedien ohne Leucin, Tryptophan und Histidin bzw. ohne Leucin, Tryptophan und Adenin diente zum Nachweis von schwachen bzw. starken Interaktionen. Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurde zusätzlich das Wachstum der BD<sub>GAL4</sub>-Ko-Transformanten auf den Selektionsmedien analysiert. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Der Synthesenachweis der Fusionsproteine erfolgte mittels Immunoblot (2.3.1; 2.3.2; 2.3.3).

### 2.4.3 Interaktionsstudien mittels GST-Pull-down

Für Interaktionsstudien mittels GST-Pull-down wurden die rekombinanten Proteine von GST, den GST-Interaktoren, XopG<sub>WT</sub>-Strep, XopG<sub>EY</sub>-Strep, XopG<sub>HEHEY</sub>-Strep und GFP-Strep in *E. coli*-Zellen (BL21-CodonPlus-RIL) hergestellt. Die *E. coli*-Zellen wurden in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 130 rpm angezogen. Am Folgetag wurde eine Hauptkultur (150 ml) auf eine OD<sub>600</sub> 0,05 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 bei 37 °C und 130 rpm angezogen. Die Expression der Fusionskonstrukte erfolgte durch Induktion mit 0,5 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; Endkonzentration 1 mM) und 96 %igen Ethanol (Endkonzentration 3 %) für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 rpm; 10 min; 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml Na-Phosphat-Puffer [12,5 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0; 12,5 mM NaCl; 0,0125 % (v/v) DMF] resuspendiert. Die Resuspension wurde mit 60 µl Lysozym-Lösung (50 mg/ml) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch viermalige Frost-Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff und im 32 °C Wasserbad. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurde der Suspension je 120 µl DNaseI (1 mg/ml) und RNaseA (1 mg/ml) zugegeben und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 20000×g und 4 °C, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand (Zellysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Vom *E. coli*-Zellysat wurden 50 µl entnommen, mit 50 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Zu 1,3 ml Zellysat, welches GST oder GST-Fusionsproteine enthielt, wurden 50 µl Glutathion-Sepharose 4B (*GE Healthcare Europe GmbH*, Freiburg) zugegeben und über Nacht bei 4 °C über Kopf rotierend immobilisiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min, der Überstand wurde verworfen und die Glutathion-Sepharose mit kaltem Na-Phosphat-Puffer gewaschen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Daraufhin wurden je 600 µl Zellysat, welches bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurde und Strep-Fusionsproteine enthielt, mit der Glutathion-Sepharose versetzt und für 1,5 h bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten vier Waschschriffe mit kaltem Na-Phosphat-Puffer. Die Elution spezifisch gebundener Proteine erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer [50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM GSH (reduziertes Glutathion)] und einer Inkubation für 2,5 h bei 10 °C und 750 rpm. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (4000 rpm, 1 min, 4 °C). Der Überstand (Eluat) wurde mit 50 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Mittels Immunoblot (2.3.2; 2.3.3) wurden die Zellextrakte und die Eluate analysiert.

### 2.4.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (LSM)

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM780 und die Software Zen (Carl Zeiss) genutzt. Nach

*A. tumefaciens*-vermittelter transienter Synthese der entsprechenden Fusionsproteine wurde das Blattmaterial von *N. benthamiana* nach 1 bis 2 Tagen analysiert. Die DNA-Visualisierung pflanzlicher Zellkerne erfolgte nach Infiltration von 0,01 %iger DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Lösung 1 h vor der Mikroskopie. Für Lokalisierungs- und Ko-Lokalisierungsstudien wurde ein GFP (grün fluoreszierenden Protein)- oder mOrange2-Epitop verwendet.

#### 2.4.5 Interaktionsstudien mittels Ko-Immünpräzipitation

Gene der zu untersuchenden Interaktoren wurden *Agrobacterium*-vermittelt ko-exprimiert (2.2.14) und 2 Tage nach Inokulation je 1 g Blattmaterial geerntet. Mittels Mörser wurde das Blattmaterial im gefrorenen Zustand homogenisiert, mit 2 ml YS Extraktionspuffer [50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 0.2 % (v/v) NP40; 1 Tablette *protease inhibitor cocktail pro 50 ml (complete, EDTA-free; Roche)*] versetzt und durch vortexen gemischt. Zelltrümmer wurden durch zweimalige Zentrifugation (9000×g, 10 min 4 °C; 14000 rpm, 10 min, 4 °C,) sedimentiert und der Überstand (Totalextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorff, Hamburg) überführt. Für die Totalextrakt-Probe wurden 50 µl vom Totalextrakt mit 50 µl 2×Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 15 µl *Pierce™ Anti-c-Myc Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)* zu 1,3 ml Totalextrakt gegeben und für 2 h bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten vier Waschschrte mit eiskaltem YS Wasch-Puffer [50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 0.2 % (v/v) NP40]. Gebundene Proteine wurden durch Kochen für 10 min in 50 µl 4×Laemmli [250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40 % (v/v) Glycerin; 8 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau] von den *magnetic beads* eluiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Totalextrakte und Eluate der Ko-IP mittels Immunoblot (2.3.2; 2.3.3).

#### 2.4.6 Reporter-genaktivierungsstudien

Zur Analyse der *uidA*-Reporter-genaktivierung wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den entsprechenden *Bait*- bzw. *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt in Blätter von drei *N. benthamiana*-Pflanzen ko-inokuliert. Nach erfolgter transienter Expression *via Agrobacterium* (2.2.14) wurde das Blattmaterial 2 bis 3 Tage nach Inokulation für den quantitativen GUS (β-Glucuronidase)-Assay bzw. für die qualitative GUS-Färbung geerntet.



### 2.4.6.1 Quantitative GUS-Assay

Für den quantitativen GUS-Assay wurden je zwei Blattscheiben (Durchmesser 0,9 cm; Korkbohrer Größe 5) geerntet. Im gefrorenen Zustand wurde das Blattmaterial mittels zweier Metallkugeln in der Schwingmühle MM301 (30 Hz, 30 s; Retsch, Haan) homogenisiert und anschließend in 300 µl GUS-Extraktionspuffer [50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM β-Mercaptoethanol; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS] resuspendiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Daraufhin wurden 10 µl des Überstandes mit 90 µl 10 mM MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronidhydrat), welches in GUS-Extraktionspuffer gelöst wurde, versetzt und für 60 bis 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem 10 µl des Reaktionsansatzes mit 90 µl 0.2 M (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gemischt wurden. Die GUS-Aktivität wurde mittels Fluoreszenzmessung des Reaktionsproduktes 4-MU (4-Methylumbelliferon) unter Nutzung *TECAN SpectraFluor Plus* (MTX Lab Systems Inc, Bradenton, USA; Anregung von 360 nm; Emission von 465 nm) analysiert. Als Standards dienten definierte MU-Lösungen (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM), die in 0.2 M (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gelöst wurden. Die Menge an Reaktionsprodukt korreliert mit der Aktivität des TALE (z. B. AvrBs3). Die Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge erfolgte mittels Bradford-Methode unter Herstellerangaben (Roti®-Quant; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), wobei BSA (Rinderserumalbumin; *New England BioLabs GmbH*; Frankfurt am Main) als Standard diente.

Die Berechnung der GUS-Aktivität ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{GUS-Aktivität} = \frac{\Delta F \times 10 \text{ pmol MU}}{t [\text{min}] \times \text{Protein} [\text{mg}] \times F_{10 \text{ pmol MU}}}$$

ΔF: Fluoreszenzwert der Probe abzüglich der Hintergrundfluoreszenz

t: Reaktionszeit in min

F<sub>10 pmol MU</sub>: Fluoreszenzwert des Standards (10 µM MU)

Die GUS-Aktivität wird in der Einheit pmol 4-MU×min<sup>-1</sup>×µg Protein<sup>-1</sup> angegeben.

### 2.4.6.2 Histologische GUS-Färbung

Neben einer quantitativen Analyse wurde ein histologisch-qualitativer Nachweis der GUS-Aktivität durchgeführt. Bei der Spaltung des Substrates X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Glucuronid; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) durch das GUS-Enzym kommt es in Anwesenheit von atmosphärischem Sauerstoff zu einer Blaufärbung des Blattmaterials, was Aufschluss über die enzymatische GUS-Aktivität gibt. Für die GUS-Färbung wurde ein Pool aus drei *N. benthamiana*-Pflanzen mit je einer

Blattscheibe (Durchmesser 0,9 cm; Korkbohrer Größe 5) geerntet. Im Anschluss wurden die Blattscheiben mit einer GUS-Färbelösung [10 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM Kalium-ferricyanat; 1 mM Kalium-ferrocyanat; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (v/v) X-Gluc] vakuuminfiltriert und für 4 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Entfärbung der Blattscheiben mit 96 %igen Ethanol. Zur Fixierung wurden die feuchten Blattscheiben zwischen zwei Schichten transparenter 0,1 mm starker LDPE Schlauchfolie (Moosmann GmbH & Co.KG, Ravensburg) aufgelegt und getrocknet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung möglicher pflanzlicher Interaktorproteine von XopG

XopG könnte als Zink-Metalloprotease fungieren und pflanzliche Proteine spalten. Daher sollten pflanzliche XopG-Interaktoren mittels erneuter Y2H-Sichtung identifiziert und im Anschluss auf Interaktion mit XopG und Derivaten *in planta* und *in vitro* getestet werden.

##### 3.1.1 Y2H-Sichtung zur Identifizierung möglicher XopG-Interaktoren

Für die Y2H-Sichtung wurde der gleiche experimentelle Aufbau genutzt wie in den Vorarbeiten (1.4.2), d. h. der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A wurde mit der Paprika-cDNA-Bibliothek und dem jeweiligen Köderplasmid ko-transformiert und die Ko-Transformanden auf Aktivierung des *ADE2*-Reportergens getestet. Insgesamt wurden für das Köderprotein BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> 4.98×10<sup>6</sup> KBE und für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> 4.69×10<sup>6</sup> KBE auf Selektionsmedium (-LW, ohne Leucin und Tryptophan) gesichtet. Obwohl auch hier die Transformationseffizienz unter dem Titer der Paprika-cDNA-Bibliothek von 7,2×10<sup>6</sup> KBE lag, war die Effizienz höher als in der ersten Sichtung (8,4×10<sup>5</sup> KBE für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> bzw. 1,07×10<sup>6</sup> KBE für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>). Die Beuteplasmide der selektierten Ko-Transformanden (83 für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> bzw. 167 für BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>; Tabelle 10) wurden isoliert und erneut auf Vermittlung spezifischer Interaktion mit XopG<sub>WT</sub> bzw. XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> in *S. cerevisiae*-Zellen getestet. Um auf unspezifische Interaktionen zu testen, wurden die Beuteplasmide mit dem „Leervektor“ (BD<sub>GAL4</sub>-ev) ko-transformiert. Der Spezifitätstest wurde auf selektivem Medium (-LWA, d. h. ohne Leucin, Tryptophan und Adenin) für das Reportergen *ADE2* durchgeführt. Im Spezifitätstest wuchsen acht Transformanden für das Köderprotein BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> unter selektiven Bedingungen. Dabei war eine Interaktion lediglich mit XopG<sub>WT</sub>, drei Interaktionen ausschließlich mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> und vier Interaktionen mit beiden Köderproteinen spezifisch detektierbar (Tabelle 10). Aus der Sichtung mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup> blieben 47 von 167 spezifische Transformanden übrig. Von den 47 Beuteproteinen interagierten 36 ausschließlich mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>, ein Protein mit XopG<sub>WT</sub> und zehn mit beiden Köderproteinen (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Ko-Transformanden der neuen Y2H-Sichtung.**

Verwendete Köderproteine	Selektierte Ko-Transformanden <sup>a</sup> auf -LWA	Spezifische Ko-Transformanden <sup>b</sup> auf -LWA			Gesamt (55)
		Beuteprotein interagiert mit			
		XopG <sub>WT</sub>	XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub>	XopG <sub>WT+EY<sup>-</sup></sub>	
BD <sub>GAL4</sub> -XopG <sub>WT</sub>	83	1	3	4	<b>8</b>
BD <sub>GAL4</sub> -XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub>	167	1	36	10	<b>47</b>

-LWA, Selektionsmedium ohne Zugabe der AS Leucin, Tryptophan und Adenin; <sup>a</sup> nach Selektion auf *ADE2*; <sup>b</sup> nach Isolierung der Beuteplasmide und Analyse der spezifischen Interaktion mit BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> bzw. BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> im Hefestamm PJ69-4A.

Die Sequenzen der cDNA-Fragmente der 55 spezifischen Interaktoren wurden ermittelt und mittels der Datenbanken *Sol Genomics* (<http://solgenomics.net/>) und *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert. Die möglichen Interaktoren von XopG zeigten Homologie zu 28 verschiedenen Wirtsproteinen, von denen 19 ausschließlich eine Interaktion mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup> aufwiesen (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Ergebnisse der zweiten Y2H-Sichtung mit den Ködern XopG<sub>WT</sub> und XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>.**

Interaktor	[n]	Interaktion mit BD <sub>GAL4</sub> -XopG		Vorhergesagte Funktion	Organismus <sup>b</sup> , Akzessionsnummer
		WT	EY <sup>-</sup>		
RIC1 <sup>a</sup>	8	-	+	<i>Protein RIC1 homolog/Quinoprotein amine dehydrogenase</i>	Sl, Solyc01g094880
DUF869 <sup>a</sup>	5	+	+	<i>Filament-like plant protein</i>	Sl, XP_004250312
ATM-like <sup>a</sup>	5	+	+	<i>Serine/threonine-protein kinase ATM</i>	Sl, Solyc06g071490
WD40	4	-	+	<i>Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein</i>	Sl, Solyc03g082870
Joka2	3	-	+	<i>JOKA2/selective autophagy cargo receptor</i>	Ca, CA00g00600
GLDC	3	-	+	<i>Glycine dehydrogenase P protein</i>	Sl, Solyc08g065220
UGT89A2	2	+	+	<i>UDP-glycosyltransferase superfamily protein</i>	Sl, Solyc05g010710
At5g41260	1	+	+	<i>Probable serine/threonine-protein kinase At5g41260</i>	Sl, Solyc12g099830
NAC	1	-	+	<i>NAC domain containing protein 2</i>	Ca, AFU61114
bHLH35	1	-	+	<i>Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein</i>	Sl, XP_004242918.1
GTE4	1	-	+	<i>Transcription factor GTE4-like</i>	Sl, XP_004244259
ZK	1	+	+	<i>Zinc knuckle (CCHC-type) family protein</i>	Sl, Solyc01g060030
NEK5	1	-	+	<i>NIMA-related kinase 5</i>	Sl, Solyc10g080390
KRP1 <sup>a</sup>	1	+	-	<i>P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily</i>	Sl, Solyc03g053080
ASR	1	-	+	<i>Phosphoadenosine phosphosulfate reductase</i>	Sl, Solyc02g080640
UPM	1	-	+	<i>Siroheme synthase</i>	Sl, Solyc01g086650
SMUBP-2	1	-	+	<i>DNA-binding protein SMUBP-2</i>	Sl, XP_004235277
RBBP6	1	+	+	<i>Retinoblastoma binding protein 6</i>	Sl, Solyc08g061890
DLC1	1	-	+	<i>Dynein light chain type 1 family protein</i>	Sl, Solyc06g071180
LRR-P	1	-	+	<i>Leucine-rich repeat family protein</i>	Sl, Solyc03g118620
CHUP1	1	-	+	<i>Chloroplast unusual positioning 1A</i>	Sl, XP_010316803
RPL18	1	+	+	<i>ribosomal protein L18</i>	Sl, Solyc01g099900
RPP1A	1	-	+	<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>	Sl, Solyc01g006160
RPS11-BETA	1	-	+	<i>40S ribosomal protein S11</i>	Sl, Solyc12g042080
Hsp	1	+	+	<i>Chaperone DnaJ-domain superfamily protein</i>	Sl, Solyc03g123560
EXO2	1	-	+	<i>Exocyst complex component 2</i>	Sl, Solyc04g071350
AAP	1	-	+	<i>Amino acid permease</i>	Sl, Solyc11g005070
Virp1	1	-	+	<i>PSTVd RNA-binding protein</i>	Sl, Solyc01g106280

<sup>a</sup> Interaktoren, die bereits in der ersten Y2H-Sichtung identifiziert wurden; [n] Anzahl der gefundenen cDNA-Fragmente; + spezifische Interaktion mit BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>WT</sub> und/oder BD<sub>GAL4</sub>-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>; - keine spezifische Interaktion; grau unterlegt sind Kandidaten, die näher untersucht wurden. Analysen erfolgten mittels *Sol Genomics* (<http://solgenomics.net/>) und *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). <sup>b</sup> Ca, *Capsicum annum*; Sl, *Solanum lycopersicum*.

Ein Kandidat KRP1 interagiert lediglich mit XopG<sub>WT</sub> und acht Kandidaten zeigten eine spezifische Interaktion mit beiden Köderproteinen. Für sieben Kandidaten (RIC1, DUF869, ATM-*like*, WD40, Joka2, GLDC und UGT89A2) wurden mehrere cDNAs für dasselbe Gen isoliert (Tabelle 11). RIC1, DUF869, ATM-*like* und KRP1 wurden bereits in der ersten Sichtung der cDNA-Bibliothek ermittelt (Tabelle 2 und 11). Für weiterführende Analysen wurden 16 Kandidaten selektiert, welche nach Literaturrecherche vermutlich eine Kernlokalisierung aufweisen, in beiden Sichtungen, sowie mehrfach identifiziert wurden und/oder eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr spielen könnten (grau unterlegt; Tabelle 2 und 11).

### 3.1.2 Klonierung der Gene für XopG-Interaktorkandidaten in voller Länge

Für die nähere Analyse der XopG-Interaktorkandidaten wurden die vollständigen kodierenden Sequenzen aus *C. annuum* (*Ca*) bzw. *S. lycopersicum* mit 5'- und 3'-Überhängen für die Klonierung in verschiedene Zielvektoren generiert. Die Zielvektoren vermitteln die Expression der XopG-Kandidaten in *S. cerevisiae*, *E. coli* oder *via A. tumefaciens* in der Pflanze. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konstrukte für 12 von 16 Interaktoren aus cDNA von *C. annuum* (*Ca*) bzw. *S. lycopersicum* (*Sl*) in voller Länge generiert. Für NEK5 konnten keine PCR-Produkte aus den verwendeten cDNAs amplifiziert werden (Tabelle 12). Die drei Interaktoren TDI-65, LHW und KRP1 lagen bereits in voller Länge kloniert vor (\*, Tabelle 12; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Ein Vergleich der Homologen aus *C. annuum*, *S. lycopersicum* bzw. *Solanum tuberosum* (Kartoffel) untereinander ergab eine AS-Identität zwischen 67 % bis 96 % (Tabelle 12). Für Joka2 wurde zusätzlich das Homolog aus *S. tuberosum* (*St*) kloniert, da die Amplifizierung des Homologs aus *S. lycopersicum* nicht gelang. Hierfür wurde ein entsprechendes *template* (pB7RWG2:Joka2) von Y. Dagdas (Gregor Mendel Institut für Molekulare Pflanzenbiologie, Wien) zur Verfügung gestellt. Insgesamt standen 15 Kandidaten aus *C. annuum* und/oder *S. lycopersicum* und *S. tuberosum* für nähere Untersuchungen in Hefe zur Verfügung (Tabelle 12).

Tabelle 12: Klonierte potentielle XopG-Interaktoren.

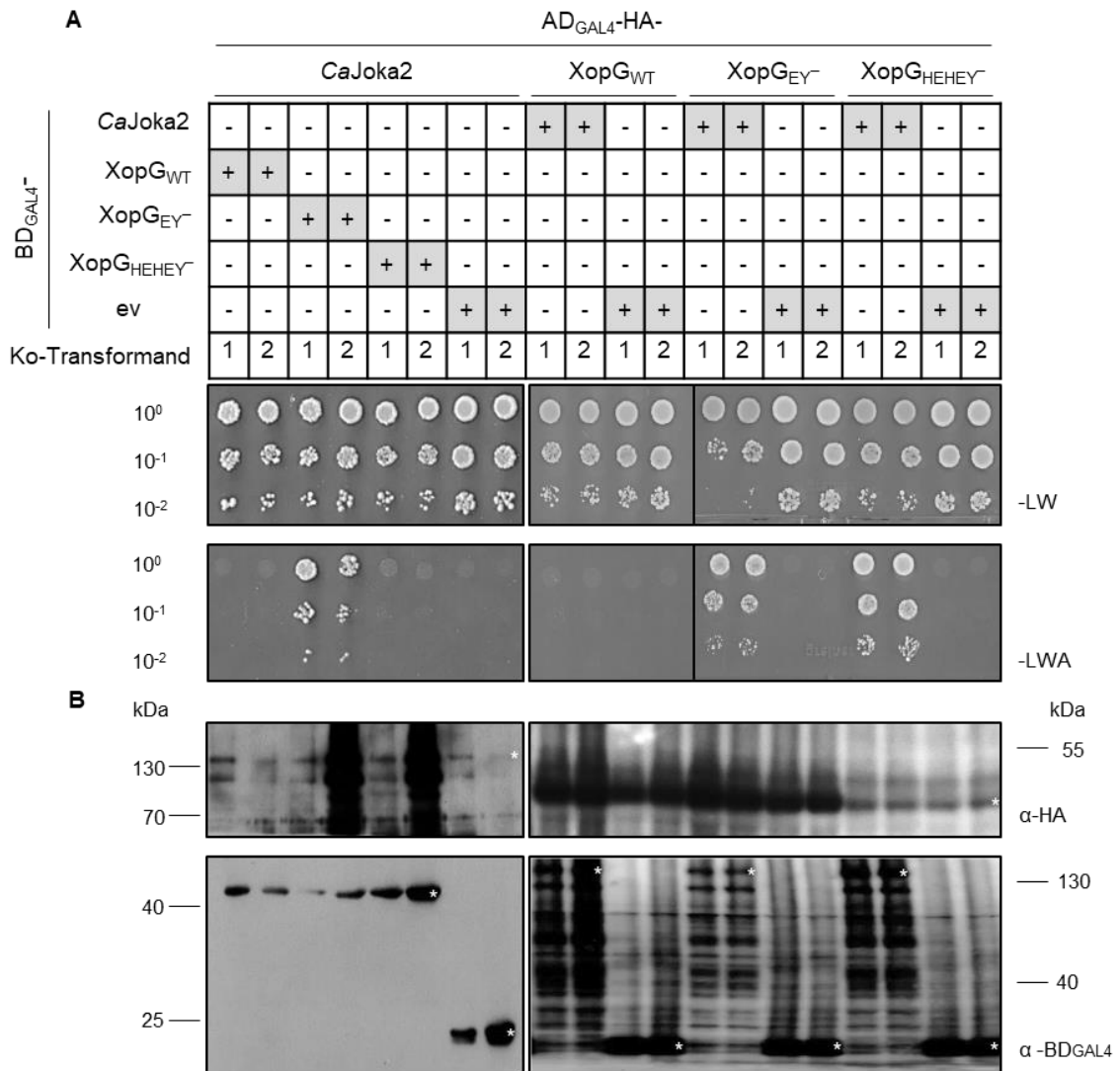
Interaktor <sup>a</sup>	Amplifizierung <sup>b</sup>	Akzessionsnummer	AS-Sequenz-Identität in %
CaRIC1	+	CA08g07460	95,9 <sup>c</sup>
SI/RIC1	-	Solyc01g094880	
CaDUF869	+	CA04g10200	88,3 <sup>c</sup>
SI/DUF869	+	Solyc11g012860	
CaATM-like	+	CA06g19680	71,3 <sup>c</sup>
SI/ATM-like	+	Solyc06g071490	
CaWD40	-	CA03g20170	86,1 <sup>c</sup>
SI/WD40	+	Solyc03g082870	
CaJoka2	+	CA00g00600	78,8 <sup>c</sup>
SI/Joka2	-	Solyc03g112230	80,5 <sup>d</sup>
StJoka2	+	XM_006344410	90,8 <sup>c</sup>
CaGLDC	+	CA12g18670	93,9 <sup>c</sup>
SI/GLDC	-	Solyc08g065220	
CaUGT89A2	+	CA00g30190	67,7 <sup>c</sup>
SI/UGT89A2	+	Solyc05g010710	
CaAt5g41260	+	CA11g12240	86,2 <sup>c</sup>
SI/At5g41260	+	Solyc12g099830	
CaNAC	+	CA12g04950	78,2 <sup>c</sup>
SI/NAC	-	Solyc11g008010	
CaHLH35	-	CA01g04070	82,4 <sup>c</sup>
SI/HLH35	+	Solyc07g018010	
CaGTE4	+	CA07g17310	81,9 <sup>c</sup>
SI/GTE4	-	Solyc07g062660	
CaZK	-	CA06g25960	91,4 <sup>c</sup>
SI/ZK	+	Solyc01g060030	
CaNEK5	-	CA10g220001	77,5 <sup>c</sup>
SI/NEK5	-	Solyc10g080390	
SIKRP1	+*	Solyc03g053080	-
CaTDI-65	+*	CA00g84350	69,5 <sup>c</sup>
SI/TDI-65	+*	Solyc12g088670	
CaLHW	+*	CA00g81280	81,3 <sup>c</sup>
SI/LHW	+*	Solyc06g074110	

<sup>a</sup> Ca (*Capsicum annuum*); SI (*Solanum lycopersicum*); St (*Solanum tuberosum*); <sup>b</sup> + PCR-Fragment; - kein PCR-Fragment; \* kloniert von H. Prochaska; <sup>c</sup> Ca Vergleich mit SI; <sup>d</sup> Ca Vergleich mit St; <sup>e</sup> SI Vergleich mit St.

### 3.1.3 Interaktionsstudien zwischen XopG und pflanzlichen Interaktoren in Hefe

Zur Überprüfung der Interaktion zwischen XopG und einem der Kandidatenproteine wurden die vollständigen kodierenden Sequenzen in den Beutevektor, der die Fusion an die AD<sub>GAL4</sub> mit HA-Epitop ermöglicht, oder in den Ködervektor mit Fusion an die BD<sub>GAL4</sub> kloniert. Zuerst wurden die Köderplasmide auf Autoaktivierung der Reportergene getestet. Lediglich das CaATM-like-Köderkonstrukt führte zu einer Reporter-gen-Autoaktivierung (Daten nicht gezeigt). Für den anschließenden Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- bzw. Beuteplasmiden zur Expression von *xopG<sub>WT</sub>*, *xopG<sub>EY</sub>*, *xopG<sub>HEHEY</sub>* und den Interaktoren ko-transformiert. Der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A enthält die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* unter der Kontrolle verschiedener GAL4-bindender Promotoren, was in unterschiedlich starken Aktivierungen der Reportergene resultiert. So erlaubt das *ADE2*-Reportergen eine sehr stringente Selektion (starke Interaktionen detektierbar), während die Selektion mit dem *HIS3*-Reportergen weniger stringent ist (weniger starke Interaktionen detektierbar) (James *et al.*, 1996). XopG<sub>HEHEY</sub> besitzt Substitutionen im Zink-Bindemotiv, die eine Koordination des Zink-Ions

unterbinden (TXRF-Messungen; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten; Kooperation mit A. von Bohlen, ISAS Dortmund) und wurde neben XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> als eine vermutlich weitere inaktive XopG-Variante mitgeführt, um eine mögliche Zink-abhängige Interaktion zwischen XopG und den Interaktoren zu untersuchen. Im Spezifitätstest wurden je zwei Transformanden pro Hefestamm getestet. Als Transformationskontrolle diente das Wachstum auf dem Selektionsmedium -LW. Wachstum auf den Selektionsmedien -LWH (ohne Leucin, Tryptophan und Histidin) oder -LWA diente zum Nachweis von schwachen bzw. starken Interaktionen. Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurde zusätzlich das Wachstum der BD<sub>GAL4</sub>-Ko-Transformanden auf den Selektionsmedien analysiert. Der Synthesenachweis der Fusionsproteine erfolgte mittels Immunoblot. Alle getesteten Ko-Transformanden wuchsen auf dem Kontrollmedium -LW (Abbildung 4-6). Für die drei Interaktoren *CaJoka2*, *SMD40* und *CaATM-like* sind die Resultate des Spezifitätstests in den Abbildungen 4 bis 6 gezeigt. Für die Analysen der XopG-Interaktion mit *CaJoka2* und *SMD40* wurden die Fusionsproteine BD<sub>GAL4</sub>-*CaJoka2* und BD<sub>GAL4</sub>-*SMD40* bzw. AD<sub>GAL4</sub>-HA-*CaJoka2* und AD<sub>GAL4</sub>-HA-*SMD40* verwendet (Abbildung 4 und 5). Da die Expression des Köderkonstrukts von *CaATM-like* zu einer Autoaktivierung der Reportergene führte, erfolgte die Untersuchung der XopG-Interaktion lediglich mit dem Beuteprotein AD<sub>GAL4</sub>-HA-*CaATM-like* (Abbildung 6). Für *CaJoka2* wurde eine spezifische Interaktion mit den XopG-Varianten EY<sup>-</sup> und HEHEY<sup>-</sup> nachgewiesen. Ein Wachstum der entsprechenden Ko-Transformanden war auf -LWA detektierbar, allerdings interagierte *CaJoka2* lediglich als Köderprotein mit XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub>, nicht aber als Beuteprotein (Abbildung 4 A). Mittels Immunoblot wurden alle Köder- und Beuteproteine von XopG bzw. *CaJoka2* mit ihren erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) detektiert (Abbildung 4 B).

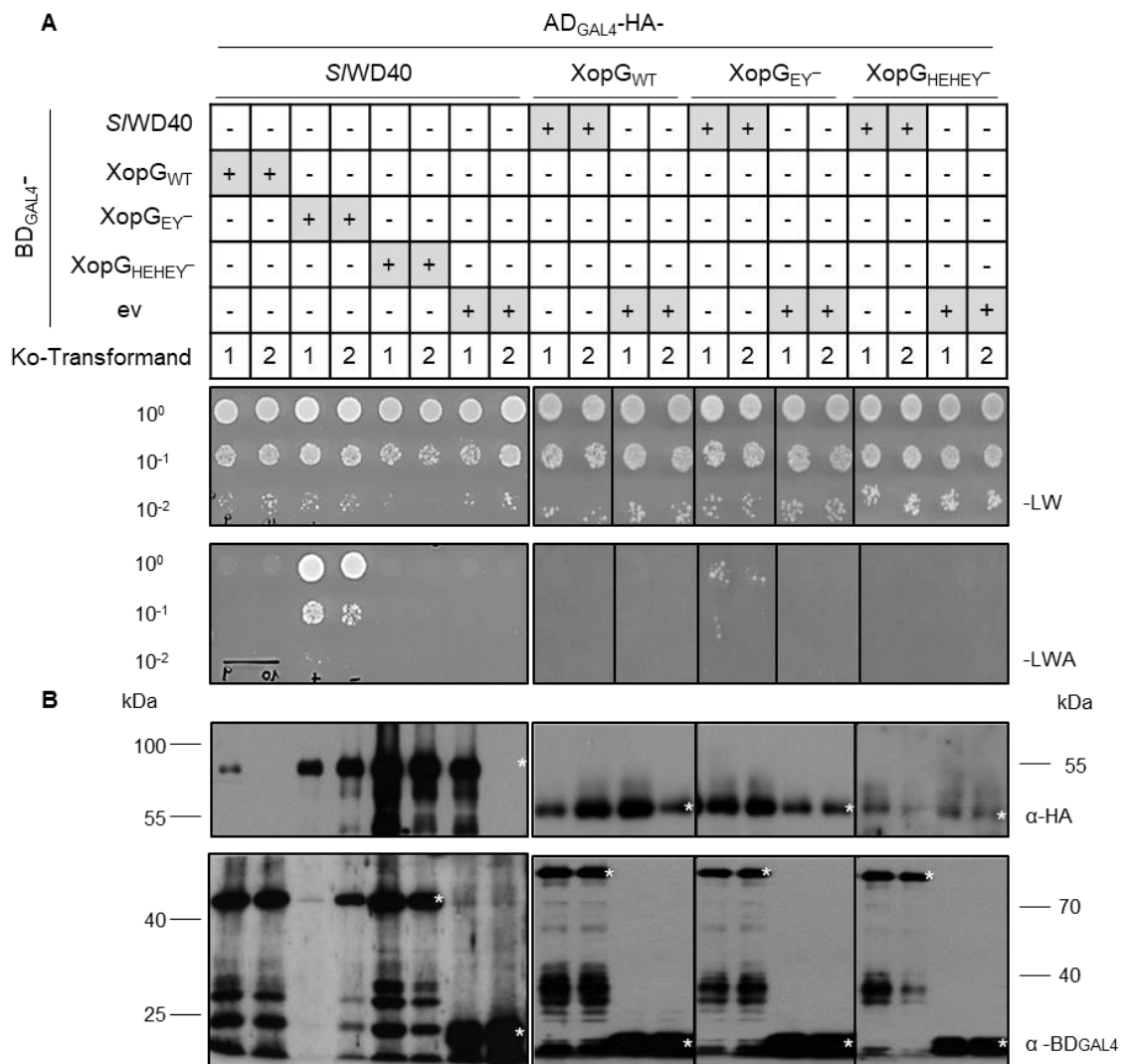


**Abbildung 4: CaJoka2 interagiert in Hefe mit XopG<sub>EY</sub><sup>-</sup> und XopG<sub>HEHEY</sub><sup>-</sup>.**

(A) Für den Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW (ohne Leucin und Tryptophan) und -LWA (ohne Leucin, Tryptophan und Adenin) getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden analysiert. (B) Die Synthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine wurde mit BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup> bzw. HA-spezifischem Antikörper und mittels Immunoblot analysiert. Mit weißem Stern markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (α-HA-Blot bzw. α-BD<sub>GAL4</sub>-Blot). Weitere Signale stellen mögliche Degradationsprodukte dar. BD<sub>GAL4</sub>-EV (*empty vector*, „Leervektor“) kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Experimente wurden zwei- bis dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Im Falle von SMD40 wurde ausschließlich eine spezifische Interaktion mit XopG<sub>EY</sub><sup>-</sup> bestätigt, d. h. die Ko-Transformanden wuchsen auf -LWA (Abbildung 5 A). Hierbei zeigte sich, dass die XopG<sub>EY</sub><sup>-</sup>-Interaktion mit AD<sub>GAL4</sub>-HA-SMD40 stärker war als mit dem Köderprotein BD<sub>GAL4</sub>-SMD40 (Abbildung 5 A). Die XopG- und SMD40-Fusionsproteine wurden entsprechend ihrer molekularen Massen (Tabelle 17) mittels Immunoblot detektiert (Abbildung 5 B).



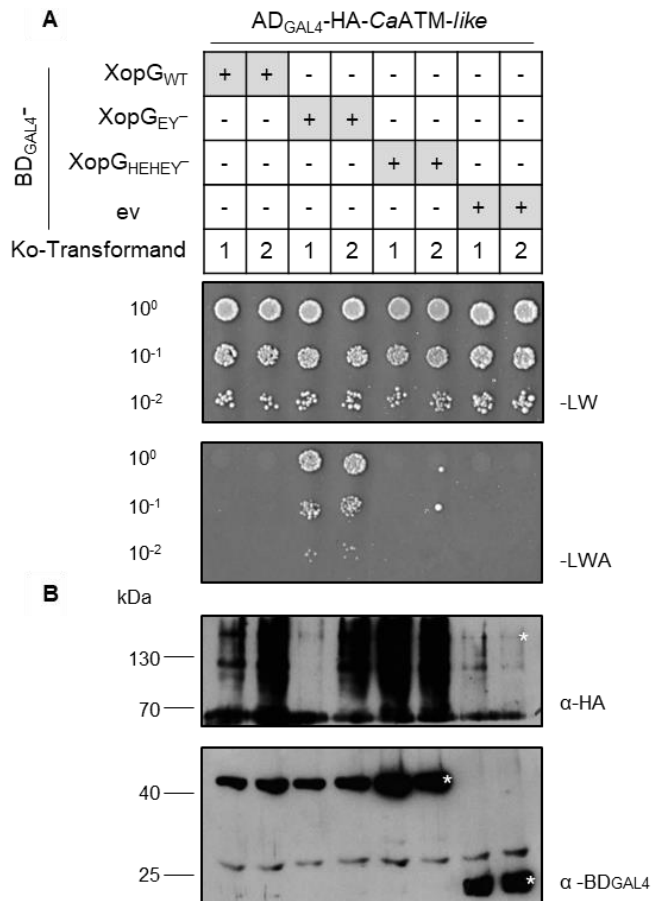


**Abbildung 5: SWD40 interagiert in Hefe ausschließlich mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>.**

(A) Für den Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf die selektiven Medien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden untersucht. (B) Die Synthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup> sowie HA-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Stern-markierte (weiß) Signale zeigen die Fusionsproteine (α-HA-Blot bzw. α-BD<sub>GAL4</sub>-Blot) an. Weitere Signale sind mögliche Degradationsprodukte. BD<sub>GAL4</sub>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zwei- bis dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Für *CaATM-like* wurde eine spezifische Interaktion mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup> festgestellt, da ein Wachstum entsprechender Ko-Transformanden auf dem Selektionsmedium -LWA nachweisbar war (Abbildung 6 A). Die Proteinsynthese wurde für XopG<sub>WT</sub>, XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>, XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> sowie *CaATM-like* nachgewiesen (Abbildung 6 B).

Insgesamt ist festzustellen, dass die drei Kandidaten *CaJoka2*, *SWD40* und *CaATM-like* eine spezifische Interaktion mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> zeigten.



**Abbildung 6: CaATM-like interagiert in Hefe ausschließlich mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>.**

(A) Für den Y2H-Test wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Hefe-Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden analysiert. (B) Die Proteinsynthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot und unter Verwendung von BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup> sowie HA-spezifischen Antikörpern untersucht. Mit weißem Stern markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (α-HA-Blot bzw. α-BD<sub>GAL4</sub>-Blot). Weitere Signale stellen mögliche Degradationsprodukte dar. BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Da keines der drei Pflanzenproteine mit XopG<sub>WT</sub> interagiert, stellen sie potentielle XopG-Substrate dar. Allerdings wurden bei Ko-Expression mit *xopG<sub>WT</sub>* keine Spaltungsprodukte im Immunoblot detektiert.

Die übrigen Ergebnisse der Interaktionsstudien in Hefe sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die getesteten Hefestämme wuchsen auf dem Medium -LW zur Transformationskontrolle (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde das Wachstum der BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup>-Ko-Transformanden auf den Selektionsmedien -LWA und -LWH analysiert, um eine unspezifische Interaktion auszuschließen (Tabelle 13). In allen Fällen wurden die BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup>-XopG-Fusionsproteine WT, EY<sup>-</sup>, HEHEY<sup>-</sup> sowie die BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup>-Proteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot detektiert (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 13: Ergebnisse der Interaktionsstudien von XopG und Derivaten mit pflanzlichen Kandidatenproteinen (a) in Hefe.**

Beutefusion an AD <sub>GAL4</sub> -HA <sup>a</sup>	Wachstum auf -LWA <sup>b</sup>				Wachstum auf -LWH <sup>c</sup>				Nachweis der AD <sub>GAL4</sub> -HA-Fusionsproteine <sup>d</sup>			
	BD <sub>GAL4</sub> -XopG-			BD <sub>GAL4</sub>	BD <sub>GAL4</sub> -XopG-			BD <sub>GAL4</sub>	BD <sub>GAL4</sub> -XopG-			BD <sub>GAL4</sub>
	WT	EY <sup>-</sup>	HEHEY <sup>-</sup>		WT	EY <sup>-</sup>	HEHEY <sup>-</sup>		WT	EY <sup>-</sup>	HEHEY <sup>-</sup>	
CaRIC1	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+
CaDUF869	-+	+-	-+	--	-+	+-	-+	--	-	-	-	-
S/DUF869	--	+-	--	--	--	+-	--	--	-	-	-	-
S/ATM-like	+-	-+	--	++	++	-+	--	++	+	+	+	+
CaGLDC	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	-
CaUGT89A2	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+
SUGT89A2	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+
CaAt5g41260	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	-
S/At5g41260	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	-
CaNAC	--	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
S/bHLH35	--	--	--	--	++	+-	--	++	+	+	+	+
CaGTE4	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	-
SIZF	--	--	--	--	-+	+-	--	-+	+	+	+	+
CaTDI-65	--	++	--	--	--	++	--	--	+	+	+	+
S/TDI-65	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+
CaLHW	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+
S/LHW	--	--	--	--	-	+-	--	--	-	-	-	+
SKRP1	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	-

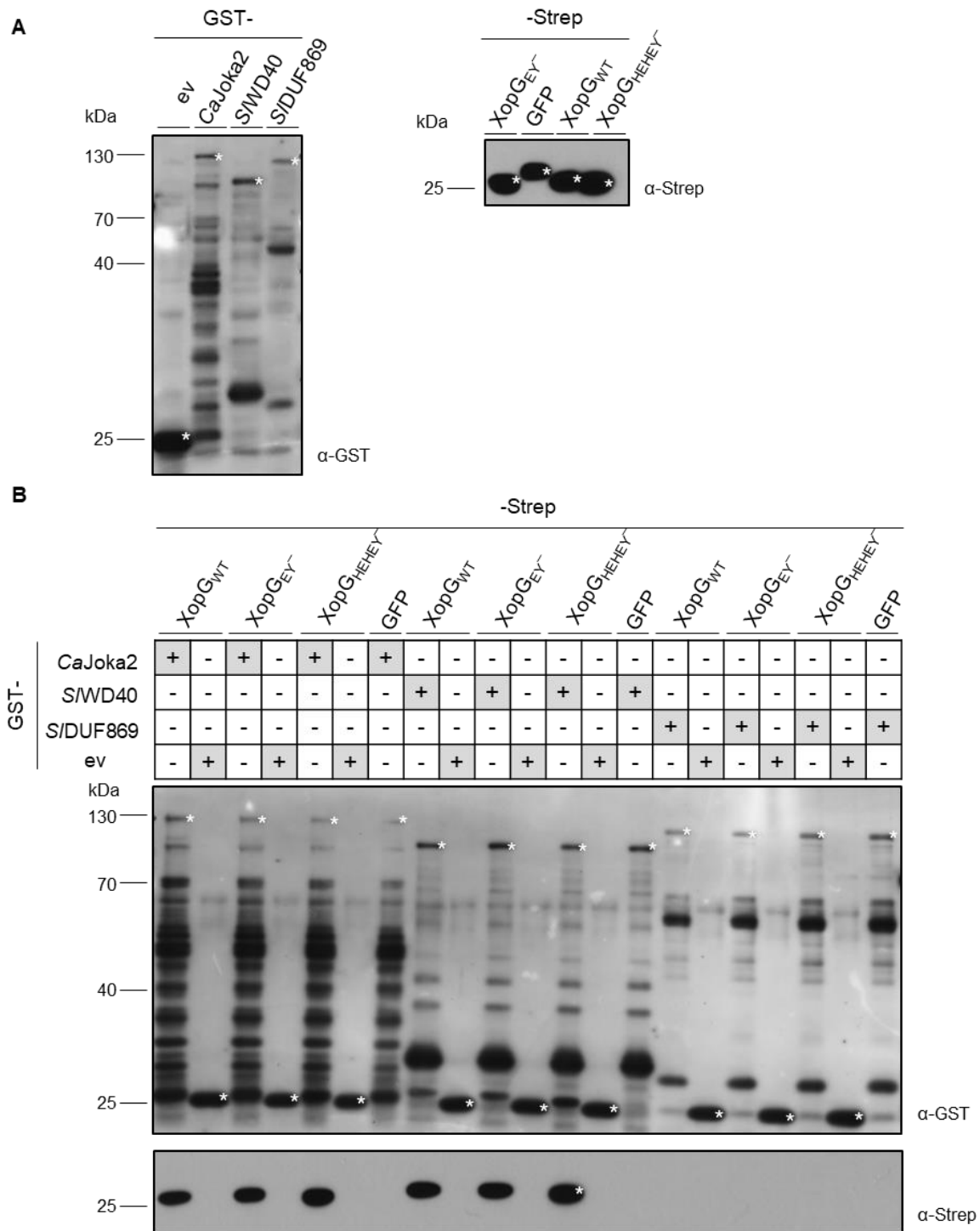
Je zwei Ko-Transformanten wurden analysiert. <sup>a</sup> Getestete Beuteproteine aus *Ca* und *S*; grau unterlegt sind Interaktoren, die spezifisch mit BD<sub>GAL4</sub>-XopG interagierten; Selektionsmedien: -LWA (<sup>b</sup>) und -LWH (<sup>c</sup>); ohne Leucin, Tryptophan und Histidin); ++ beide Ko-Transformanten zeigten Wachstum; +- bzw. -+ nur ein Ko-Transformant wuchs auf dem jeweiligen Selektionsmedium; -- kein Wachstum beider Transformanten; <sup>d</sup> + Proteinsynthese detektierbar; - Proteinsynthese nicht detektierbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der erneuten, zweiten Y2H-Sichtung sieben pflanzliche Proteine (*CaJoka2*, *CaATM-like*, *SMD40*, *CaDUF869*, *SDUF869*, *CaTDI-65* sowie *SLHW*) identifiziert wurden, die spezifisch mit XopG in Hefe interagierten (Abbildung 6; Tabelle 13). Fünf Proteine (*CaATM-like*, *SMD40*, *SDUF869*, *CaTDI-65* sowie *SLHW*) interagierten ausschließlich mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup>. *CaJoka2* interagierte zusätzlich mit XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup> und *CaDUF869* mit XopG<sup>WT</sup> sowie XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup> (Abbildung 6; Tabelle 13). Da *CaJoka2* und *CaDUF869* mit XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup> interagierten, könnte diese Interaktion unabhängig von der Zink-Koordination sein. Für sechs Kandidaten (*CaRic1*, *CaUDP*, *SUDP*, *CaNAC*, *STDI-65* und *CaLHW*) wurde keine spezifische XopG-Interaktion in Hefe nachgewiesen (Tabelle 13). Für *CaGLDH*, *CaAt5g41260*, *SAt5g41260*, *CaGTE4* und *SKRP1* kann keine Aussage getroffen werden, da die entsprechenden Fusionsproteine (Tabelle 17) nicht im Immunoblot detektiert wurden (Tabelle 13). *CaJoka2*, *CaATM-like*, *SMD40*, *SDUF869*, *CaTDI-65* und *SLHW* wurden für weitere Analysen ausgewählt.

#### **3.1.4 XopG und die Varianten EY<sup>-</sup>, HEHEY<sup>-</sup> interagieren direkt mit CaJoka2, SMD40 und CaATM-like**

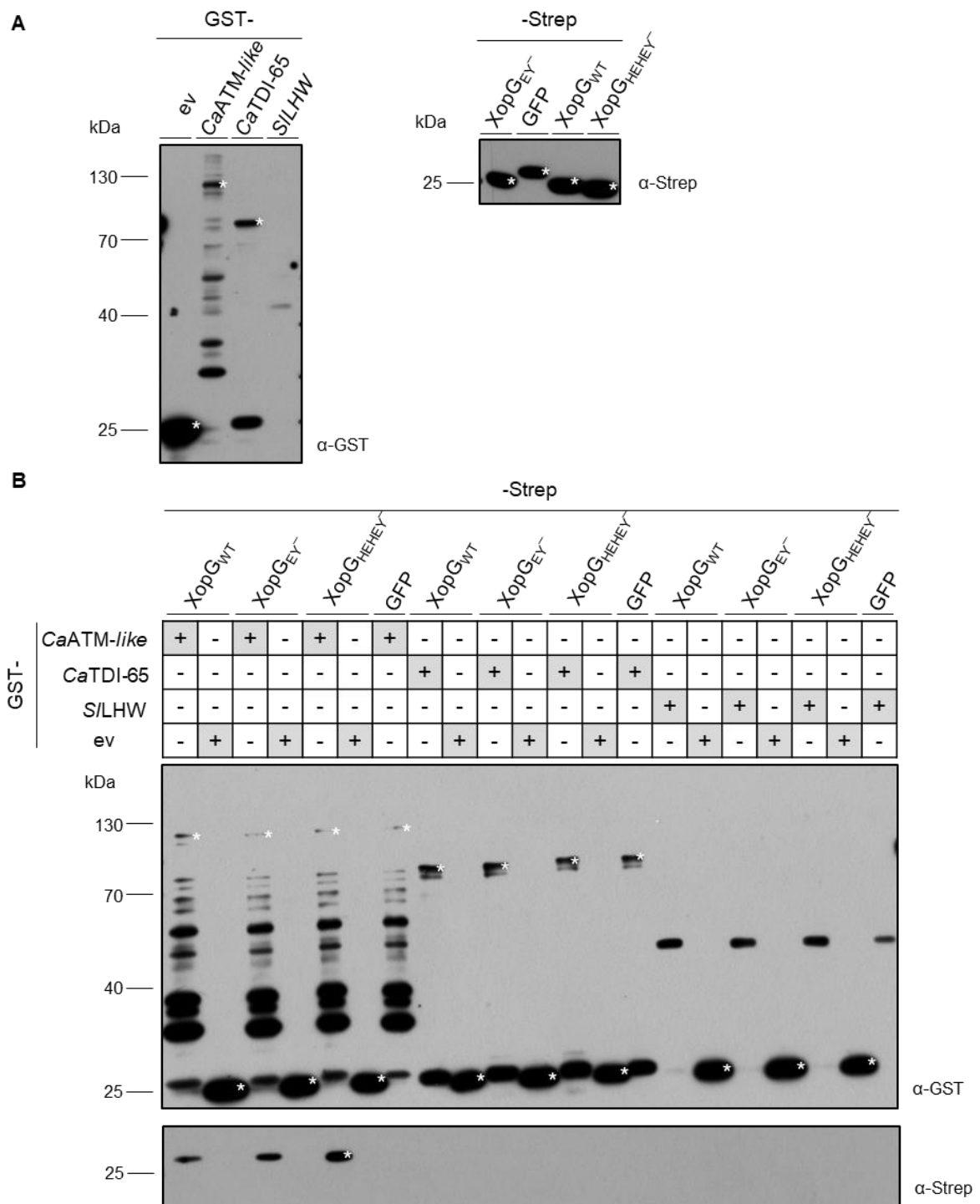
In Hefe wurden sechs pflanzliche Kandidatenproteine (*CaJoka2*, *CaATM-like*, *SMD40*, *SDUF869*, *CaTDI-65* und *SLHW*) als spezifische XopG-Interaktoren bestätigt. Als nächster Schritt sollte in GST-Pull-down-Experimenten analysiert werden, ob es sich bei den Interaktionen um eine direkte Bindung an XopG handelt. Dafür wurden GST bzw. N-terminale GST-Fusionen von *CaJoka2*, *SMD40*, *SDUF869*, *CaATM-like*, *CaTDI-65* und *SLHW* an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Zelllysate inkubiert, welches XopG<sup>WT</sup>, XopG<sup>EY<sup>-</sup></sup>, XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup> oder GFP, jeweils mit Strep-Epitop am C-Terminus, enthielt. GST und GFP-Strep dienten als Negativkontrollen. Mittels Immunoblot wurden die Zellextrakte und die eluierten Proteine unter Verwendung GST- bzw. Strep-spezifischer Antikörper analysiert (Abbildung 7 und 8).

Für *CaJoka2*, *SMD40*, *SDUF869* wurden die entsprechenden GST-Fusionsproteine (Tabelle 17) im Zelllysate (Abbildung 7 A) bzw. nach der Immobilisierung (Abbildung 7 B) nachgewiesen. In den Eluaten von GST-*CaJoka2* und GST-*SMD40* wurden XopG<sup>WT</sup>-Strep, XopG<sup>EY<sup>-</sup></sup>-Strep und XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup>-Strep nachgewiesen. Somit sind die XopG-Interaktionen mit *CaJoka2* und *SMD40* spezifisch und direkt, aber scheinbar unabhängig von einer Zink-Koordination, da beide Interaktoren auch mit der XopG-Variante HEHEY<sup>-</sup> interagierten. Im Gegensatz dazu eluierte weder XopG<sup>WT</sup>-Strep, XopG<sup>EY<sup>-</sup></sup>-Strep noch XopG<sup>HEHEY<sup>-</sup></sup>-Strep mit GST-*SDUF869*, d. h. es handelt sich vermutlich nicht um eine direkte Interaktion zwischen *SDUF869* und XopG (Abbildung 7 B).



**Abbildung 7: CaJoka2 und SMD40 interagieren *in vitro* direkt mit XopG<sup>WT</sup>, XopG<sup>EY</sup> sowie XopG<sup>HEHEY</sup>.** Im GST-Pull-down wurden GST, GST-CaJoka2, GST-SMD40 und GST-S/DUF869 an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Zelllysat inkubiert, welches XopG<sup>WT</sup>-Strep, XopG<sup>EY</sup>-Strep, XopG<sup>HEHEY</sup>-Strep oder GFP-Strep enthielt. Die Zellextrakte (A; Input) und die eluierten Proteine (B; Pull-down) wurden mittels Immunoblot unter Verwendung von GST- bzw. Strep-spezifischen Antikörpern analysiert. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine ( $\alpha$ -GST-Blot bzw.  $\alpha$ -Strep-Blot) an. Weitere Signale stellen mögliche Degradationsprodukte dar. GST-ev kodiert GST. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Während die CaATM-like- und CaTDI-65-GST-Fusionsproteine sowohl im *E. coli*-Zelllysat (Abbildung 8 A) als auch nach Immobilisierung (Abbildung 8 B) detektiert wurden, war kein GST-SLHW-Protein nachweisbar (Abbildung 8 B).



**Abbildung 8: CaATM-like interagiert *in vitro* direkt mit XopG<sup>WT</sup>, XopG<sup>EY-</sup> sowie XopG<sup>HEHEY-</sup>.**

Im GST-Pull-down wurden GST, GST-CaATM-like, GST-CaTDI-65 und GST-SLHW an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Zelllysate inkubiert, welches XopG<sup>WT</sup>-Strep, XopG<sup>EY-</sup>-Strep, XopG<sup>HEHEY-</sup>-Strep oder GFP-Strep enthielt. Die Zellextrakte (A; Input) sowie die eluierten Proteine (B; Pulldown) wurden immunologisch mit GST- bzw. Strep-spezifischem Antikörper untersucht. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (α-GST-Blot bzw. α-Strep-Blot). Weitere Signale sind mögliche Degradationsprodukte. GST-ev kodiert GST. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Für CaATM-like wurde XopG<sup>WT</sup>-Strep, XopG<sup>EY-</sup>-Strep bzw. XopG<sup>HEHEY-</sup>-Strep in den entsprechenden Eluaten nachgewiesen (Abbildung 8 B). Diese Resultate zeigen, dass CaATM-like direkt und spezifisch mit XopG<sup>WT</sup> und der Variante EY<sup>-</sup> interagiert. Da

*CaATM-like* die XopG-Variante HEHEY<sup>-</sup> bindet, ist diese Interaktion vermutlich unabhängig von der Zink-Koordination. Für GST-*CaTDI-65* konnte keine direkte Interaktion mit XopG nachgewiesen werden (Abbildung 8 B).

Die GST-Pull-down-Experimente zeigten insgesamt, dass die drei XopG-Interaktoren *CaJoka2*, *SMD40* und *CaATM-like* direkt mit XopG und womöglich unabhängig von der Zink-Bindung interagieren. Für *S/DUF869* und *CaTDI-65* wurde keine direkte Interaktion mit XopG nachgewiesen und im Fall von *SLHW* kann keine Aussage getroffen werden, da das entsprechende Fusionsprotein nicht detektierbar war.

### 3.1.5 *In planta*-Interaktionsstudien mit XopG und möglichen Interaktoren

Für die Verifizierung der möglichen XopG-Interaktoren (*CaJoka2*, *CaATM-like*, *SMD40*, *S/DUF869*, *CaTDI-65* und *SLHW*) sollte auch auf eine Interaktion in der Pflanze getestet werden. Hierzu sollte als erstes ein neuer Protein-Protein-Interaktionsassay in *N. benthamiana* etabliert sowie Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IP) durchgeführt werden.

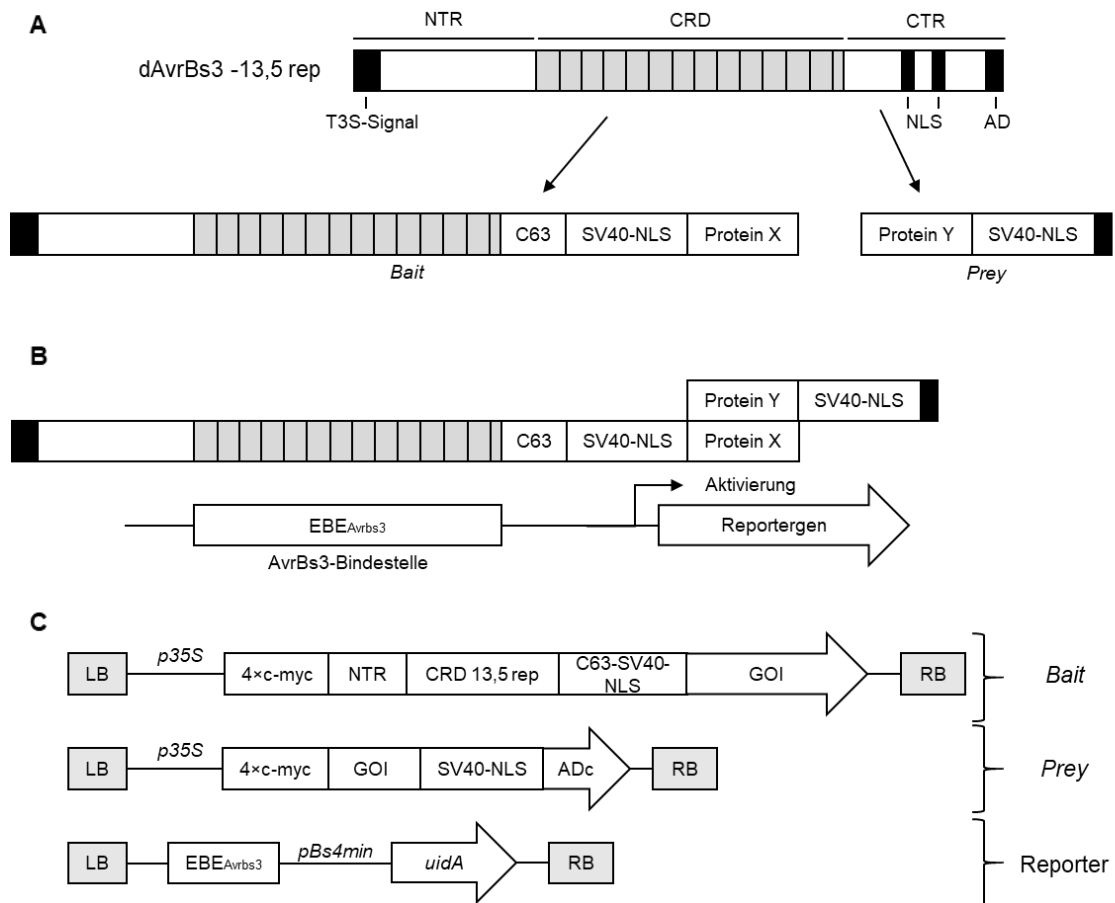
#### 3.1.5.1 Etablierung des AvrBs3-basierten „Split-TALE-Assay“ für Interaktionsstudien in *N. benthamiana*

Der TALE AvrBs3 aus *Xcv* zählt als namensgebender Vertreter zur AvrBs3-Proteinfamilie (Bonas *et al.*, 1993). Das Effektorprotein wird über das T3SS in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert und in den Kern importiert (Szurek *et al.*, 2001; Szurek *et al.*, 2002; Gürlebeck *et al.*, 2005). Dort bindet AvrBs3 an spezifische DNA-Sequenzen (Effektorbindeelement, EBE) in der Promotorregion pflanzlicher Zielgene und induziert deren Transkription. In suszeptiblen Paprika-Pflanzen aktiviert AvrBs3 die Expression pflanzlicher Gene, die als *UPA* bezeichnet werden (Kay *et al.*, 2009). Hingegen wird in resistenten Pflanzen, die das *R*-Gen *Bs3* tragen, wie *C. annuum* ECW-30R und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana* (*N.b.*), eine HR ausgelöst (Römer *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2015). AvrBs3 besitzt drei Domänen: die N-terminale Region (NTR) mit dem Typ III-Sekretions- und Translokations (T3S)-signal (Noël *et al.*, 2003), gefolgt von der TALE-typischen, zentralen *repeat*-Region (CRD), bestehend aus 17,5 Wiederholungen eines fast identischen 34 AS-Sequenzmotivs (*repeats*), und der C-terminalen Region (CTR), welche zwei funktionale Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) sowie eine saure Aktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, AD) enthält (Boch & Bonas, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte basierend auf AvrBs3 eine neue Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in der Pflanze etabliert werden. Dabei sollten Interaktionen nicht nur quantifizierbar sein, sondern auch eine phänotypische Analyse, d. h. eine AvrBs3-spezifische HR-Induktion, ermöglichen.

### 3.1.5.1.1 Prinzip des Split-TALE-Systems

Die Grundidee des Split-TALE-Systems basiert auf der Entwicklung von Licht-induzierbaren Transkriptionseffektoren (LITEs) in Säugetierzellen (Koner mann *et al.*, 2013). Im Fall von LITEs ist das lichtempfindliche Cryptochrom 2 (CRY2)-Protein aus *A. thaliana* (*A.t.*) an eine TALE-Bindedomäne fusioniert, während der CRY2-interagierende Partner CIB1 (*cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix*) an VP64 (tetrameres Derivat der VP16, *Herpes Simplex Virus* Protein 16)-AD gekoppelt ist. In diesem optogenetischen 2-Hybrid-System führt blaues Licht zu einer Interaktion zwischen CRY2 sowie CIB1 und somit zur funktionellen Rekonstitution eines TALE-Aktivators. Durch Bindung des Aktivators an eine spezifische TALE-Bindestelle kommt es zu einer Licht-vermittelten transkriptionellen Induktion (Koner mann *et al.*, 2013). Auf dieser Grundlage sollte ein auf AvrBs3-basiertes 2-Hybrid-System namens „Split-TALE“ entwickelt werden (Schreiber, Hoppe & Bonas, unpublizierte Daten). Ausgangspunkt war das AvrBs3-Derivat (dAvrBs3-13,5 rep), welches eine verkürzte *repeat*-Region besitzt und in Vorarbeiten im Vergleich zu AvrBs3 eine höhere Aktivität zeigte (Schreiber & Bonas, 2014; Abbildung 9 A). Es wurden zwei Komponenten erstellt: Die *Bait*-Komponente besteht aus NTR, CRD mit 13,5 *repeats* und einer verkürzten CTR (C63) mit der SV40-NLS fusioniert an das Protein X. Die *Prey*-Komponente besteht aus dem Protein Y, fusioniert an die AD von AvrBs3 ( $AD_{AvrBs3}$ ) und SV40-NLS. Hierbei stellen Protein X und Y ein Interaktionspaar dar (Abbildung 9 A).





**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Split-TALE-Systems.**

(A) Komponenten des Split-TALE-Systems. Das AvrBs3-Derivat dAvrBs3-13,5 rep besteht aus einer N-terminalen Region (NTR), die das Typ III-Sekretions- und Translokations (T3S)-signal enthält, gefolgt von einer zentralen *repeat*-Region (CRD, grau) mit 13,5 *repeats* und einer C-terminalen Region (CTR), welche zwei funktionale Kernlokalisationssignale (*nuclear localization signal*, NLS) sowie eine saure Aktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, ADc) enthält. Es wurden zwei Split-TALE-Komponenten erstellt: Die *Bait*-Komponente enthält die NTR, die CRD, eine verkürzte CTR (C63) mit der SV40-NLS fusioniert an das Protein X. Die *Prey*-Komponente besteht aus dem Protein Y, fusioniert an die SV40-NLS und AD von AvrBs3. Protein X und Y stellen ein Interaktionspaar dar. (B) Funktion des Split-TALE-Systems in der Pflanze. Kommt es nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression von *Bait* und *Prey* zu einer Interaktion zwischen Protein X und Y, führt dies zu einer funktionellen Rekonstitution des TALE-Aktivators. Dieser kann an eine spezifische AvrBs3-Bindestelle (Effektorbindeelement von AvrBs3, EBE<sub>AvrBs3</sub>) binden und somit das Reporter-gen aktivieren. (C) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. *Agrobacterium*-vermittelte Expression von *4xc-myc-Bait* und *4xc-myc-Prey* erfolgt unter Kontrolle des 35S Promotors (*p35S*). GOI: *gene of interest*; Reporter-konstrukt mit *uidA*-Reporter-gen (kodiert  $\beta$ -Glucuronidase, GUS) unter Kontrolle des *Bs4*-Minimalpromotors (*pBs4min*) mit einer 5'-fusionierten EBE<sub>AvrBs3</sub>. LB *left border*, RB *right border* der T-DNA (Hoppe, Schreiber, & Bonas, unpublizierte Daten).

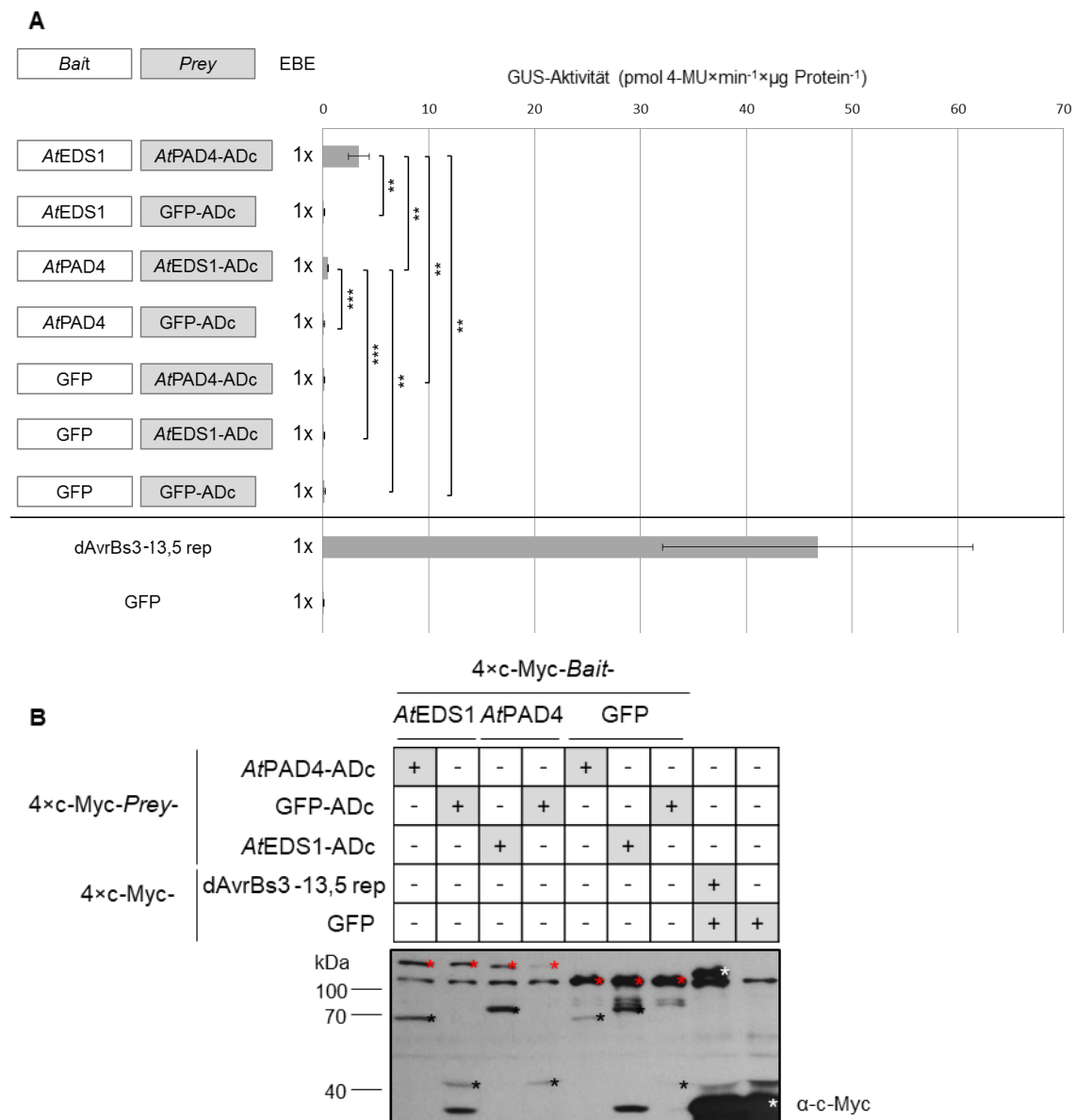
Kommt es nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression von *Bait* und *Prey* in der Pflanze zu einer Interaktion zwischen Protein X und Protein Y, resultiert dies in einer funktionellen Rekonstitution des TALE-Aktivators. Dieser kann dann an eine spezifische AvrBs3-DNA-Zielsequenz (Effektorbindeelement von AvrBs3, EBE<sub>AvrBs3</sub>) binden und somit das *uidA*-Reporter-gen induzieren (Abbildung 9 B). In der Abbildung 9 C sind die *Bait*- und *Prey*-Konstrukte und das *uidA*-Reporter-konstrukt schematisch dargestellt.

### 3.1.5.1.2 Funktionstest des Split-TALE-Systems

Um die Funktionalität des Split-TALE-Systems zu testen, wurde die in *A.t.* nachgewiesene EDS1-PAD4 (*phytoalexin deficient 4*)-Interaktion (Feys *et al.*, 2001) genutzt. Es wurden entsprechende *Bait* bzw. *Prey*-Konstrukte von *AtEDS1*, *AtPAD4* und *gfp* generiert. In Vorversuchen dieser Arbeit wurde eine Autoaktivierung des Reportergens durch *Bait* oder *Prey* ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die drei *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (1xEBE) wurden in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. Nach 3 Tagen (*days post inoculation*, dpi) wurden eine histologische GUS-Färbung und ein quantitativer GUS-Assay durchgeführt. Dabei diente dAvrBs3-13,5 rep als Positivkontrolle bzw. GFP als Negativkontrolle. Zum Nachweis der *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine wurde eine Immunoblotanalyse mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abbildung 10 A und B).

Die GUS-Färbung zeigte lediglich eine sehr schwache Blaufärbung des Blattmaterials bei der Konstellation *Bait-AtEDS1* mit *Prey-AtPAD4-ADc* bzw. *Bait-AtPAD4* mit *Prey-AtEDS1-ADc*. Die Kontrollen mit *Bait-GFP* oder *Prey-GFP-ADc* führten zu keiner Färbung. Wie erwartet, wurde eine starke Blaufärbung für die Positivkontrolle dAvrBs3-13,5 rep nachgewiesen. Die Negativkontrolle GFP zeigte keine Färbung (Daten nicht gezeigt).

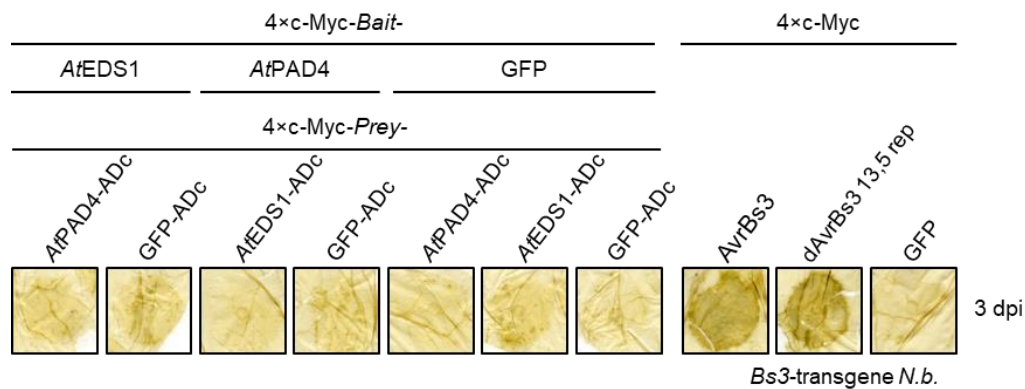
Die quantitative *uidA*-Reportergenanalyse bestätigte die Resultate. So wurde bei dem Interaktionspaar *Bait-EDS1/Prey-PAD4-ADc* eine schwache GUS-Aktivität, verglichen mit der Positivkontrolle dAvrBs3-13,5 rep, detektiert. Die Konstellation von *Bait-PAD4/Prey-EDS1-ADc* resultierte in einer noch schwächeren GUS-Aktivität. Die Ko-Synthese der EDS1- und PAD4-Fusionsproteine mit den *Bait-GFP*- oder *Prey-GFP-ADc*-Kontrollen führte zu keiner Hintergrund-Aktivität. Die GFP-Negativkontrolle war negativ (Abbildung 10 A).



**Abbildung 10: Split-TALE-vermittelte Reporter-gen-Aktivierung nach Interaktion zwischen AtEDS1 und AtPAD4.**

Für die Untersuchung der EDS1-PAD4-Interaktion *in planta* wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (1×EBE) in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. (A) Quantitativer GUS-Assay 3 dpi (*days post inoculation*). dAvrBs3-13,5 rep diente als Positivkontrolle, GFP als Negativkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (\*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001). (B) Immunologischer Nachweis der *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers. Stern-markierte Signale (rot für *Bait*, schwarz für *Prey*; weiß für Kontrollen) entsprechen den Fusionsproteinen. Weitere Signale sind vermutlich Degradationsprodukte. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Mittels Immunoblot wurden alle Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) detektiert, allerdings waren neben Degradationsprodukten auch unspezifische Signale in allen Spuren nachweisbar (Abbildung 10 B).



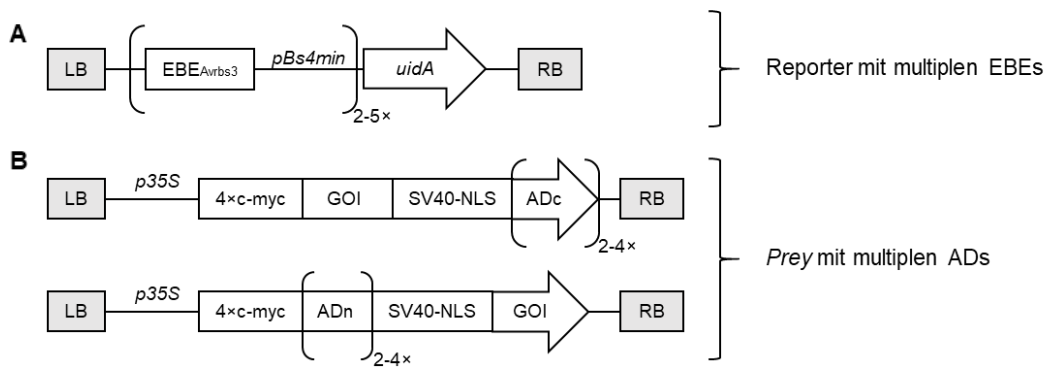
**Abbildung 11: Untersuchung der Split-TALE-vermittelten HR-Induktion in *Bs3*-transgenen *N.b.*-Pflanzen.**

*Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- bzw. *Prey*-Expressionskonstrukten wurden in Blätter von *Bs3*-transgenen *N.b.* ko-inokuliert. Als Kontrollen dienten *AvrBs3*, *dAvrBs3-13,5 rep* und *GFP*. Die *AvrBs3*-induzierte HR wurde phänotypisch 1 bis 3 dpi analysiert. Zur besseren Visualisierung des Zelltodes wurden die Blätter nach 3 dpi in Ethanol entfärbt. Die Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Resultaten durchgeführt.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass eine transiente Expression von *avrBs3* via *Agrobacterium* zur einer HR in *Bs3*-transgenen *N.b.*-Blättern führt (Schreiber *et al.*, 2015). Daher sollte überprüft werden, inwiefern eine Split-TALE-induzierte HR nach Interaktion von *AtEDS1* mit *AtPAD4* ausgebildet wird. Für die phänotypische Untersuchung wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den entsprechenden Expressionskonstrukten in die Blätter *Bs3*-transgener *N.b.*-Pflanzen ko-inokuliert und die HR-Induktion 1 bis 3 dpi analysiert. Als Kontrollen dienten *AvrBs3*, *dAvrBs3-13,5 rep* und *GFP*. Hierbei zeigte sich, dass ausschließlich *AvrBs3* und *dAvrBs3-13,5 rep* eine HR induzierten. Wie erwartet, löste die *GFP*-Kontrolle keine Pflanzenreaktion aus (Abbildung 11). Insgesamt wurde eine Split-TALE-vermittelte Reportergenaktivierung durch *AtEDS1* und *AtPAD4* nachgewiesen, jedoch war diese im Vergleich zur Geninduktion durch *dAvrBs3-13,5 rep* sehr schwach. In *Bs3*-transgenen *N.b.*-Pflanzen konnte jedoch keine HR nach Interaktion zwischen *AtEDS1* und *AtPAD4* ausgelöst werden. Aufgrund dieser Resultate sollte als nächster Schritt die Split-TALE-vermittelte Genaktivierung optimiert werden.

### 3.1.5.1.3 Optimierung der Split-TALE-vermittelten Genaktivierung

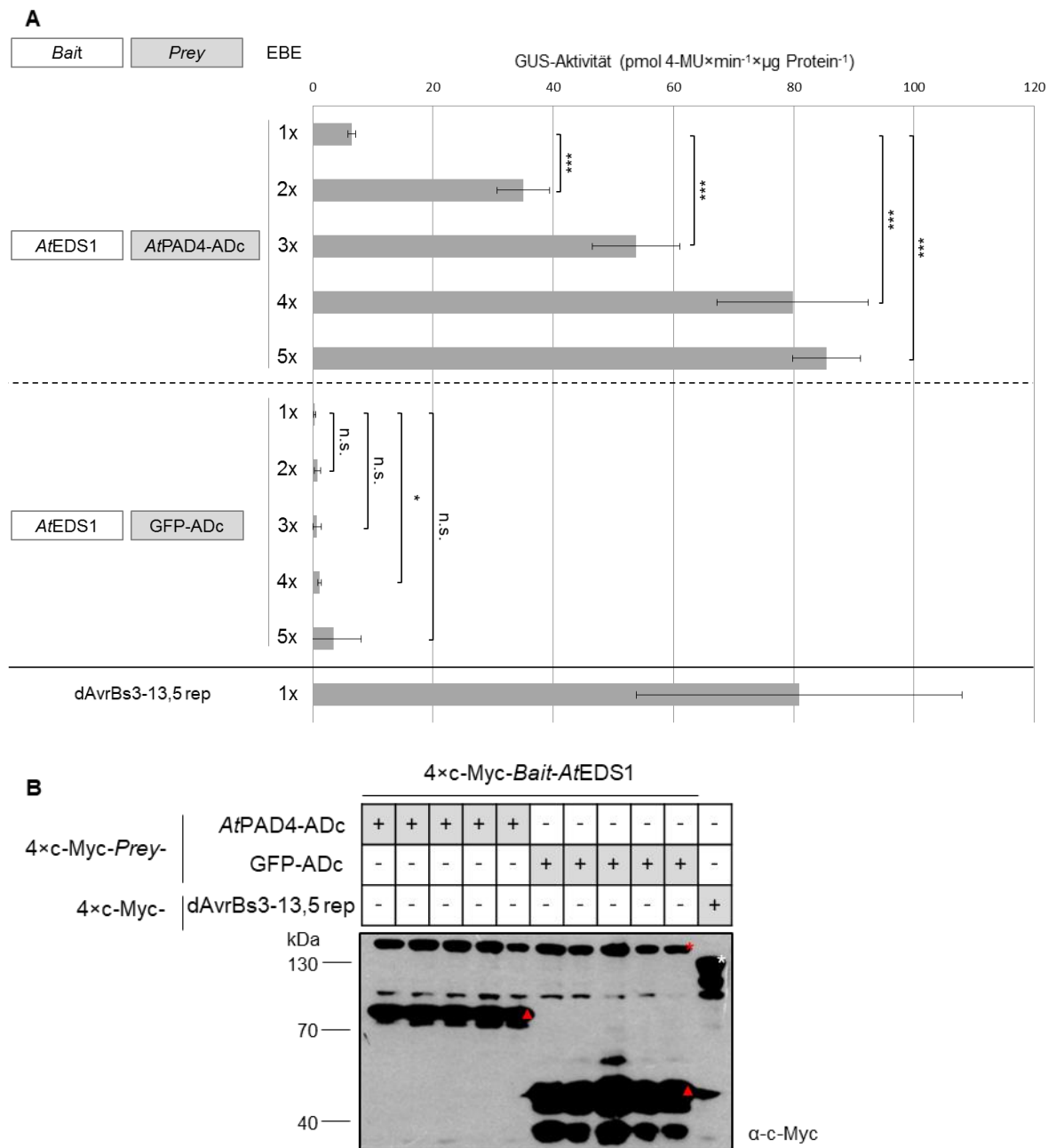
Um die Split-TALE-induzierte Genaktivierung zu steigern, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Studien zeigten, dass die Genexpression verstärkt wird, wenn die Zahl der DNA-Bindestellen in der Promotorregion erhöht wird (Maeder *et al.*, 2013; Perez-Pinera *et al.*, 2013) bzw. bei multiplen Aktivierungsdomänen. So führte beispielsweise die VP64-AD zu einer höheren Aktivität als die VP16-AD-Variante (Beerli *et al.*, 1998). Dabei wurde nicht nur eine stärkere Aktivierung beobachtet, sondern auch eine synergistische Regulation der Genexpression durch multiple Transkriptionsaktivatoren (Carey *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1994; Chi *et al.*, 1995; Perez-Pinera *et al.*, 2013).



**Abbildung 12: Mögliche Optimierung der Split-TALE-vermittelten Genaktivierung durch Modifikation der Reporter- oder Prey-Konstrukte.**

Schematische Darstellung der modifizierten Reporter- oder Prey-Konstrukte. (A) *uidA*-Reporterkonstrukte mit zwei bis fünf Kopien der EBE<sub>AvrBs3</sub> sowie des Promotors (*pBs4min*). (B) Prey-Konstrukte mit zwei- bis vier Kopien der N- oder C-terminalen AvrBs3-AD (ADn/ADc) (Hoppe, Schreiber, & Bonas, unpublizierte Daten).

Daher wurden neue Reporterkonstrukte mit zwei bis fünf Kopien der EBE<sub>AvrBs3</sub> sowie des *Bs4min*-Promotors (Abbildung 12 A) und Prey-Konstrukte mit multiplen N- bzw. C-terminalen AvrBs3-Aktivierungsdomänen (2-4xADs) (Abbildung 12 B) generiert (Hoppe, Schreiber, & Bonas, unpublizierte Daten). Als erstes sollte anhand der EDS1-PAD4-Interaktion überprüft werden, ob multiple EBE<sub>AvrBs3</sub> im Reporterkonstrukt die Genaktivierung verstärken. Hierzu wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie den *uidA*-Reporterkonstrukten (1-5xEBE) in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert und ein quantitativer GUS-Assay durchgeführt (3 dpi; Abbildung 12 A). Als Positivkontrolle diente dAvrBs3-13,5 rep. Mittels Immunoblot wurde auf die Synthese der *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper getestet (Abbildung 13 B). Die *Bait*-GFP-Kontrolle wurde nicht mitgeführt, da in Vorversuchen zu dieser Arbeit keine Hintergrundaktivität detektiert wurde. In Anwesenheit von *Bait*-AtEDS1 und *Prey*-AtPAD4-ADc war ein stufenweiser Anstieg der GUS-Aktivität bei 1-5xEBE nachweisbar. Das beste Ergebnis wurde mit 4xEBE erzielt, die zu einer 70-fachen Induktion im Vergleich zur Kontrolle *Bait*-AtEDS1/*Prey*-GFP-ADc führte. Bei den entsprechenden Kontrollen mit *Prey*-GFP-ADc war keine Hintergrundaktivität detektierbar. Die Positivkontrolle dAvrBs3-13,5 rep führte zu einer hohen GUS-Aktivität (Abbildung 13 A).



**Abbildung 13: Steigerung der Genaktivierung durch Verwendung multipler AvrBs3-Bindestellen.**

*Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie den *uidA*-Reporterkonstrukten (1-5×EBE) wurden in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. **(A)** Quantitativer GUS-Assay 3 dpi. dAvrBs3-13,5 rep diente als Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (nicht signifikant, n.s.; \* p≤0,05; \*\*\* p≤0,001). **(B)** Der Synthesenachweis der *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine erfolgte mittels Immunoblot und mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper. Markierte Signale (roter Stern für *Bait*; rotes Dreieck für *Prey*; weiß für Kontrolle) stellen die Fusionsproteine dar. Weitere Signale sind mögliche Degradationsprodukte. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Im Immunoblot wurden alle Fusionsproteine von *Bait* und *Prey* mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) nachgewiesen, allerdings waren neben Degradationsprodukten auch unspezifische Signale in fast allen Spuren detektierbar (Abbildung 13 B). Durch Verwendung multipler EBE<sub>AvrBs3</sub> im Reporterkonstrukt konnte eine Steigerung der Genaktivierung erreicht werden. Dies wurde auch für die Interaktion

zwischen *Bait*-PAD4 und *Prey*-EDS1-ADc gezeigt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die verstärkte Geninduktion auf die synergistische Wirkungsweise des funktionellen rekonstituierten TALE-Aktivators zurückzuführen. Eine synergistische Aktivierung wurde bereits für TALEs sowie den Aktivator GAL4 gezeigt (Carey *et al.*, 1990; Perez-Pinera *et al.*, 2013). In Folgeexperimenten könnte dies anhand multipler, aber mutierter, EBEs im Reporterkonstrukt getestet werden.

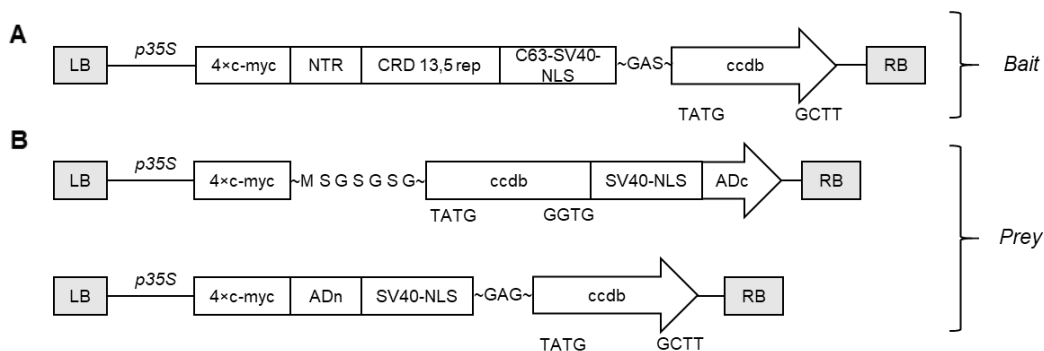
Im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Liechti wurde der Einfluss N- und C-terminaler multipler ADs auf die Genaktivierung anhand der EDS1-PAD4-Interaktion untersucht. Interessanterweise führte eine Vervielfältigung der AvrBs3-AD zu keiner Steigerung der Split-TALE-vermittelten Induktion, sondern hatte einen negativen Effekt auf die Genaktivierung (Liechti, Hoppe & Bonas, unpublizierte Daten). Mit einer N-terminalen AD-Fusion am *Prey* wurde zwar eine Interaktion zwischen *Bait*-AtEDS1 und *Prey*-AtPAD4-ADn nachgewiesen, jedoch war die gemessene GUS-Aktivität schwächer als bei der Verwendung einer C-terminalen AD (Liechti, Hoppe & Bonas, unpublizierte Daten). Dennoch sollte auch die N-terminale AD-Fusion für nachfolgende Studien anderer Interaktionspaare genutzt werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Split-TALE-vermittelte Genaktivierung durch Verwendung multipler EBE<sub>AvrBs3</sub> gesteigert werden kann. Daher wurde das 4xEBE-Reporterkonstrukt in den folgenden Interaktionsstudien eingesetzt.

#### **3.1.5.1.4 Funktionaler Test des optimierten Split-TALE-Systems**

Neben der EDS1-PAD4-Interaktion wurden auch andere bekannte Interaktionen im Split-TALE-System analysiert. Es wurde einerseits die Interaktion zwischen dem Autophagie-Rezeptor Joka2 und dem ATG (*autophagy-related*)-Protein 8 aus *S. tuberosum* (*St*, *St*Joka2 und *St*ATG8CL) ausgewählt, welche für die selektive Autophagie wichtig ist (Dagdas *et al.*, 2016), andererseits die Dimerisierung von LaminC getestet (Stuurman *et al.*, 1998). Lamine sind nukleare intermediäre Filament-Proteine, welche Hauptbestandteil der inneren Kernhülle sind und in Säugetieren in drei Isoformen (A, B und C) vorkommen (Moir *et al.*, 1990; Stuurman *et al.*, 1998). Hier wurde das humane LaminC (*Homo sapiens*, *Hs*) verwendet. Des Weiteren sollte das Split-TALE-System zur möglichen Verifizierung der XopG-Interaktion mit *Ca*Joka2, *SMD40* und *Ca*ATM-like *in planta* eingesetzt werden.

Aufgrund von nicht kompatiblen Überhängen waren bislang neben der Erstellung neuer Module auch eine GG-Reaktion mit bis zu sieben Modulen für die Generierung von *Bait*- und *Prey*-Konstrukten notwendig. Um dies zu vereinfachen, wurden neue Split-TALE-Vektoren für *Bait* und *Prey* erstellt, die eine standardisierte GG-Klonierung erlauben. Einziger Unterschied zu den bisherigen Konstrukten stellen eingefügte AS-Linker ( $GAS_{Bait}$ ,  $MSGSGSG_{Prey-ADc}$  und  $GAG_{Prey-ADn}$ ; nach Becker & Boch, unpublizierte Daten) im *Bait* bzw. *Prey* dar (Abbildung 14 A und B; Hoppe, Schreiber, & Bonas, unpublizierte Daten). Die Funktionalität der neuen Split-TALE-Vektoren wurde anhand der EDS1-PAD4-Interaktion getestet.

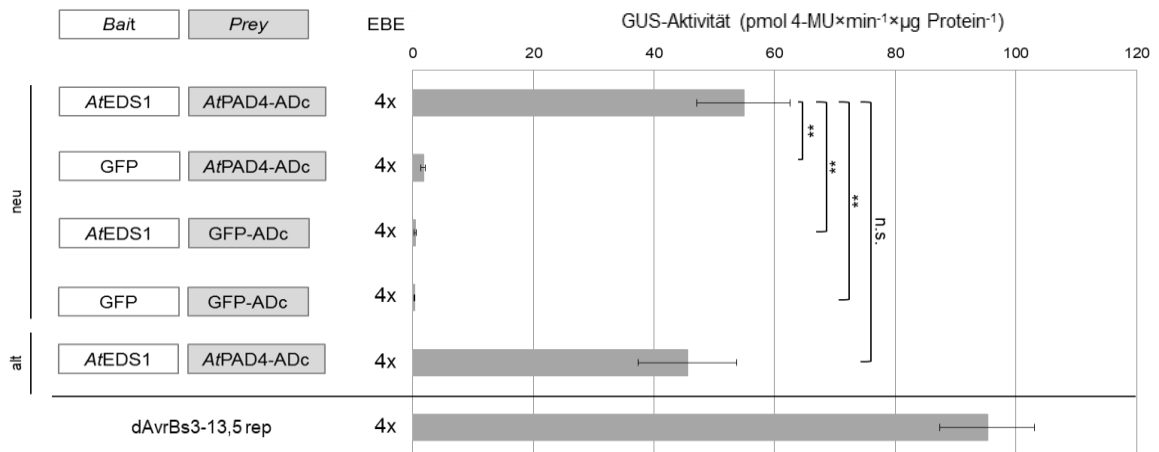


**Abbildung 14: Generierung neuer Split-TALE-Vektoren.**

Schematische Darstellung der neuen *Bait*- und *Prey*-Vektoren, welche eine standardisierte *Golden-Gate* (GG)-Klonierung von Modulen mit den kompatiblen Überhängen TATG/GCTT bzw. TATG/GGTG ermöglichen. Binäre Expressionsvektoren von *Bait* (A) (35S-Promotor, N-terminales 4xc-Myc-Epitop, NTR, CRD 13,5, C63-SV40-NLS, Linker mit kurzem AS-Linker (~GAS-), *ccdB*-Kassette) und *Prey* (B) (35S-Promotor, N-terminales 4xc-Myc-Epitop, AS-Linker (~MSGSGSG-), *ccdB*-Kassette, SV40-NLS, ADc; 35S-Promotor, N-terminales 4xc-Myc-Epitop, ADn, SV40-NLS, AS-Linker (~GAG-), *ccdB*-Kassette) (Hoppe, Schreiber, & Bonas, unpublizierte Daten).

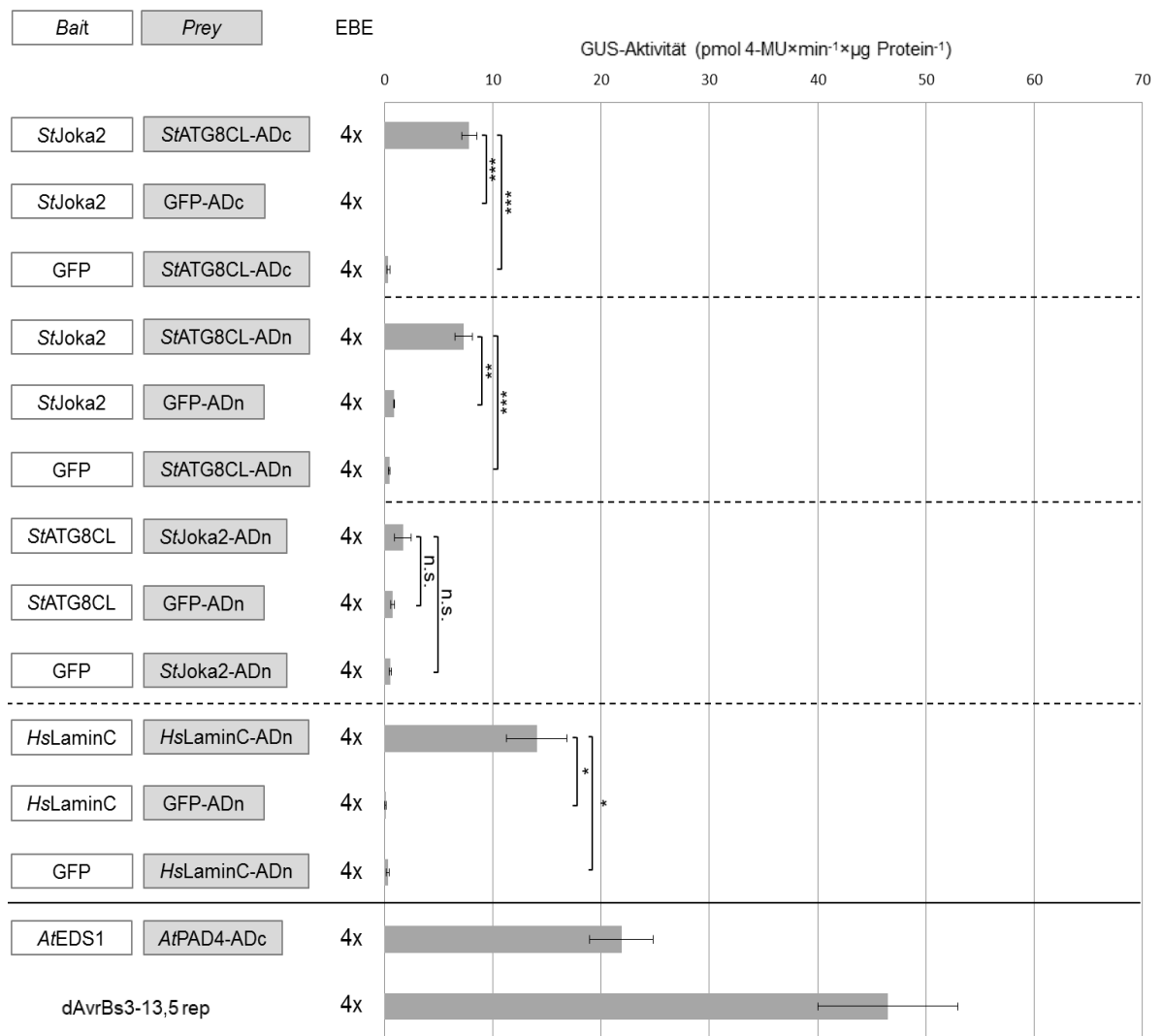
Hierfür wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (4xEBE) in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert und ein quantitativer GUS-Assay (3 dpi) durchgeführt (Abbildung 15). Im Immunoblot wurden alle *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurden vergleichbare GUS-Aktivitäten für *Bait*-EDS1/*Prey*-PAD4-ADc (neu) bzw. *Bait*-EDS1/*Prey*-PAD4-ADc (alt) ermittelt. Für die entsprechenden Kontrollen mit *Bait*-GFP oder *Prey*-GFP-ADc (neu) war keine Hintergrundaktivität detektierbar (Abbildung 15). Diese Voruntersuchungen zeigen, dass die neuen Split-TALE-Vektoren für die geplanten Analysen geeignet sind.





**Abbildung 15: Split-TALE-vermittelte Reporteragenaktivierung unter Verwendung der neuen Konstrukte.** Die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (4×EBE) wurden in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. Quantitativer GUS-Assay 3 dpi. dAvrBs3-13,5 rep diente als Positivkontrolle. Die neu generierten Konstrukte sind gekennzeichnet (neu). Zum Vergleich wurden die alten Konstrukte mit AtEDS1 und AtPAD4-ADc mitgeführt (alt). Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (n.s.; \*\* p≤0,01). Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Für die Untersuchung der Interaktion von Joka2 mit ATG8 bzw. LaminC mit LaminC wurden die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (4×EBE) in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. Nach 3 Tagen erfolgte ein quantitativer GUS-Assay (Abbildung 16). Dabei dienten *Bait*-AtEDS1/*Prey*-GFP-ADc sowie dAvrBs3-13,5 rep als Positivkontrollen. Alle *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine wurden mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen *Bait*-StJoka2 und *Prey*-StATG8CL mit ADc bzw. ADn führte zu vergleichbaren GUS-Aktivitäten. Im Gegensatz dazu wurde für die Kombination *Bait*-StATG8CL/*Prey*-StJoka2-ADn keine signifikanten Aktivitätsunterschiede nachgewiesen (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Funktionaler Test des optimierten Split-TALE-Systems anhand der Joka2-ATG-Interaktion bzw. LaminC-Dimerisierung.**

Die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Expressionskonstrukten sowie dem *uidA*-Reporterkonstrukt (4xEBE) wurden in Blätter von *N.b.* ko-inokuliert. Quantitativer GUS-Assay 3 dpi. AtEDS1-AtPAD4-ADc sowie dAvrBs3-13,5 rep dienten als Positivkontrollen. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (n.s.; \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001). Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Des Weiteren wurde die Dimerisierung von *HsLaminC* detektiert. Für die entsprechenden Negativkontrollen war keine GUS-Aktivität messbar. Die Positivkontrollen *Bait*-AtEDS1/*Prey*-GFP-ADc und dAvrBs3-13,5 rep führten wie erwartet zu hohen GUS-Aktivitäten (Abbildung 16).

Als Nächstes sollte die Interaktion von XopG mit *CaJoka2*, *SMD40* und *CaATM-like* untersucht werden. Für *CaJoka2* und *SMD40* wurden schwache GUS-Aktivitäten bestimmt, welche jedoch nicht signifikant höher waren als die der Negativkontrollen. Alle entsprechenden Fusionsproteine wurden immunologisch detektiert (Daten nicht gezeigt). Für *CaATM-like* konnte bezüglich der XopG-Interaktion keine Aussage getroffen werden, da die Synthese der *Bait*- oder *Prey*-Proteine mittels Immunoblot nicht nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Joka2-ATG8-Interaktion sowie die Dimerisierung von LaminC mittels Split-TALE-System bestätigt wurde. Untersuchungen zur XopG-Interaktion und damit verbundene Optimierungsschritte konnten aus zeitlichen Gründen nicht beendet werden. Daher werden die Ergebnisse des Split-TALE-Systems in der Diskussion nicht erörtert und es wird an dieser Stelle kurz auf zukünftige Experimente eingegangen. So könnten N- und C-terminale Verkürzungen des *Bait*-Proteins einerseits mögliche Hintergrundaktivitäten reduzieren und andererseits minimale Proteingrößen erzielen, die eine Detektion im Immunoblot erleichtern. Schreiber *et al.* (2015) zeigten, dass sich eine Verkürzung der NTR von AvrBs3, z. B.  $\Delta N63$ , nicht auf die Genaktivierung auswirkt. In Humanzellen wiesen TALE-Derivate mit verkürzter CTR (C95 und C17) und Fusion an die VP16-AD vergleichbare Aktivitäten wie die vollständige CTR auf (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011). Hingegen führten Verkürzungen der CTR von AvrBs3 zur reduzierten Genaktivierung (Schreiber *et al.*, 2015). Folglich sollten *Bait*-Konstrukte mit verschiedenen N- und C-terminale Verkürzungen (z. B. AvrBs3-Module:  $\Delta N120$ ,  $\Delta N92$ ,  $\Delta N63$ , C46 oder C17) generiert und deren Einfluss auf die Split-TALE-vermittelte Genaktivierung getestet werden. In zukünftigen Experimenten sollten kurze AS-Linker verwendet werden, welche die einzelnen Interaktionspartner mit den funktionellen Domänen (CTR oder AD) der *Bait* bzw. *Prey*-Proteinen verknüpfen, um sterische Störungen zu vermeiden und so eine mögliche verstärkte Genaktivierung zu erzielen. Beispielsweise könnten GS-Linker Flexibilität sowie Stabilität bieten und eine Mobilität zwischen den Proteindomänen ermöglichen (Chen *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde keine Split-TALE-vermittelte HR-Induktion gezeigt (Abbildung 10). Ein qualitativer Interaktionsnachweis mittels Split-TALE-System könnte eine schnelle und effiziente Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in planta* darstellen. Daher sollten Reporterkonstrukte mit multiplen EBEs und dem Promotor *pBs3*, fusioniert an die kodierende Sequenz des Resistenzgens *Bs3*, generiert werden, um möglicherweise eine verstärkte Genaktivierung zu erzielen.

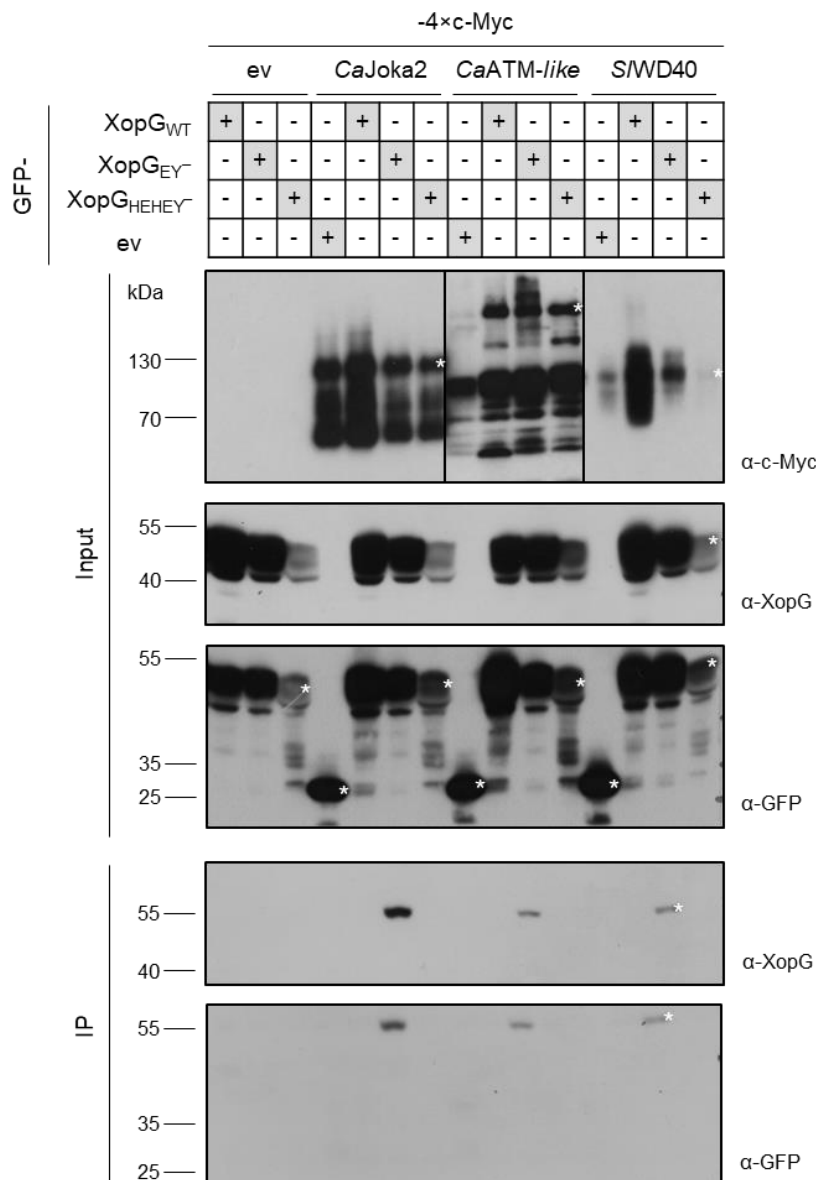
Optimiert besitzt das Split-TALE-System großes Potential, um als zukünftige Methode für den quantitativen als auch qualitativen Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in planta* genutzt zu werden.

### 3.1.5.2 CaJoka2, SMD40 und CaATM-like interagieren *in planta* mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup>

Die Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Um die Interaktion von XopG mit den Interaktoren in der Pflanze zu überprüfen, wurde *xopG* und je einer der zu untersuchenden Interaktoren unter Kontrolle des 35S-Promotors in *N.b. Agrobacterium*-vermittelt ko-exprimiert. Mittels *magnetic beads* ( $\alpha$ -c-Myc) wurden die c-Myc-markierten Interaktoren immobilisiert. Die Totalextrakte (Input) und die Eluate (IP) der Ko-IP wurden in Immunoblots unter Verwendung c-Myc-, XopG und GFP-spezifischer Antikörper analysiert.

In Vorexperimenten dieser Arbeit wurde auf eine Interaktion der pflanzlichen Proteine mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup> getestet. CaJoka2, SMD40 und CaATM-like ko-immunpräzipitierten mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>. Keine XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>-Interaktion wurde mit SIDUF869, CaTDI-65 und SLHW nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), sodass diese Proteine nicht weiter bearbeitet wurden.

Im Folgenden wurde die Interaktion von XopG und Derivaten mit den verbliebenen drei Interaktoren untersucht (Abbildung 17). Als Negativkontrolle diente die Ko-Synthese mit GFP bzw. 4xc-Myc. Alle Fusionsproteine waren mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) im Totalextrakt detektierbar. Neben den Vollängen-Proteinen wurden auch mögliche Degradationsprodukte detektiert (Input; Abbildung 17). GFP-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> ko-immunpräzipitierte mit CaJoka2-4xc-Myc, CaATM-like-4xc-Myc und SMD40-4xc-Myc. Dagegen erfolgte keine Interaktion mit GFP-XopG<sub>WT</sub>, GFP-XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> oder GFP (IP; Abbildung 17).



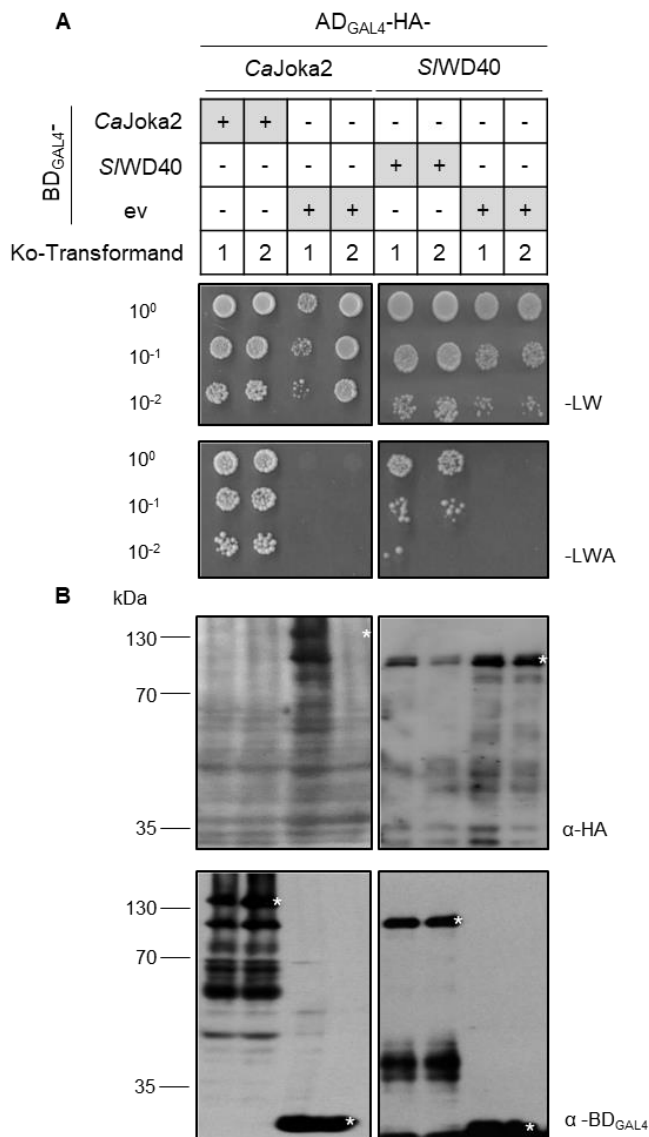
**Abbildung 17: *In planta* interagieren CaJoka2, S/WD40 und CaATM-like mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup>.**

KoIP *in planta*. *xopG<sub>WT</sub>*, *xopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>* sowie *xopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub>* wurden mit den XopG-Interaktoren (*CaJoka2*, *S/WD40* und *CaATM-like*) *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des *35S*-Promotors in *N.b.* ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc. Nach 2 bis 3 Tagen wurde das Blattmaterial aufgeschlossen und der Totalextrakt mit *magnetic beads* ( $\alpha$ -c-Myc) inkubiert. Die Totalextrakte (Input) und die Eluate (IP) wurden in Immunoblots unter Verwendung c-Myc-, XopG und GFP-spezifischer Antikörper analysiert. Die Reinkubation der Membran mit dem GFP-spezifischen Antikörper erfolgte wie in 2.3.3 beschriebenen. Für deutlichere Signale der 4xc-Myc-markierten Interaktoren *CaJoka2*, *S/WD40* und *CaATM-like* (Input) wurden eine kurze (rechts und links) und längere (mittig) Exposition des Immunoblots ausgewählt. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine ( $\alpha$ -c-Myc-Blot,  $\alpha$ -XopG-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot) an. Weitere Signale sind vermutlich Degradationsprodukte. GFP-ev kodiert GFP und 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Somit wurde in der Pflanze eine spezifische XopG-Interaktion für *CaJoka2*, *CaATM-like* und *S/WD40* bestätigt. Da keine Interaktion mit der XopG-Variante *HEHEY<sup>-</sup>* nachgewiesen wurde, ist eine Interaktion *in planta* vermutlich abhängig von der Zink-Koordination.

### 3.1.6 Bilden die XopG-Interaktoren CaJoka2, SWD40 und CaATM-like Proteinkomplexe?

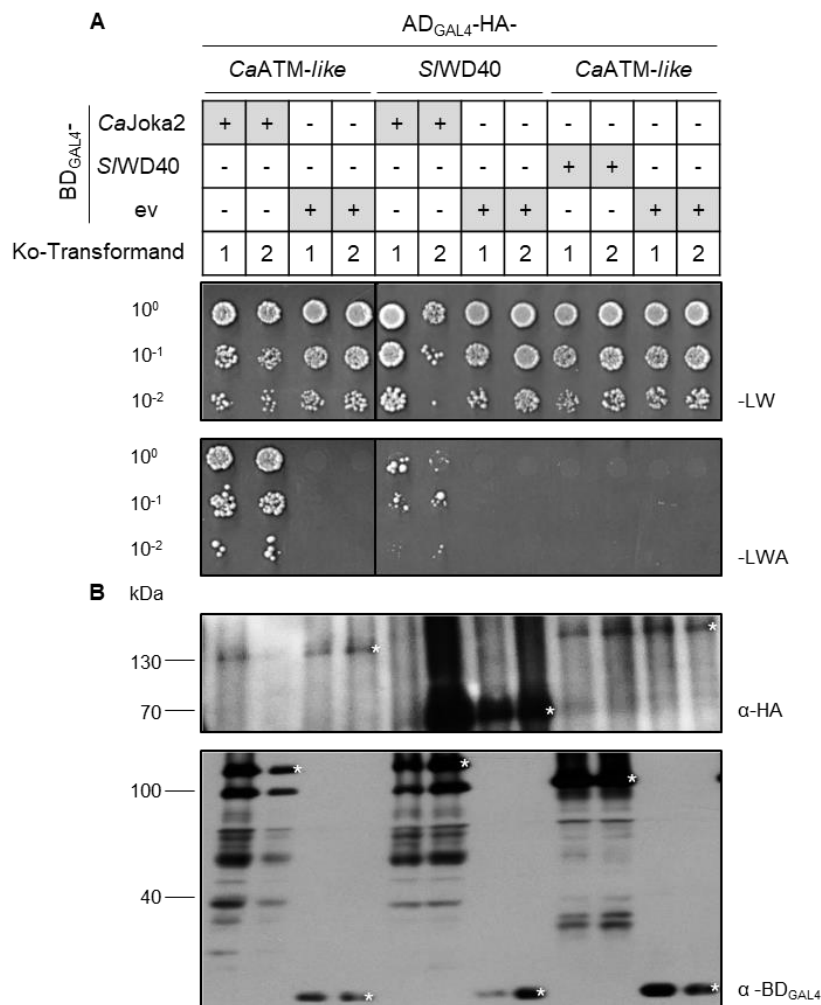
Der selektive Autophagie-Kargo-Rezeptor Joka2 aus *Solanaceae* bildet Homodimere aus (Zientara-Rytter *et al.*, 2011; Zientara-Rytter & Sirko, 2014a; Dagdas *et al.*, 2016). WD40 gehört zur Transducin/WD40-*repeat*-Protein-Superfamilie, die kurze WD40 (Tryptophan, Aspartat)-Motive (40 AS) aufweisen. Diese Motive dienen als *scaffold* für Protein-Interaktionen (Neer *et al.*, 1994; Li & Roberts, 2001; Smith, 2008). Daher stellte sich die Frage, ob die XopG-Interaktoren aus Paprika bzw. Tomate homodimerisieren bzw. Heterokomplexe ausbilden können. Hierzu wurden Interaktionsstudien in Hefe durchgeführt. Der Spezifitätstest erfolgte wie in 3.1.3 beschrieben. Alle getesteten Ko-Transformanden zeigten Wachstum auf dem Selektionsmedium -LW (Transformationskontrolle). Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurde zusätzlich das Wachstum der BD<sub>GAL4</sub>-Ko-Transformanden analysiert (Abbildung 18 und 19). Die potentielle Homodimerisierung wurde für CaJoka2 und SWD40 analysiert, jedoch nicht für CaATM-like, da das CaATM-like-Köderkonstrukt zu einer Autoaktivierung der Reporter gene führte (Abbildung 18; Daten nicht gezeigt). Wie erwartet, wuchsen die CaJoka2-Ko-Transformanden auf -LWA, d. h. Joka2 dimerisierte. Dies wurde auch für SWD40 beobachtet (Abbildung 18 A). Im Immunoblot waren alle Köder- und Beuteproteine mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) nachweisbar (Abbildung 18 B).



**Abbildung 18: CaJoka2 sowie S/WD40 bilden in Hefe Homodimere aus.**

(A) Für den Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden analysiert. (B) Die Synthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine wurde mit BD<sub>GAL4</sub>- bzw. HA-spezifischem Antikörper mit mittels Immunoblot analysiert. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen ( $\alpha$ -HA-Blot bzw.  $\alpha$ -BD<sub>GAL4</sub>-Blot). Weitere Signale stellen vermutlich Degradationsprodukte dar. BD<sub>GAL4</sub>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zwei- bis dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Als nächstes wurden die XopG-Interaktoren auf Ausbildung von Heterokomplexen getestet. Dabei zeigte sich, dass sowohl *CaATM-like* als auch S/WD40 mit CaJoka2 interagieren (Abbildung 19 A). Jedoch gab es Wachstumsunterschiede zwischen den Ko-Transformanden, d. h. die Interaktion zwischen CaJoka2 und S/WD40 scheint schwächer zu sein als zwischen CaJoka2 und *CaATM-like*. Es war keine Interaktion zwischen *CaATM-like* und S/WD40 detektierbar (Abbildung 19 A). Alle Köder- und Beuteproteine wurden mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) detektiert (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: CaATM-like und SMD40 interagieren mit CaJoka2 in Hefe.**

(A) Für den Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungsstufen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden untersucht. (B) Mittels Immunoblot wurde die Synthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine mit BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup> bzw. HA-spezifischem Antikörper analysiert. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine (α-HA-Blot bzw. α-BD<sub>GAL4</sub>-Blot) an. BD<sub>GAL4</sub>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Weitere Signale stellen mögliche Degradationsprodukte dar. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Zusammenfassend zeigten Studien in Hefe, dass die XopG-Interaktoren CaJoka2 sowie SMD40 Homodimere und CaJoka2 Heterokomplexe mit SMD40 bzw. CaATM-like ausbilden.

### 3.1.7 Biologische Relevanz der pflanzlichen XopG-Interaktoren

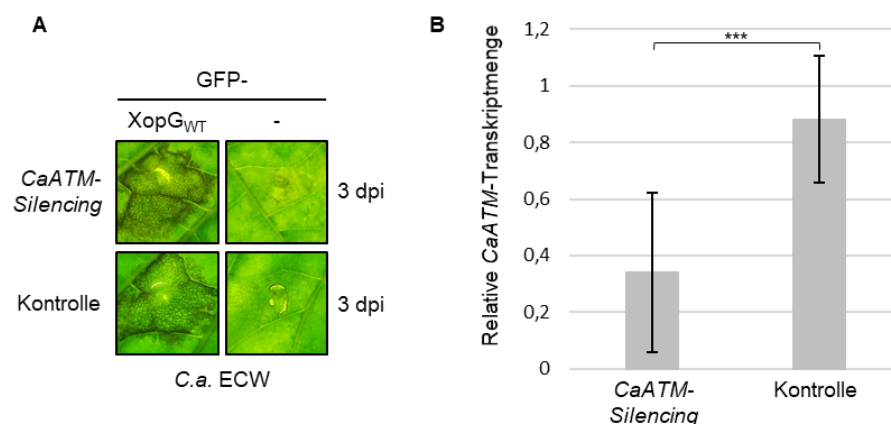
In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass XopG nach Expression *via Agrobacterium* einen schnellen Zelltod in *C. annuum* (*C.a.*) ECW und *N. tabacum* (*N.t.*) induziert (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013; Adlung *et al.*, 2016). Um die biologische Relevanz der verifizierten XopG-Interaktoren (CaJoka2, SMD40 und CaATM-like) für den XopG-vermittelten Zelltod zu untersuchen, wurde ein VIGS von *Joka2*, *WD40* und *ATM-like* in *C.a.* ECW durchgeführt.



### 3.1.7.1 Gen-silencing von pflanzlichen XopG-Interaktoren in *C. annuum*

Die VIGS-Experimente erfolgten mittels TRV-Konstrukten in *C. annuum*. Dazu wurden die *Agrobacterium*-Stämme, welche die Plasmide pTRV1 und pTRV2a::*CaATM-like*, pTRV2a::*CaWD40* oder pTRV2a::*CaJoka2* trugen, in die Keimblätter von ECW-Pflanzen ko-inokuliert. Kontrollpflanzen wurden mit *Agrobacterium*-Stämmen behandelt, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a::*gfp* trugen. Nach 7 bis 8 Wochen wurde *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *gfp* (Negativkontrolle) *Agrobacterium*-vermittelt in den entsprechenden Pflanzen exprimiert. Die Transkriptmenge der Interaktor-Gene *ATM-like*, *WD40* oder *Joka2* wurde mittels qRT-PCR in den *silencing*-Pflanzen sowie Kontrollpflanzen ermittelt.

Der durch XopG-induzierte Zelltod 3 dpi war in den *CaJoka2*- und *CaWD40-silencing*-Pflanzen schwächer oder stärker im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. In vier unabhängigen Experimenten wurden keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten. Trotz vergleichbarer RNA-Mengen korrelierten die Reaktionen nicht mit den erhaltenen relativen Transkriptmengen von *CaJoka2* oder *CaWD40* (Daten nicht gezeigt). Somit ist unklar, ob die untersuchten XopG-Interaktorgene für die Zelltodausbildung durch XopG relevant sind. Die Reduzierung der Transkriptmenge von *CaATM-like* mittels VIGS hatte keinen offensichtlichen Einfluss auf den XopG-vermittelten Zelltod (Abbildung 20 A und B)



**Abbildung 20: Silencing von *CaATM-like* in ECW-Paprikapflanzen.**

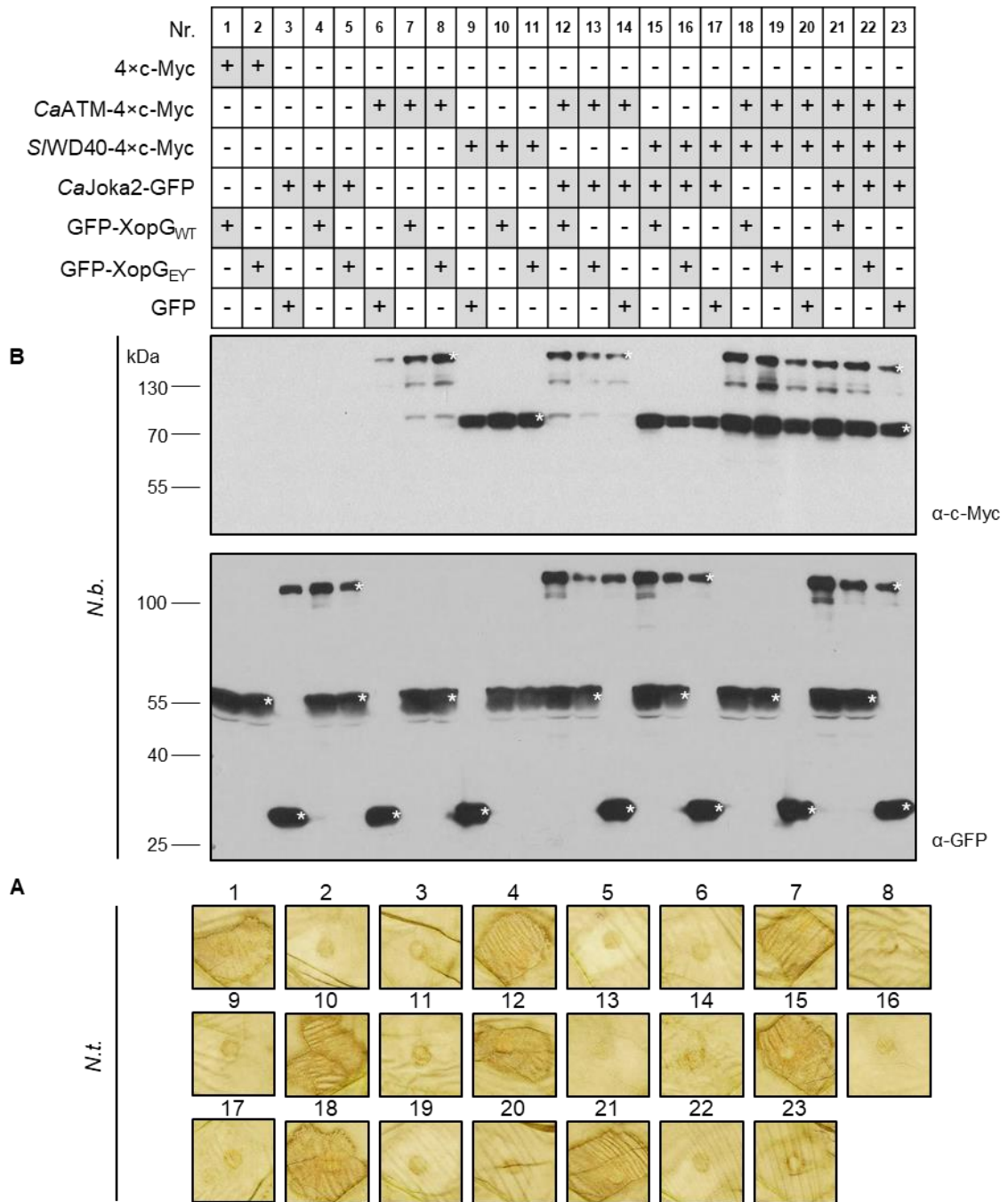
(A) In den Versuchspflanzen wurden *gfp-xopG<sub>WT</sub>* sowie *gfp* transient *via Agrobacterium* und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. 3 dpi wurde der XopG-induzierte Zelltod phänotypisch untersucht und dokumentiert, dabei wurde zur besseren Visualisierung ein Lichttisch verwendet. Gezeigt sind repräsentative Pflanzenreaktionen von *silencing*- und Kontrollpflanzen. (B) Quantifizierung der Transkriptmenge von *CaATM-like* in *silencing*-Pflanzen, verglichen mit den Kontrollpflanzen. Es handelt sich um die kombinierten Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Für die Berechnung der relativen Transkriptmenge von *CaATM-like* wurde die erhaltene Transkriptmenge der Kontrollpflanzen als 1 definiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ) gibt die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Unterschieden der Transkriptmengen an.

### 3.1.7.2 Überexpression der Interaktoren *CaJoka2*, *SWD40* und *CaATM-like* hat keinen Einfluss auf den XopG-induzierten Zelltod

Als nächstes sollte getestet werden, ob eine transiente Überexpression von *CaJoka2*, *SIWD40* und *CaATM-like* unter Kontrolle des 35S-Promotors den XopG-induzierten Zelltod beeinflusst. Hierzu wurde *xopG<sub>WT</sub>* mit bis zu drei XopG-Interaktoren *Agrobacterium*-vermittelt und in *C.a.* ECW, *N.b.* und *N.t.* ko-exprimiert. In Vorversuchen im Rahmen dieser Arbeit induzierten *CaJoka2*, *SWD40* oder *CaATM-like* keinen Zelltod in *C.a.* ECW, *N.t.* oder *N.b.* nach transienter Expression (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrollen dienten GFP, 4xc-Myc und GFP-XopG<sub>EY</sub>. Nach Ko-Expression wurde der XopG-induzierte Zelltod 1,5 bis 2 dpi phänotypisch in *C.a.* ECW und *N.t.* analysiert.

Die Analyse in *N.t.* (Abbildung 21 A) und *C.a.* ECW (Daten nicht gezeigt) ergab keine Unterschiede in der Zelltodinduktion. Da die Synthese einiger Fusionsproteine in *C.a.* ECW oder *N.t.* 1 dpi noch nicht detektierbar war und spätere Analysen des Blattmaterials aufgrund beginnender Zelltodinduktion durch XopG nicht sinnvoll waren, wurde zum Nachweis der Proteine infiziertes Blattmaterial von *N.b.* verwendet (2 dpi). Im Immunoblot wurden alle Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) detektiert (Abbildung 21 B).

Folglich haben die Interaktoren *CaJoka2*, *SWD40* und *CaATM-like* unter den gewählten Bedingungen keinen sichtbaren Einfluss auf den XopG-induzierten Zelltod.



**Abbildung 21: Ko-Expression von *CaJoka2*, *SIWD40* und *CaATM-like* haben keinen Einfluss auf den XopG-induzierten Zelltod in *N. tabacum*.**

*Agrobacterium*-vermittelte Ko-Expression von *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *xopG<sub>EY</sub>* mit den jeweiligen Interaktoren *CaJoka2*, *SIWD40* und *CaATM-like* unter Kontrolle des 35S-Promotors in *N.b.* und *N. tabacum* (*N.t.*). Die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc dienten als Negativkontrollen. (A) XopG-induzierter Zelltod in Blättern von *N.t.* Zur besseren Visualisierung wurden die Blätter 2 dpi in Ethanol entfärbt. Die Nummerierung entspricht der in Abbildung 21 B. (B) Immunoblot-Analyse von Proteinextrakten aus infiziertem Blattmaterial *N.b.* 2 dpi mit c-Myc- und GFP-spezifischem Antikörper. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen ( $\alpha$ -Myc-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot). Weitere Signale stellen vermutlich Degradationsprodukte dar. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Resultaten durchgeführt.

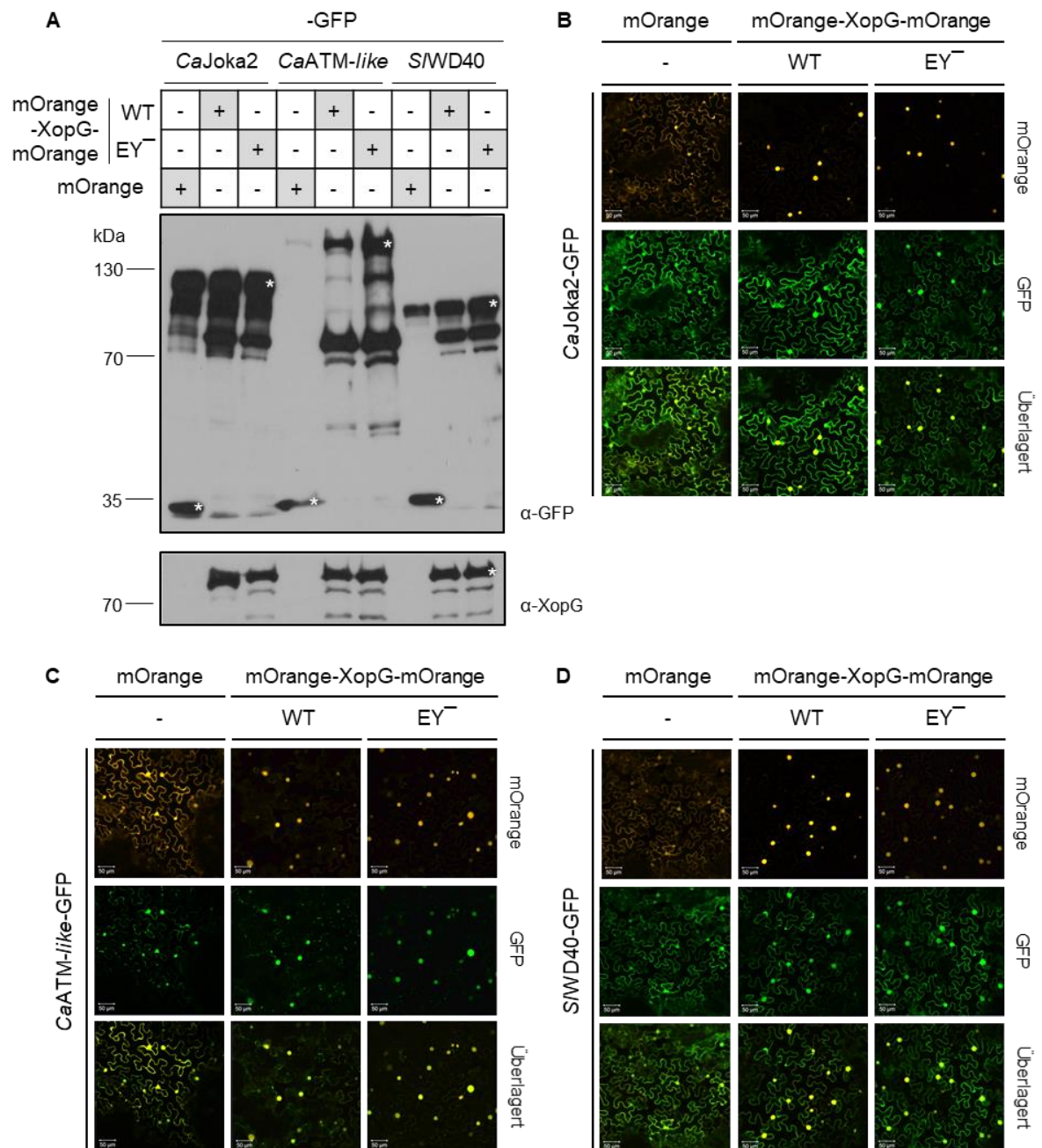
### 3.2 Untersuchungen zur möglichen proteolytischen Aktivität von XopG in der Pflanze

XopG fungiert vermutlich als Zink-Metalloprotease in der pflanzlichen Zelle. In dieser Arbeit wurden die Interaktion von XopG mit *CaJoka2*, *CaATM-like* und *SMD40* in der Pflanze bestätigt. Interessanterweise interagieren diese Interaktoren sowohl in Hefe als auch *in planta* nur mit der XopG-Variante EY<sup>-</sup>. Da XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> eine vermutlich inaktive Variante darstellt, könnte es mit Substraten interagieren, diese jedoch nicht spalten. Aufgrund dessen stellen *CaJoka2*, *CaATM-like* und *SMD40* potentielle XopG-Substrate dar, die weiter *in planta* untersucht werden sollten.

#### 3.2.1 XopG ko-lokalisiert mit *CaJoka2*, *CaATM-like* oder *SMD40* im pflanzlichen Zellkern

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass XopG nach transienter Expression *via Agrobacterium* im pflanzlichen Zellkern und vereinzelt im Nukleolus lokalisiert ist (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten Studien in *N.b.* eine Lokalisierung der XopG-Interaktoren ausschließlich im Zellkern (*CaATM-like*) bzw. im Zellkern und im Zytoplasma (*CaJoka2* und *SMD40*) (Daten nicht gezeigt). Nach transienter Ko-Synthese von XopG mit einem der Interaktoren in der Pflanze sollte analysiert werden, ob die Anwesenheit von XopG zu Unterschieden in der Lokalisierung oder Proteinakkumulation von *CaJoka2*, *CaATM-like* und *SMD40* führt. Dabei sollte auch auf eine mögliche Ko-Lokalisierung von XopG mit den Interaktoren getestet werden.

Dazu wurden *xopG<sub>WT</sub>*, *xopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>* oder *mOrange* und ein Interaktor transient *via Agrobacterium* ko-exprimiert. Um eine Ko-Lokalisierung zu untersuchen, wurden die fluoreszierenden Proteine GFP sowie mOrange als Epitope verwendet. XopG wurde N- und C-terminal mit mOrange fusioniert, um eine Diffusion zwischen Zellkern und Zytoplasma aufgrund der Proteingröße (Tabelle 17) auszuschließen. Als Kontrollen dienten mOrange, welches im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, und die Variante XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>, die vermutlich nicht proteolytisch aktiv ist. In Vorversuchen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mOrange-XopG<sub>WT</sub>-mOrange und mOrange-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>-mOrange im pflanzlichen Zellkern und teilweise im Nukleolus lokalisiert sind. Zudem zeigte eine Ko-Synthese mit GFP keine Auswirkung auf die Lokalisierung der beiden Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt). Im Immunoblot wurden alle Fusionsproteine mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) nachgewiesen (Abbildung 22 A).



**Abbildung 22: Ko-Lokalisierung von XopG mit CaJoka2, CaATM-like sowie SWD40 im pflanzlichen Zellkern.**

In *N.b.* wurden *mOrange-xopG<sub>WT</sub>-mOrange*, *mOrange-xopG<sub>EY</sub>-mOrange* oder *mOrange* mit dem jeweiligen Interaktor *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. (A) Für die Immunoblot-Analyse wurde das Blattmaterial geerntet (2 dpi) und der Gesamtproteinextrakt unter Verwendung GFP- und XopG-spezifischer Antikörper untersucht. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine ( $\alpha$ -GFP-Blot bzw.  $\alpha$ -XopG-Blot) an. Weitere Signale sind vermutlich Degradationsprodukte. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. (B-D) 2 dpi wurde das Blattmaterial mikroskopisch auf GFP- bzw. mOrange-Fluoreszenz mittels konfokalem Laser-Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Der Größenstandard entspricht 50  $\mu$ m. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

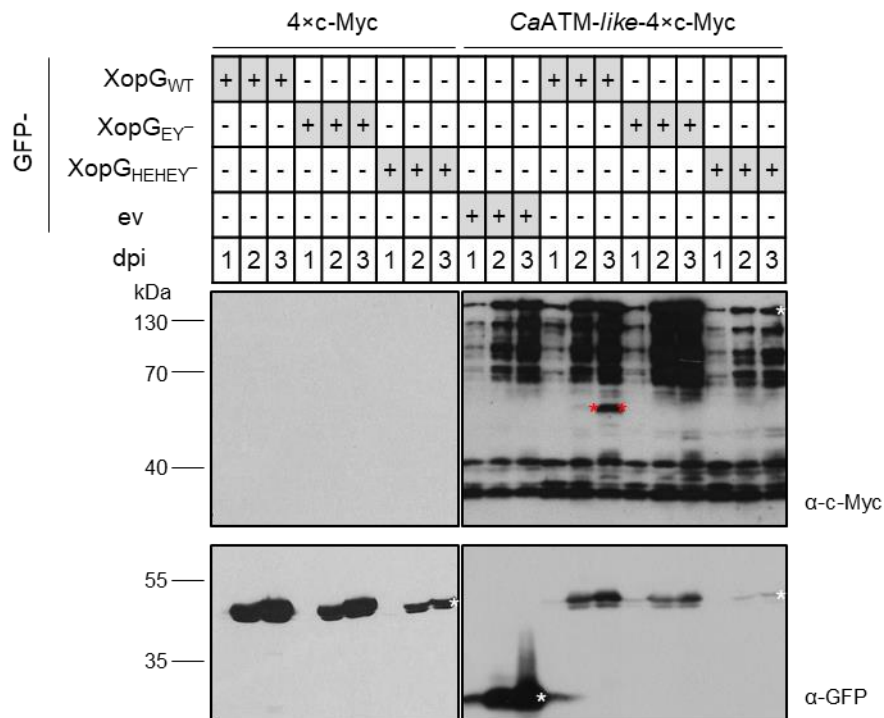
Interessanterweise scheint die Proteinakkumulation von *CaATM-like*-GFP und *SWD40*-GFP leicht erhöht zu sein, wenn *XopG<sub>WT</sub>* oder *XopG<sub>EY</sub>* ko-synthetisiert wurden. Spezifische Spaltprodukte von *CaJoka2*, *CaATM-like* und *SWD40* wurden in Anwesenheit von XopG nicht detektiert (Abbildung 22 A). Die mikroskopische Analyse des Blattmaterials erfolgte 2 dpi (Abbildung 22 B-D). Die Untersuchung der GFP- und mOrange-Fluoreszenz

ergab, dass XopG<sub>WT</sub> bzw. XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> mit CaJoka2, CaATM-like oder SMD40 im Zellkern ko-lokalisieren. Für CaATM-like wurde neben der GFP-Fluoreszenz im Zellkern auch ein punktförmiges Fluoreszenzmuster nach Ko-Synthese mit mOrange-XopG<sub>WT</sub>-mOrange, mOrange-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub>-mOrange oder mOrange beobachtet. Es gab keine Unterschiede bezüglich einer veränderten Lokalisierung der Interaktoren in Anwesenheit von XopG<sub>WT</sub> (Abbildung 22 B-D).

### 3.2.2 CaATM-like und SMD40 stellen mögliche XopG-Substrate dar

Da es 2 dpi keine Hinweise auf eine Proteaseaktivität von XopG<sub>WT</sub> *in planta* gab (Abbildung 22 A), sollten weitere Zeitpunkte getestet werden. Die Proteinextrakte wurden 1, 2 und 3 dpi mittels Immunoblot analysiert. Als Kontrollen dienten neben GFP und 4xc-Myc auch die vermutlich inaktiven XopG-Varianten EY<sup>-</sup> und HEHEY<sup>-</sup> (Abbildung 23 und 24). In der Immunoblot-Analyse wurden alle Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) nachgewiesen (Abbildung 23 und 24).

CaATM-like wurde bei Ko-Synthese mit GFP-XopG<sub>WT</sub> ein spezifisches Signal 2 bis 3 dpi nachgewiesen, was vermutlich ein Spaltprodukt von CaATM-like darstellt. In Anwesenheit von GFP bzw. den XopG-Derivaten (EY<sup>-</sup> und HEHEY<sup>-</sup>) wurde kein CaATM-like-Spaltprodukt detektiert (Abbildung 23). Im Fall von CaJoka2 und SMD40 gab es keine Hinweise auf spezifische XopG<sub>WT</sub>-abhängige Spaltprodukte (Daten nicht gezeigt).

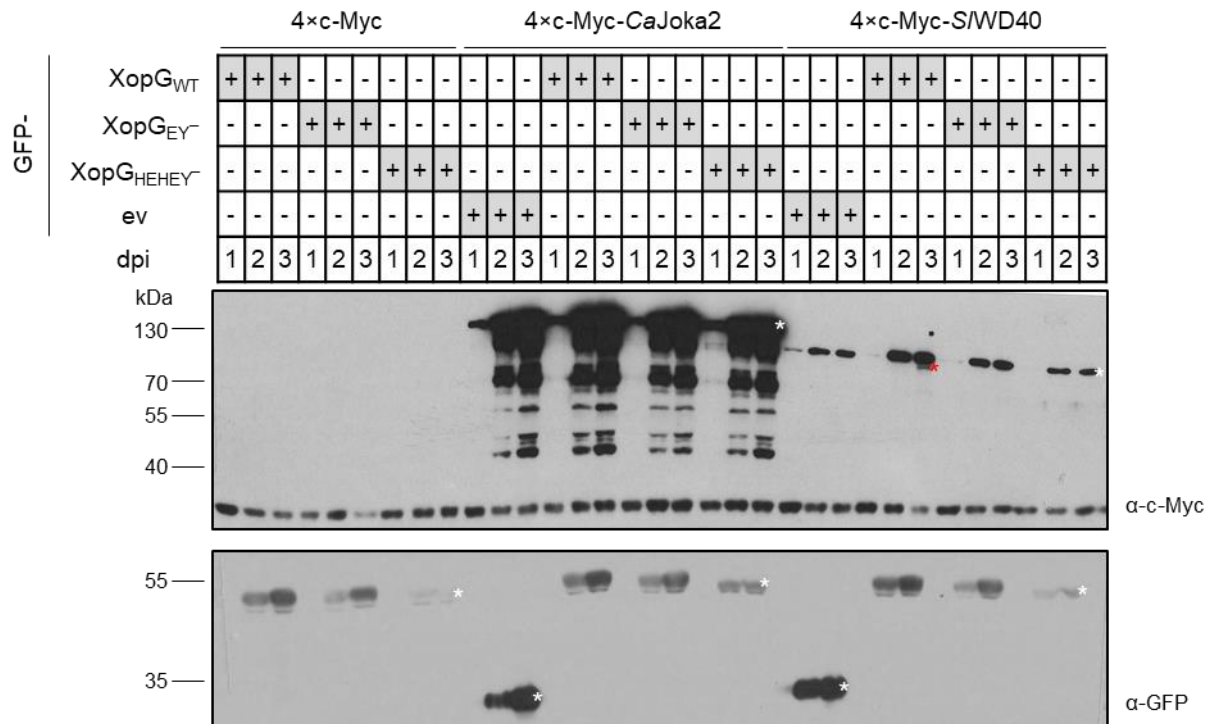


**Abbildung 23: Mögliche Spaltung von CaATM-like durch XopG<sub>WT</sub>.**

In *N.b.* wurden *gfp*, *gfp-xopG<sub>WT</sub>*, *gfp-xopG<sub>EY</sub>* oder *gfp-xopG<sub>HEHEY</sub>* mit *CaATM-like-4xc-myc* bzw. *4xc-myc* *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Das Blattmaterial wurde 1, 2 und 3 dpi geerntet und der Gesamtproteinextrakt immunologisch unter Verwendung von c-Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern analysiert. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im α-Myc-Blot bzw. α-GFP-Blot) oder kennzeichnen potentielle *CaATM-like*-Spaltprodukte (rot im α-Myc-Blot). GFP-ev kodiert GFP. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass mögliche Spaltprodukte wegen geringer molekularer Massen nicht im Immunoblot nachweisbar waren, wurde das Experiment mit N-terminal markierten *CaJoka2*- und *SMD40*-Proteinen wiederholt. Dabei wurde 3 dpi ein mögliches spezifisches *SMD40*-Spaltprodukt bei Ko-Synthese mit XopG<sub>WT</sub> detektiert. Dagegen wurde keine mögliche *CaJoka2*-Spaltung nachgewiesen (Abbildung 24).





**Abbildung 24: Mögliche Spaltung von SMD40 durch XopG<sub>WT</sub>.**

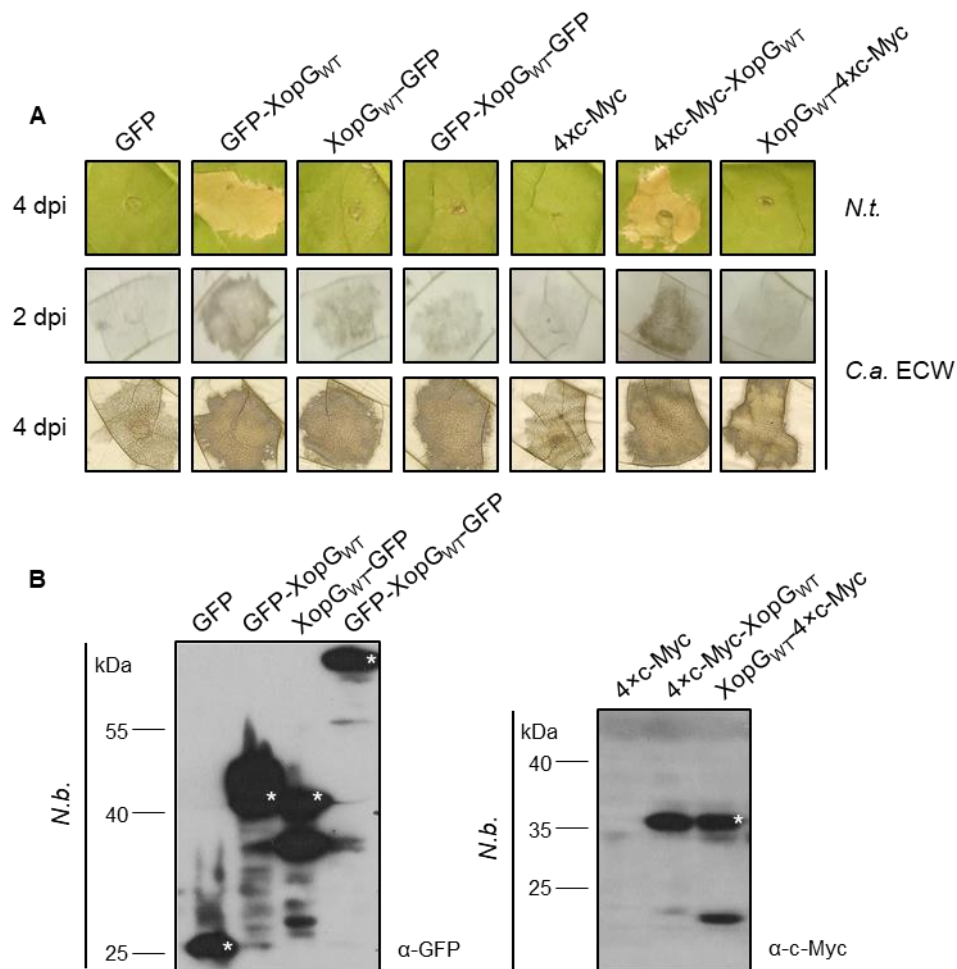
In *N.b.* wurden *gfp*, *gfp-xopG<sub>WT</sub>*, *gfp-xopG<sub>EY</sub>* oder *gfp-xopG<sub>HEHEY</sub>* mit *4xc-myc-CaJoka2*, *4xc-myc-SW40* bzw. *4xc-myc Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des *35S*-Promotors ko-exprimiert. Das Blattmaterial wurde 1, 2 und 3 dpi geerntet und der Gesamtproteinextrakt mittels Immunoblot unter Verwendung von c-Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern untersucht. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im α-Myc-Blot bzw. α-GFP-Blot) oder kennzeichnen potentielle SMD40-Spaltprodukte (rot im α-Myc-Blot). GFP-ev kodiert GFP. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass XopG als Zink-Metalloprotease wirkt und *CaATM-like* und SMD40 potentielle XopG-Substrate darstellen.

### 3.2.3 Ein C-terminales Epitop an XopG reduziert die proteolytische Aktivität

Die Interaktionsstudien dieser Arbeit ergaben unterschiedliche Ergebnisse, wenn *xopG<sub>WT</sub>* mit einem N- oder C-terminalen Epitop exprimiert wurde. So interagierte N-terminal markiertes XopG<sub>WT</sub>-Protein nicht mit *CaJoka2*, *CaATM-like* oder SMD40 in Hefe (Abbildung 4-6) oder *in planta* (Abbildung 17). Hingegen zeigten GST-Pull-down-Experimente, dass eine direkte Interaktion zwischen *CaJoka2*, *CaATM-like* sowie SMD40 mit XopG<sub>WT</sub> stattfand, wenn XopG<sub>WT</sub> C-terminal mit einem Strep-Epitop markiert war (Abbildung 7 und 8). Daher wurde spekuliert, dass eine C-terminale Fusion einen negativen Einfluss auf die proteolytische XopG-Aktivität haben könnte.





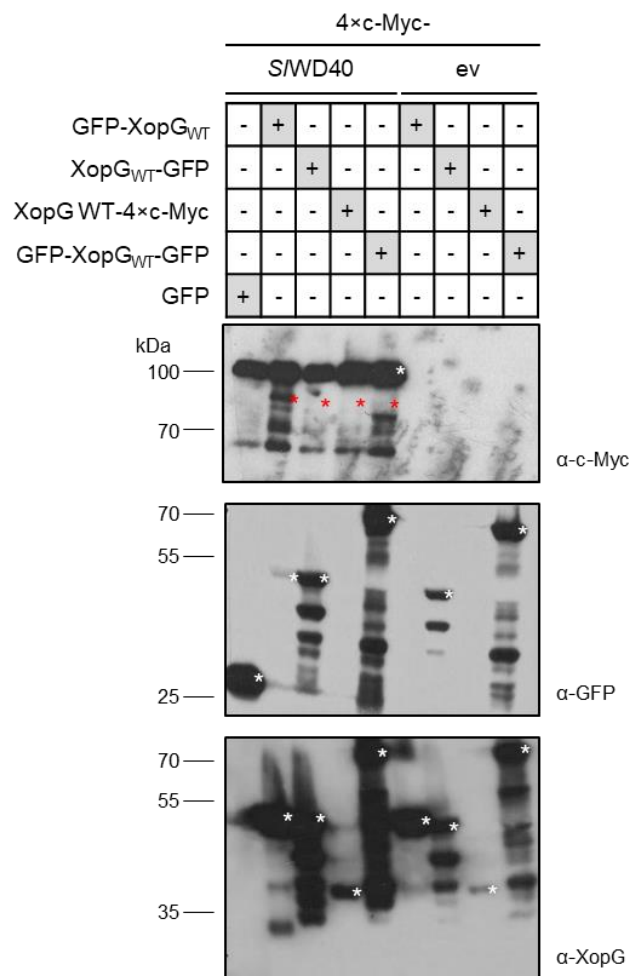
**Abbildung 25: XopG-vermittelte Zelltodreaktionen in *N. tabacum* und *C. annuum* unter Verwendung N- und C-terminale Epitope.**

*Agrobacterium*-vermittelte Expression von *xopG<sub>WT</sub>* mit N- und/oder C-terminalen GFP-Epitop unter Kontrolle des 35S-Promotors in *N. tabacum*, *C. annuum* (*C.a.*) ECW und *N.b.* Als Negativkontrollen dienten GFP und 4xc-Myc. (A) XopG-induzierter Zelltod in *N. tabacum* und *C.a.* ECW 2 bis 4 dpi. Zur besseren Visualisierung wurden die *C.a.*-Blätter in Ethanol entfärbt. (B) Die Immunoblot-Analyse der Gesamtproteinextrakte erfolgte in *N.b.* 2 dpi unter Verwendung GFP- und c-Myc-spezifischer Antikörper. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine ( $\alpha$ -Myc-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot) an. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens zweimal mit ähnlichen Resultaten durchgeführt.

Um dies zu untersuchen, sollte sowohl die Zelltodinduktion in *C.a.* ECW und in *N. tabacum* als auch die Proteolyse der Substrate *CaATM-like* und *SMD40* durch Ko-Synthese mit N- bzw. C-terminalem markiertem XopG verglichen werden. Als Kontrollen dienten GFP, 4xc-Myc und Xop<sub>GWT</sub> mit N- sowie C-terminalem Epitop. Die phänotypische Analyse des XopG-induzierten Zelltodes 2 bis 4 dpi in *N. tabacum* und *C.a.* ECW zeigte, dass ausschließlich Xop<sub>GWT</sub> mit einem N-terminalen GFP-Epitop einen Zelltod in *N. tabacum* auslöste, während für Xop<sub>GWT</sub>-GFP, GFP-Xop<sub>GWT</sub>-GFP und GFP keine Zelltodreaktion detektierbar war (Abbildung 25 A). Demgegenüber lösten alle drei XopG-Fusionsproteine Zelltod in *C.a.* ECW aus, wobei Xop<sub>GWT</sub>-GFP und GFP-Xop<sub>GWT</sub>-GFP im Vergleich zu GFP-Xop<sub>GWT</sub> einen schwächeren Zelltod induzierten (2 dpi). Eine durch *Agrobacterium*-ausgelöste Abwehrreaktion (PTI) war 4 dpi sichtbar (Abbildung 25 A). Das Experiment wurde zusätzlich unter Verwendung eines 4xc-Myc-Epitops durchgeführt, wobei sich ähnliche Ergebnisse

zeigten (Abbildung 25 A). Die Proteinsynthese der XopG-Fusionsproteine war 1 dpi nicht in *N.t.* oder *C.a.* ECW detektierbar. Da durch beginnende XopG-Zelltodreaktionen 1,5 bis 2 dpi die Analyse des Blattmaterials nicht sinnvoll war, wurde für die Immunoblot-Analyse infiziertes Blattmaterial aus *N.b.* verwendet (Abbildung 25 B). Alle Fusionsproteine waren mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot nachweisbar (Abbildung 25 B). Folglich hat ein C-terminales Epitop einen negativen Einfluss auf die Auslösung einer Zelltodreaktion durch XopG<sub>WT</sub> in Paprika- und Tabakpflanzen.

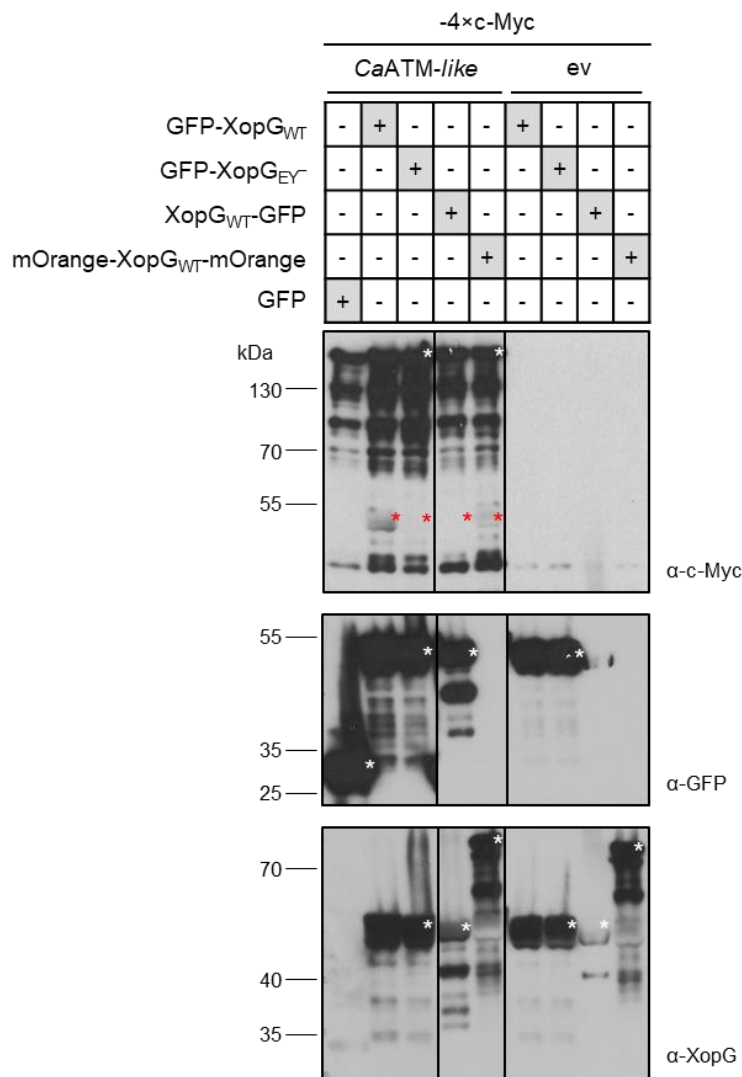
Als nächstes wurde der Einfluss eines C-terminalen Epitops auf die proteolytische XopG-Aktivität untersucht. Hierfür wurden *xopG<sub>WT</sub>* mit N- und/oder C-terminalem Epitop (GFP, 4xc-Myc oder mOrange) sowie *4xc-myc-SIWD40* oder *CaATM-like-4xc-myc* via *Agrobacterium* in *N.b.* ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten GFP und 4xc-Myc. Alle markierten Fusionsproteine wurden mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot 3 dpi nachgewiesen (Abbildung 26 und 27). Bei der Ko-Synthese mit GFP-XopG<sub>WT</sub> wurde ein spezifisches SMD40-Spaltprodukt detektiert. Bei längerer Exposition war ein schwaches Signal des Spaltproduktes bei der Ko-Synthese mit XopG<sub>WT</sub>-GFP, XopG<sub>WT</sub>-4xc-Myc und GFP-XopG<sub>WT</sub>-GFP detektierbar (Abbildung 26).



**Abbildung 26: C-terminal markiertes XopG weist eine schwächere Proteaseaktivität für S/WD40 auf.**

In *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* mit N- und/oder C-terminalem Epitop sowie *4xc-myc-S/WD40* *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des *35S*-Promotors ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten die Ko-Synthesen mit GFP bzw. *4xc-Myc*. Das Blattmaterial wurde 3 dpi geerntet und der Gesamtproteinextrakt wurde immunologisch unter Verwendung von c-Myc-, GFP- und XopG-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Reinkubation der Membran mit XopG-spezifischem Antikörper erfolgte wie in 2.3.3 beschriebenen. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im  $\alpha$ -Myc-Blot,  $\alpha$ -GFP-Blot bzw.  $\alpha$ -XopG-Blot) oder kennzeichnen S/WD40-Spaltprodukte (rot im  $\alpha$ -Myc-Blot). *4xc-Myc-ev* kodiert *4xc-Myc*. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Die gleiche Untersuchung wurde für *CaATM-like* durchgeführt. *XopG<sub>EY</sub>* diente als Kontrolle und anstelle des GFP-Epitops wurde *XopG<sub>WT</sub>*-mit N- und C-terminalem mOrange markiert. Bei der Ko-Synthese von *CaATM* mit GFP-*XopG<sub>WT</sub>* sowie mOrange-*XopG<sub>WT</sub>*-mOrange wurde ein spezifisches Spaltprodukt von *CaATM-like* nachgewiesen. In Anwesenheit von mOrange-*XopG<sub>WT</sub>*-mOrange war das Signal vom Spaltprodukt deutlich schwächer. Bei einer längeren Exposition des Immunoblots war ebenfalls ein sehr schwaches Signal detektierbar, wenn *XopG<sub>WT</sub>*-GFP bzw. *XopG<sub>EY</sub>* mit *CaATM-like* ko-synthetisiert wurden (Abbildung 27). Demzufolge hat ein C-terminal markiertes *XopG<sub>WT</sub>* eine schwächere Proteaseaktivität.



**Abbildung 27: C-terminal markiertes XopG weist eine schwächere proteolytische Aktivität für *CaATM-like* auf.**

Für die Untersuchung in *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* mit N- und/oder C-terminalem Epitop und *CaATM-like-4xc-myc* *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc dienten als Negativkontrollen. Das Blattmaterial wurde 3 dpi gewonnen und der Gesamteinextrakt wurde immunologisch mit c-Myc-, GFP- und XopG-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Reinkubation der Membran mit XopG-spezifischem Antikörper erfolgte wie in 2.3.3 beschriebenen. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im  $\alpha$ -Myc-Blot,  $\alpha$ -GFP-Blot bzw.  $\alpha$ -XopG-Blot) oder kennzeichnen *CaATM-like*-Spaltprodukte (rot im  $\alpha$ -Myc-Blot). 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

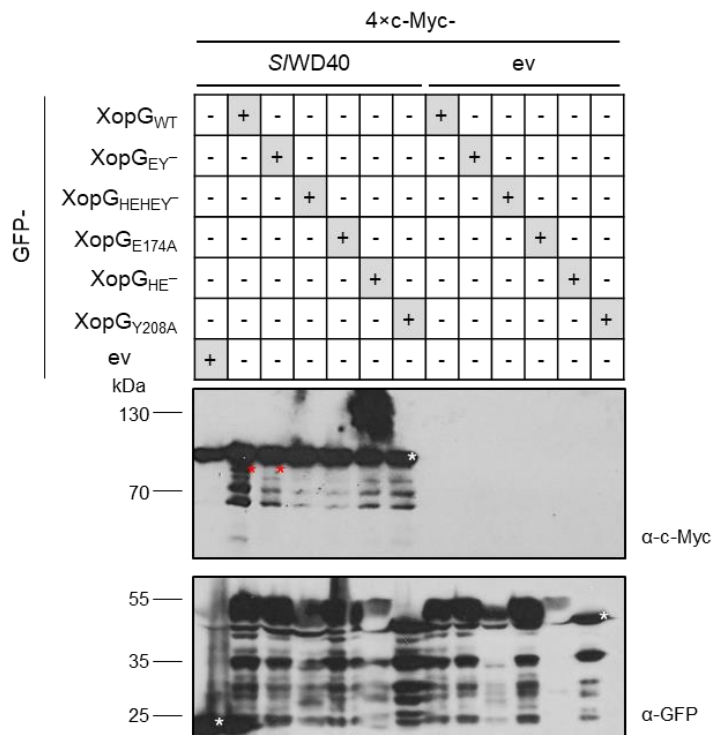
Zusammenfassend ist festzustellen, dass C-terminal markiertes XopG-Protein einerseits einen negativen Einfluss auf die Auslösung einer Zelltodreaktion in Paprika- sowie Tabakpflanzen hat und andererseits eine reduzierte proteolytische XopG-Aktivität aufweist. Für weitere Experimente wurde daher XopG mit einem N-terminalen Epitop verwendet.

### 3.2.4 Substitutionen im vorhergesagten katalytischen Zentrum von XopG beeinflussen dessen Proteaseaktivität

Mutationsstudien von Zink-Metalloproteasen, wie BoNT/A aus *C. botulinum* oder das Effektorprotein NleD aus EPEC, zeigten, dass die konservierten AS Glutamat (E224<sub>BoNT/A</sub> bzw. E143<sub>NleD</sub>; Koordination des H<sub>2</sub>O-Moleküls für den nukleophilen Angriff), Arginin (R363<sub>BoNT/A</sub>) und Tyrosin (Y366<sub>BoNT/A</sub>) (Positionierung und Stabilisierung des Substrates) eine wichtige Bedeutung für die katalytische Aktivität haben (Li *et al.*, 2000; Binz *et al.*, 2002; Breidenbach & Brunger, 2004; Baruch *et al.*, 2011; Creuzburg *et al.*, 2017). Das katalytische Zentrum in XopG wird vermutlich durch die AS H142, E143, H146, E174 sowie Y208 gebildet. H142, H146 und E174 sind wahrscheinlich für die Zink-Koordination verantwortlich, während E143 und Y208 eine Bedeutung für die Proteaseaktivität haben könnten (Abbildung 3 C). In vorangegangenen Arbeiten resultierten Substitutionen im postulierten katalytischen XopG-Zentrum im Verlust der Zelltodinduktion nach transienter Expression in *C.a.* ECW bzw. *N.t.* (Schonsky, 2013; Szczesny, Nagel, Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Da die konservierten AS wichtig für den XopG-induzierten Zelltod sind, stellte sich die Frage, ob dies auch für die proteolytische Aktivität von XopG gilt. Daher wurde die Stabilität von SMD40 und *CaATM-like* mit den verschiedenen XopG-Varianten EY<sup>-</sup> (E143Q/Y208F), HEHEY<sup>-</sup> (H142A/E143A/H146A/E174A/Y208A), HE<sup>-</sup> (H142A/E143A), E174A oder Y208A untersucht.

Für die *in planta*-Analyse wurden *xopG*<sub>WT</sub> bzw. *xopG*-Derivate mit *4xc-myc-SMD40* oder *CaATM-like-4xc-myc Agrobacterium*-vermittelt ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten GFP und *4xc-Myc*. Alle Fusionsproteine wurden mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot detektiert (Abbildung 28 und 29).

Für SMD40 wurden Spaltprodukte im Immunoblot detektiert, wenn GFP-XopG<sub>WT</sub> oder GFP-XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> ko-synthetisiert wurde. In Anwesenheit der XopG-Variante EY<sup>-</sup> war das Signal des Spaltproduktes wesentlich schwächer und nur nach längerer Exposition detektierbar. Bei Ko-Synthese mit den XopG-Varianten HEHEY<sup>-</sup>, HE<sup>-</sup>, E174A oder Y208A wurde kein SMD40-Spaltprodukt nachgewiesen (Abbildung 28).

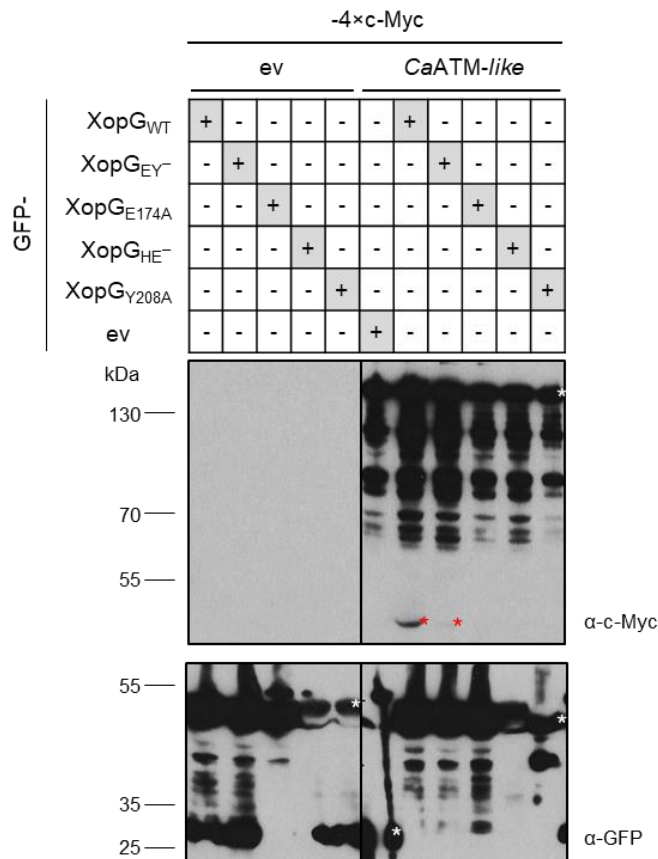


**Abbildung 28: Substitutionen im vorhergesagten katalytischen XopG-Zentrum führen zu einer stark reduzierten SWD40-Proteolyse.**

In *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *xopG*-Derivate mit 4xc-myc-SWD40 *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc. Das Blattmaterial wurde 3 dpi geerntet und der Gesamtproteinextrakt wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von c-Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern untersucht. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im  $\alpha$ -Myc-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot) oder kennzeichnen SWD40-Spaltprodukte (rot im  $\alpha$ -Myc-Blot). GFP-ev kodiert GFP und 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Für *CaATM-like* wurde lediglich in Anwesenheit von XopG<sub>WT</sub> und XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> ein Spaltprodukt im Immunoblot detektiert. Auch hier war das Signal bei der Ko-Synthese mit XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> deutlich schwächer. Es wurde kein *CaATM-like*-Spaltprodukt nachgewiesen, wenn die XopG-Varianten HE<sup>-</sup>, E174A oder Y208A ko-synthetisiert wurden (Abbildung 29).

Somit scheint die XopG-Variante EY<sup>-</sup> (Substitutionen E143Q und Y208F) eine stark verminderte Proteaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp XopG aufzuweisen. Die XopG-Varianten HEHEY<sup>-</sup>, HE<sup>-</sup>, E174A oder Y208A (mit Substitutionen zu Alanin) sind vermutlich katalytisch inaktiv. Die AS E143 und Y208 im postulierten katalytischen XopG-Zentrum könnten demnach eine wichtige Bedeutung für die Proteaseaktivität von XopG haben. Da keine Spaltung durch XopG<sub>E174A</sub> detektiert wurde, scheint E174 und damit vermutlich die Zink-Koordination im XopG-Protein essentiell für die Proteolyse von Substraten zu sein.



**Abbildung 29: Substitutionen im vorhergesagten katalytischen Zentrum von XopG resultieren in einer stark verminderten CaATM-like-Proteolyse.**

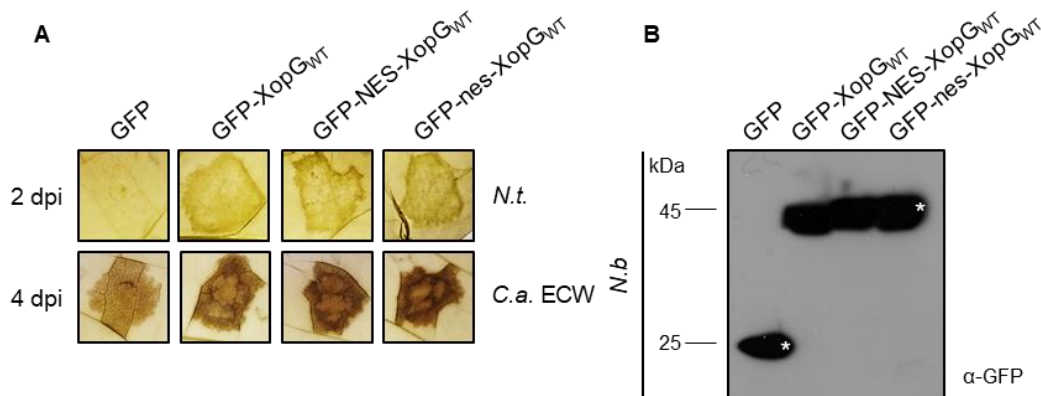
In *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *xopG*-Derivate mit *CaATM-like-4xc-myc* *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc dienen als Negativkontrollen. Das Blattmaterial wurde 3 dpi gewonnen und der Gesamtproteinextrakt wurde immunologisch mit c-Myc- und GFP-spezifischem Antikörper analysiert. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im α-Myc-Blot bzw. α-GFP-Blot) oder kennzeichnen *CaATM-like*-Spaltprodukte (rot im α-Myc-Blot). GFP-ev kodiert GFP und 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

### 3.2.5 Einfluss der subzellulären Lokalisierung auf die XopG-Aktivität

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SMD40 bzw. *CaATM-like* mit XopG im pflanzlichen Zellkern ko-lokalisieren (Abbildung 22). Daher stellte sich die Frage, ob die Proteolyse der Substrate SMD40 und *CaATM-like* von der XopG-Lokalisierung im pflanzlichen Zellkern abhängt. Des Weiteren sollte Einfluss der subzellulären Lokalisierung auf den XopG-vermittelten Zelltod untersucht werden, da dieser vermutlich mit der proteolytischen Aktivität korreliert. Daher wurde XopG N-terminal mit einem funktionalen nuklearen Exportsignal (NES) und zur Kontrolle mit einem nicht-funktionalen Exportsignal (nes) fusioniert. Lokalisierungsstudien zeigten, dass GFP-NES-XopG<sub>WT</sub> ausschließlich im pflanzlichen Zytoplasma lokalisiert, während GFP-nes-XopG<sub>WT</sub> vorwiegend im Zellkern detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Beide Proteine wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, den Zelltod in *C.a.* ECW und *N.t.* auszulösen, sowie ihrer potentiellen proteolytischen Aktivität untersucht. Als Kontrollen dienten GFP sowie XopG<sub>WT</sub> ohne NES/nes-Fusion. Der



XopG-induzierte Zelltod wurde phänotypisch 2 bis 4 dpi in *C.a.* ECW sowie *N.t.* analysiert. Hierbei wurden keine Unterschiede zu XopG<sub>WT</sub> in Bezug auf die Zelltodinduktion festgestellt (Abbildung 30 A). Die Analyse der Gesamtproteinextrakte erfolgte mittels Immunoblot, wie in 3.2.3 beschrieben. Alle GFP-Fusionsproteine wurden mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) detektiert (Abbildung 30 B). Offenbar ist der XopG-induzierte Zelltod unabhängig von der XopG-Lokalisierung.

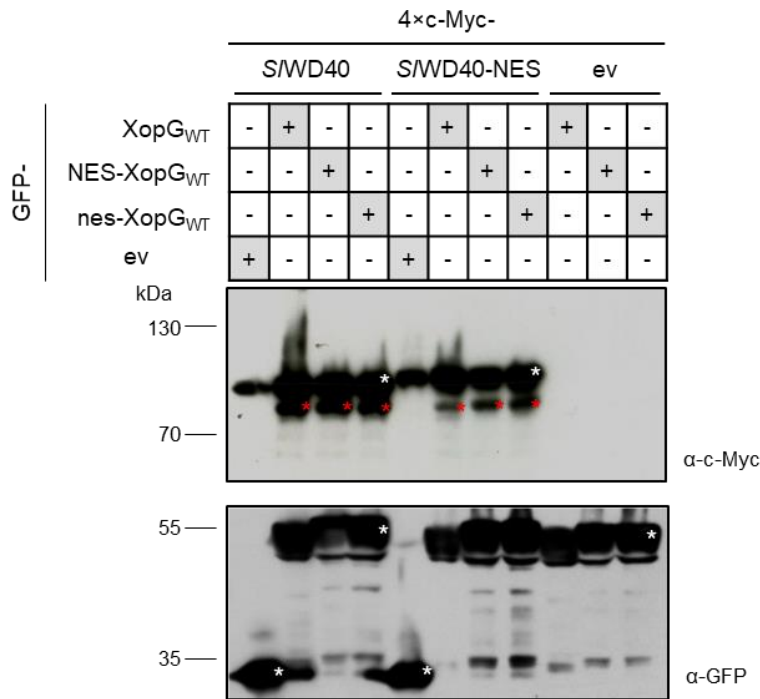


**Abbildung 30: NES-Fusion hat keinen Einfluss auf die XopG-vermittelte Zellinduktion in *N.t.* und *C.a.* ECW.**

*Agrobacterium*-vermittelte Expression von *xopG*<sub>WT</sub> mit einem funktionalen nuklearen Exportsignal (NES) sowie nicht funktionalen Exportsignal (nes) unter Kontrolle des 35S-Promotors in *N.t.*, *C.a.* ECW und *N.b.* Als Kontrollen dienten GFP-XopG<sub>WT</sub> ohne NES als auch GFP. (A) Die XopG-induzierte Zelltodreaktion wurde in *N.t.* und *C.a.* ECW phänotypisch nach 2 bis 4 dpi analysiert. Zur besseren Visualisierung wurden die Blätter in Ethanol entfärbt. (B) Die Immunoblot-Analyse der Gesamtproteinextrakte von infiziertem Blattmaterial erfolgte 2 dpi in *N.b.* unter Verwendung GFP-spezifischer Antikörper. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine an. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens dreimal mit ähnlichen Resultaten durchgeführt.

Für die Untersuchung der proteolytischen XopG-Aktivität wurden *gfp-xopG*<sub>WT</sub>, *gfp-NES-xopG*<sub>WT</sub>, *gfp-nes-xopG*<sub>WT</sub> mit *4xc-myc-SIWD40* oder *4xc-myc-SIWD40-NES* *Agrobacterium*-vermittelt ko-exprimiert. Als Kontrollen dienten GFP und 4xc-Myc. Alle Fusionsproteine waren mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) mittels Immunoblot nachweisbar (Abbildung 31). Bei der Ko-Synthese mit GFP-XopG<sub>WT</sub>, GFP-NES-XopG<sub>WT</sub> oder GFP-nes-XopG<sub>WT</sub> wurden keine Unterschiede in der Signalstärke vom SMD40-Spaltprodukt detektiert (Abbildung 31). Da die SMD40-Lokalisierung im Zellkern und Zytoplasma nachgewiesen wurde, wurde auch SMD40 mit einer NES fusioniert. Für SMD40-NES wurden Spaltprodukte detektiert, wenn GFP-XopG<sub>WT</sub>, GFP-NES-XopG<sub>WT</sub> oder GFP-nes-XopG<sub>WT</sub> ko-synthetisiert wurde. Das SMD40-spezifische Signal vom Spaltprodukt im Immunoblot war aber schwächer als bei SMD40 ohne NES-Fusion (Abbildung 31). Bei der Ko-Synthese mit XopG<sub>WT</sub> zeigte sich im Vergleich zu GFP-NES-XopG<sub>WT</sub> oder GFP-nes-XopG<sub>WT</sub> ein schwächeres Signal des Spaltproduktes (Abbildung 31).





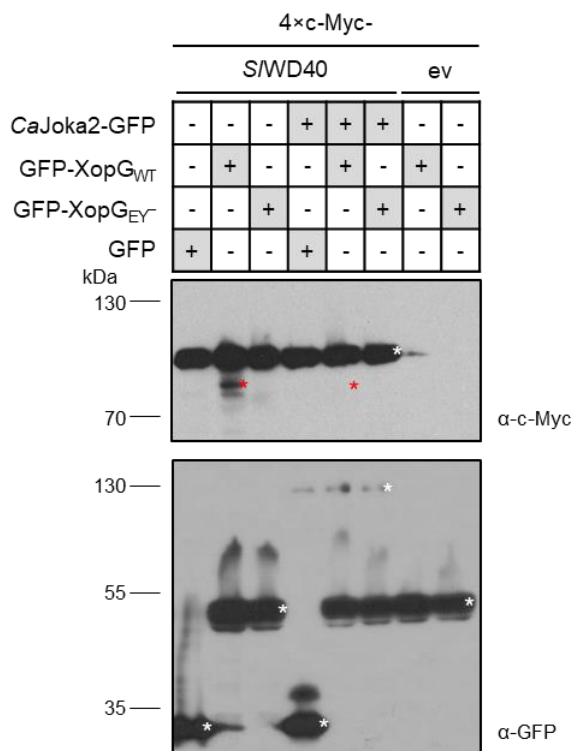
**Abbildung 31: Die Proteolyse von SMD40 durch XopG ist Zellkern-unabhängig.**

In *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* mit bzw. ohne NES/nes sowie *4xc-myc-SMD40* mit bzw. ohne NES *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Als Negativkontrollen dienten die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc. Das Blattmaterial wurde 3 dpi geerntet und der Gesamtproteinextrakt wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von c-Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern untersucht. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im  $\alpha$ -Myc-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot) oder kennzeichnen SMD40-Spaltprodukte (rot im  $\alpha$ -Myc-Blot). GFP-ev kodiert GFP und 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass der XopG-vermittelte Zelltod vermutlich unabhängig von der XopG-Lokalisierung induziert wird und die WD40-Spaltung durch XopG nicht von der Ko-Lokalisierung im pflanzlichen Zellkern abhängt. Aus zeitlichen Gründen konnte das XopG-Substrat *CaATM-like* nicht mehr getestet werden.

### 3.2.6 CaJoka2 hat einen negativen Einfluss auf die XopG-Proteaseaktivität

Obwohl *CaJoka2* nicht als XopG-Substrat bestätigt wurde, es aber in Hefe mit *SMD40* und *CaATM-like* interagiert, stellte sich die Frage, ob *CaJoka2* die XopG-Proteaseaktivität beeinflusst. Um dies experimentell zu prüfen, wurde die proteolytische *SMD40*-Spaltung durch XopG in An- oder Abwesenheit von *CaJoka2 in planta* analysiert. Hierzu erfolgte eine *Agrobacterium*-vermittelte Ko-Expression von *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *xopG<sub>EY</sub>* mit *4xc-myc-SMD40* und/ohne *CaJoka2-gfp*. Für die Analyse dienten GFP und 4xc-Myc als Kontrollen. Alle Fusionsproteine wurden mit entsprechenden molekularen Massen (Tabelle 17) im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Bei Anwesenheit von CaJoka2 findet vermutlich eine verminderte mögliche Proteolyse von SMD40 durch XopG statt.**

In *N.b.* wurden *xopG<sub>WT</sub>* bzw. *xopG<sub>EY</sub>* mit *4xc-myc-SMD40* in An- oder Abwesenheit von *CaJoka2-gfp* *Agrobacterium*-vermittelt und unter Kontrolle des 35S-Promotors ko-exprimiert. Die Ko-Synthesen mit GFP bzw. 4xc-Myc dienen als Negativkontrollen. Das Blattmaterial wurde 3 dpi gewonnen und der Gesamtproteinextrakt wurde immunologisch mit c-Myc- und GFP-spezifischem Antikörper untersucht. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (weiß im  $\alpha$ -Myc-Blot bzw.  $\alpha$ -GFP-Blot) oder kennzeichnen SMD40-Spaltprodukte (rot im  $\alpha$ -Myc-Blot). 4xc-Myc-ev kodiert 4xc-Myc. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden mindestens zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Ohne CaJoka2 wurde das XopG-abhängige SMD40-Spaltprodukt deutlich detektiert, aber kaum, wenn CaJoka2 ko-exprimiert wurde und eine längere Exposition erfolgte. Unabhängig von der An- oder Abwesenheit von CaJoka2 wurden keine SMD40-Spaltprodukte mit GFP-XopG<sub>EY</sub> oder der GFP-Kontrolle detektiert (Abbildung 32). Dies deutet an, dass CaJoka2 einen negativen Einfluss auf die Proteolyse von SMD40 durch XopG hat. Aus zeitlichen Gründen wurde dieser Test noch nicht für CaATM-like durchgeführt.

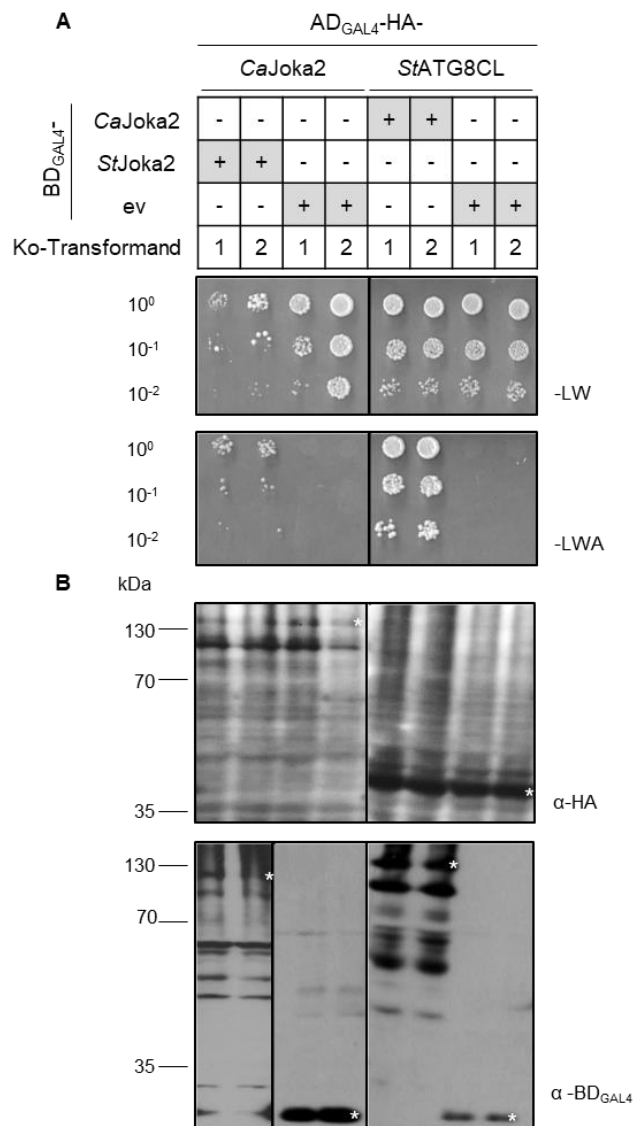
### 3.2.7 Interaktionsstudien mit Autophagie-relevanten Proteinen

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen XopG und CaJoka2 bestätigt (3.1.3; 3.1.4; 3.1.5.2) und ein Einfluss von CaJoka2 auf die mögliche XopG-Aktivität beobachtet. Aus Publikationen geht hervor, dass Joka2 aus Tabak und Kartoffel als selektiver Autophagie-Rezeptor fungiert und mit dem ATG8-Protein über ein AIM (*Atg8-family interacting*)-Motiv interagiert (Zientara-Rytter *et al.*, 2011; Dagdas *et al.*, 2016). Interessanterweise wurde für den RXLR-Effektor PexRD54 aus dem pathogenen Oomyceten *Phytophthora infestans* beschrieben, dass Joka2 ebenfalls an das AIM-Motiv

des ATG8-Proteins bindet, wodurch Joka2 aus dem ATG8-Komplex entfernt und die Pathogenabwehr der Pflanze supprimiert wird (Dagdas *et al.*, 2016). Laut iLIR *database* (<https://ilir.warwick.ac.uk>) weist XopG ein vorhergesagtes AIM-Motiv an der AS-Position 137-140 (FVVL) auf (Jacomin *et al.*, 2016), welches mit der Konsensus-AS-Sequenz W/F/Y-X-X-L/I/V (Popelka & Klionsky, 2015) übereinstimmt. Daher wurde spekuliert, dass XopG eine Rolle in der pflanzlichen Autophagie und Suppression der Wirtsabwehr spielen könnte. Um dies zu testen, wurden Interaktionsstudien in Hefe durchgeführt. Hierzu wurden ATG8CL, Joka2 bzw. Joka2<sub>AIM</sub> aus Kartoffel (*S. tuberosum*; *S.t.*) verwendet. Die Variante *StJoka2*<sub>AIM</sub> besitzt Substitutionen im AIM-Motiv und interagiert nicht mit *StATG8CL* (Dagdas *et al.*, 2016). Zuerst sollte bestätigt werden, dass auch Joka2 aus *C.a.* mit dem Autophagie-Protein *StATG8CL* interagiert und Heterodimere mit *StJoka2* ausbilden kann. In vorläufigen Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Reporter-genautoaktivierung der generierten Köderplasmide von *StJoka2* und *StJoka2*<sub>AIM</sub> ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

Der Spezifitätstest erfolgte wie in 3.1.3 beschrieben. Alle getesteten Ko-Transformanden zeigten Wachstum auf dem Selektionsmedium -LW, welches als Transformationskontrolle diente. Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurde zusätzlich das Wachstum der *BD<sub>GAL4</sub>*-Ko-Transformanden auf den Selektionsmedien analysiert. In der Immunoblotanalyse wurden alle Köder- und Beuteproteine mit erwarteten molekularen Massen (Tabelle 17) nachgewiesen (Abbildung 33 B und 34 B).

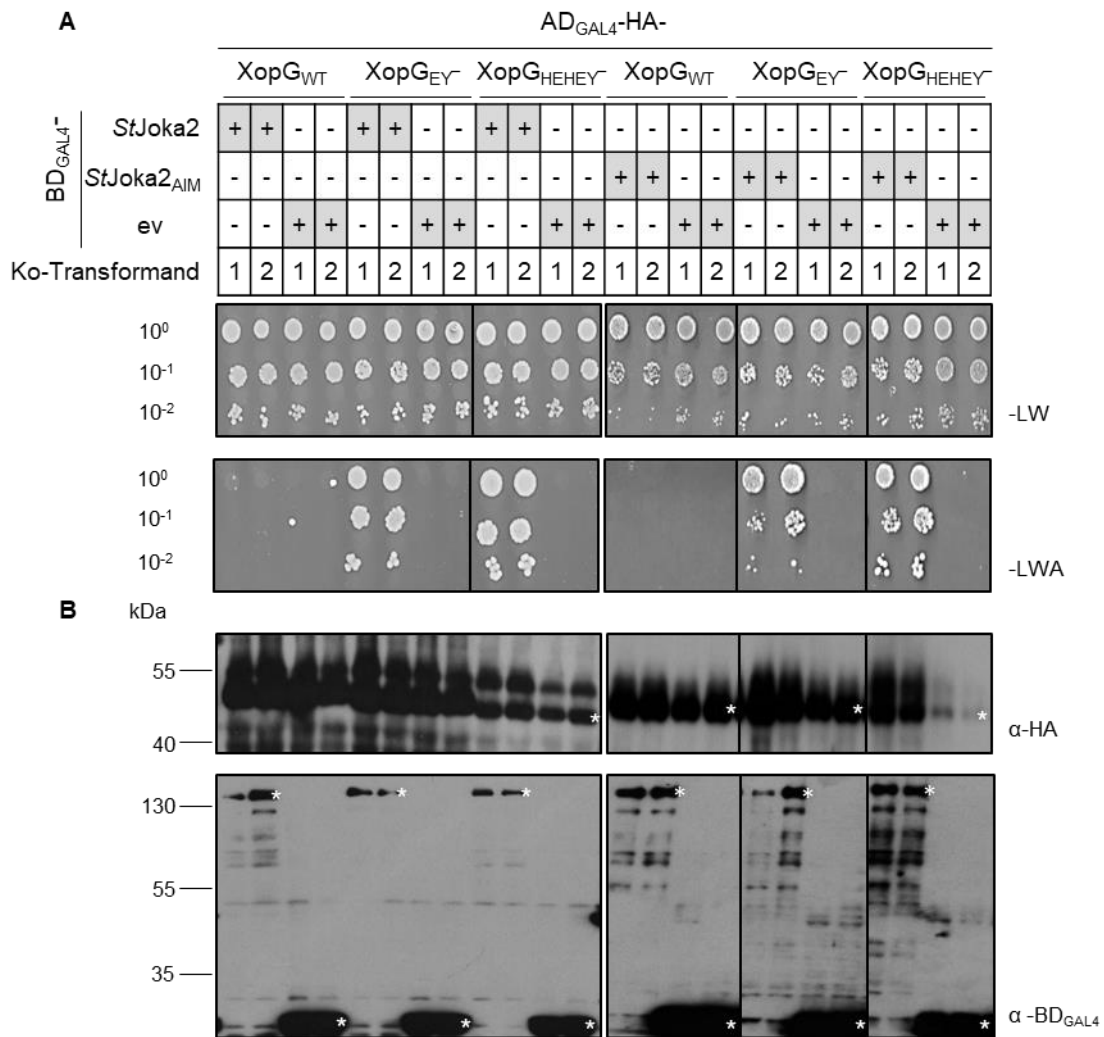
*CaJoka2* interagierte in Hefe sowohl spezifisch mit *StJoka2* als auch mit *StATG8CL*. Ein Wachstum der entsprechenden Ko-Transformanden war auf -LWA detektierbar (Abbildung 33 A).



**Abbildung 33: Im Y2H-Test interagiert CaJoka2 mit StJoka2 und StATG8CL.**

(A) Im Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungstufen ( $10^0$ ;  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ) der Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden analysiert. (B) Die Proteinsynthese der Köder- und Beute-Fusionsproteine wurde immunologisch unter Verwendung von BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup> sowie HA-spezifischen Antikörpern untersucht. Stern-markierte Signale zeigen die Fusionsproteine ( $\alpha$ -HA-Blot bzw.  $\alpha$ -BD<sub>GAL4</sub>-Blot) an. BD<sub>GAL4</sub><sup>-</sup>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Weitere Signale stellen vermutlich Degradationsprodukte dar. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Als nächstes wurde die Interaktion zwischen XopG<sub>WT</sub> und StATG8CL sowie StJoka2<sub>AIM</sub> getestet. Für diese Analyse wurden die XopG-Varianten EY<sup>-</sup> und HEHEY<sup>-</sup> mitgeführt. Interaktionsstudien mit XopG und Derivaten zeigten dagegen keine spezifische Interaktion mit StATG8CL (Daten nicht gezeigt). Allerdings interagierte XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> spezifisch mit StJoka2 und StJoka2<sub>AIM</sub>. Keine Interaktion wurde dabei mit XopG<sub>WT</sub> oder der XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> nachgewiesen. (Abbildung 34 A).



**Abbildung 34:** Im Y2H-Test interagiert ausschließlich die XopG-Variante EY<sup>-</sup> mit StJoka2 und StJoka2<sub>AIM</sub>.

(A) Für den Spezifitätstest wurde der *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert. Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium angezogen und OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Die Verdünnungen (10<sup>0</sup>; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>) der Suspensionen wurden auf die Selektivmedien -LW und -LWA getropft. Je zwei Ko-Transformanden wurden analysiert. (B) Der Synthesenachweis der Köder- und Beute-Fusionsproteine erfolgte mittels Immunoblot unter Verwendung BD<sub>GAL4</sub>- sowie HA-spezifischer Antikörper. Stern-markierte Signale entsprechen den Fusionsproteinen (α-HA-Blot bzw. α-BD<sub>GAL4</sub>-Blot). BD<sub>GAL4</sub>-ev kodiert BD<sub>GAL4</sub>. Molekulare Massen sind in kDa angegeben. Weitere Signale stellen vermutlich Degradationsprodukte dar. Die Experimente wurden zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CaJoka2 sowohl mit dem ATG8CL-Protein aus *S.t.* interagiert als auch Heterodimere mit StJoka2 ausbildet. Eine spezifische XopG-Interaktion wurde mit StJoka2<sub>AIM</sub>, jedoch nicht mit StATG8CL, nachgewiesen, somit könnte das vorhergesagte AIM-Motiv von XopG nicht funktional sein. Zudem wurde eine spezifische Interaktion zwischen der XopG-Variante EY<sup>-</sup> und StJoka2 detektiert. Da XopG<sub>HEHEY</sub> mit StJoka2 sowie StJoka2<sub>AIM</sub> interagiert, scheint diese Interaktion unabhängig von der Zink-Koordination im XopG-Protein zu sein.

## 4 Diskussion und Ausblick

XopG ist ein T3E von *Xcv* und zählt, im Gegensatz zu AvrBs2, XopK, XopL, XopN, XopP, XopQ, XopR, XopX und XopZ, nicht zu den *core*-Effektoren, die in den meisten sequenzierten Xanthomonaden konserviert sind (White *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2011). Eine *xopG*-Deletionsmutante in *Xcv* ist genauso pathogen wie der Wildtypstamm 85-10 (Schulze *et al.*, 2012; Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten). Dass die Deletion einzelner Effektorgene häufig nicht zu einer verminderten Virulenz führt, weist möglicherweise auf redundante Funktionen der T3E hin (Büttner & Bonas, 2010; Hann *et al.*, 2010). Interessanterweise löst eine Überexpression von *xopG* mittels *Agrobacterium* einen schnellen Zelltod in der Wirtspflanze *C. annuum* (ECW, ECW-10R), aber nicht in *S. lycopersicum*, aus. Auch in Nicht-Wirtspflanzen, wie *N. tabacum* oder *Nicandra physalodes*, wird XopG erkannt (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013; Adlung *et al.*, 2016). Welchen Vorteil könnte *Xcv* durch einen T3E haben, der in einigen *Solanaceae* erkannt wird und eine HR auslöst? Die Tatsache, dass XopG-Homologe sowohl in einigen Xanthomonaden als auch in Vertretern aus *Pseudomonas* (z. B. HopH1) oder *Ralstonia* (z. B. RipAX1, RipAX2) konserviert sind (Thieme *et al.*, 2005; Potnis *et al.*, 2011), deutet auf eine mögliche Virulenzfunktion hin. Die biochemische Funktion der XopG-Homologen ist jedoch bislang unklar.

Die *Xanthomonas*-Spezies *Xcv*, *X. vesicatoria* (*Xv*), *X. perforans* (*Xp*) und *X. gardneri* (*Xg*) verursachen weltweit Krankheiten auf Tomaten- und/oder Paprikapflanzen (Jones *et al.*, 2004). Das *xopG*-Gen ist in den drei Paprika-Pathogenen *Xcv*, *Xv* (93 % DNA-Identität mit *xopG* aus *Xcv*) und *Xg* (93 %) konserviert, während es in *Xp*, welches nur Tomatenpflanzen befällt, fehlt (Potnis *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2015). Demnach könnte XopG ein Pathogenitätsfaktor für Paprika sein (Potnis *et al.*, 2011). Dagegen sprechen jedoch neuere Genomanalysen von *Xcv*-Stämmen aus u. a. Europa, Asien, Nordamerika und Südamerika, in denen das *xopG*-Gen, verglichen mit dem Referenzstamm *Xcv* 85-10, fehlt (Schwartz *et al.*, 2015; Barak *et al.*, 2016).

#### 4.1 XopG spaltet die pflanzlichen Substrate ATM-like und WD40

XopG weist Ähnlichkeiten zu BoNT/A aus *C. botulinum* und NleD aus EPEC auf, da charakteristische Merkmale dieser Zink-Metalloproteasen konserviert sind. Um XopG auf eine Proteaseaktivität testen zu können, sollten in dieser Arbeit potentielle pflanzliche Substrate identifiziert werden. Die mittels Y2H-Sichtungen identifizierten und verifizierten XopG-Interaktoren CaJoka2, SMD40 sowie CaATM-like stellten daher mögliche Substrate dar. Weitere Untersuchungen zeigten Spaltprodukte für SMD40 und CaATM-like, nicht aber für CaJoka2 (Abbildung 23 und 24).

Im Folgenden werden zum besseren Verständnis XopG als aktive Zink-Metalloprotease und SMD40 sowie CaATM-like als XopG-Substrate bezeichnet.

##### 4.1.1 Aminosäuren des postulierten katalytischen Zentrums sind wichtig für die XopG-Aktivität *in planta*

Zink-Metalloproteasen bilden ein sogenanntes katalytisches Zentrum aus (Auld, 2013), welches auch für XopG vorhergesagt wurde. Das katalytische Zentrum in XopG beinhaltet vermutlich die konservierten AS H142, H146, E143, E174 und Y208 (Abbildung 3 C), welche essentiell für die Auslösung der XopG-induzierten Zelltodreaktion sind (Schonsky, 2013; Szczesny, Nagel, Prochaska & Bonas; unpublizierte Daten). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Korrelation zwischen der Proteaseaktivität sowie der XopG-vermittelten Zelltodinduktion hin, da gezeigt wurde, dass die konservierten AS auch wichtig für die proteolytische Aktivität von XopG sind. So wies die XopG-Variante EY<sup>-</sup> mit den Substitutionen E143Q und Y208F eine stark verminderte Proteaseaktivität auf, während für die anderen Varianten von XopG (HEHEY<sup>-</sup>, HE<sup>-</sup>, E174A oder Y208A) keine XopG-abhängige Spaltung von SMD40 bzw. CaATM-like detektiert wurde (Abbildung 28 und 29; Tabelle 14).

**Tabelle 14: Eigenschaften von XopG und dessen Derivaten.**

	Substitutionen im postulierten katalytischen Zentrum <sup>a</sup>	Zelltodinduktion <sup>b</sup>	Zink-Bindung <sup>c</sup>	Proteaseaktivität <sup>d</sup>
XopG <sub>WT</sub>	-	+	+	+
XopG <sub>EY<sup>-</sup></sub>	E143Q, Y208F	-	+	+/-
XopG <sub>HEHEY<sup>-</sup></sub>	H142A, E143A, H146A, E174A, Y208A	-	-	-
XopG <sub>HE<sup>-</sup></sub>	H142A, E143A	-	n. a.	-
XopG <sub>E174A</sub>	E174A	-	n. a.	-
XopG <sub>Y208A</sub>	Y208A	-	n. a.	-

<sup>a</sup> in Vorarbeiten generierte Einzel- und Mehrfachmutanten von XopG; <sup>b</sup> nach *Agrobacterium*-vermittelte Expression von *xopG* und Derivaten in *C. annuum* ECW bzw. *N. tabacum* (Schonsky, 2013; Szczesny, Nagel, Prochaska & Bonas; unpublizierte Daten), + Zelltodinduktion, - keine Zelltodinduktion; <sup>c</sup> erfolgte mittels TXRF (*total X-ray fluorescence*)-Messungen (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten; Kooperation mit A. von Bohlen, ISAS Dortmund), + Zink-Bindung nachweisbar, - keine Zink-Bindung, n. a. nicht analysiert; <sup>d</sup> Ergebnisse dieser Arbeit (Abbildung 28 und 29), + Proteaseaktivität nachweisbar, +/- reduzierte Proteaseaktivität, - keine Proteaseaktivität.

Diese Unterschiede lassen sich mit der Natur der eingeführten Substitutionen erklären, d. h. ein konservativer (AS mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften; XopG<sub>EY</sub>) im Gegensatz zum drastischen Austausch (AS mit sehr verschiedenen biochemischen Eigenschaften; XopG<sub>HEHEY</sub>, XopG<sub>HE</sub>, XopG<sub>E174A</sub> oder XopG<sub>Y208A</sub>) (Tabelle 14; Rédei, 2008). Mutationsstudien der Zink-Metalloproteasen BoNT/A und NleD zeigten, dass E224<sub>BoNT/A</sub> bzw. E143<sub>NleD</sub>, die im HEXXH-Motiv liegen, essentiell für die proteolytische Aktivität sind (Lacy & Stevens, 1999; Li *et al.*, 2000; Baruch *et al.*, 2011; Creuzburg *et al.*, 2017). Außerdem positioniert und stabilisiert Y366 in BoNT/A das Substrat im aktiven Zentrum (Binz *et al.*, 2002). Die konservierten AS E143 und Y208 in XopG sind ebenfalls für die katalytische Aktivität von XopG essentiell. E143 in XopG könnte ein Wassermolekül koordinieren, um den nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung zu vermitteln, während Y208 vermutlich die Positionierung sowie Stabilisierung des Substrates bewirkt. Da Y208 nahe am C-Terminus von XopG liegt, könnte ein C-terminales Epitop die Positionierung oder Stabilisierung von Substraten stören. Dies könnte einerseits die verminderte XopG-Proteaseaktivität, die im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurde, begründen und andererseits die reduzierte XopG-induzierte Zelltodreaktion in *C.a.* erklären (Abbildung 25-27). Essentiell für die proteolytische Aktivität von Metalloproteasen ist auch die Zink-Koordination, da das gebundene Zn<sup>2+</sup> das Wassermolekül aktiviert, welches während der Katalyse als Nukleophil fungiert (Barrett *et al.*, 2012). In XopG sind vermutlich die AS H142, H146 und E174 für die Koordination des Zn<sup>2+</sup> verantwortlich, da die Variante XopG<sub>HEHEY</sub> nicht mehr in der Lage ist Zink zu binden (Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten; Tabelle 14) Außerdem verhindert der Austausch einer oder mehrerer AS dieses Motivs (XopG<sub>E174A</sub>, XopG<sub>HE</sub> und XopG<sub>HEHEY</sub>) die Spaltung von SMD40 sowie *CaATM-like* (Abbildung 28 und 29). Interessanterweise ist die AS R205 in XopG auch in BoNT/A (R363) und NleD (R203) konserviert (Abbildung 3 A). Für R363 und Y366 in BoNT/A wurde eine wichtige Rolle bei der Positionierung sowie Stabilisierung des Substrates gezeigt (Binz *et al.*, 2002). In NleD ist R203 zwar für die Proteolyse des Substrates p38 erforderlich, jedoch nicht für JNK (Creuzburg *et al.*, 2017). Demzufolge könnte R205 in XopG für die Proteolyse von SMD40 sowie *CaATM-like* notwendig sein. In zukünftigen Studien sollten auch die XopG-Varianten E143A, E143A/Y208A, H142A, H146A und R205A hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität und Zelltodinduktion *in planta* analysiert werden.

Die konservierten AS des vorhergesagten katalytischen Zentrums spielen für die spezifische XopG-Bindung an CaJoka2, SMD40 oder *CaATM-like* keine Rolle, da alle drei Pflanzenproteine mit den Varianten XopG<sub>EY</sub> und XopG<sub>HEHEY</sub> direkt interagierten (Abbildung 7). Um in XopG die Bindungsstellen von CaJoka2, SMD40, *CaATM-like* zu identifizieren und somit weitere wichtige AS bzw. Motive zu detektieren, sollten Mutationsstudien durchgeführt werden.



#### 4.1.2 Das XopG-Substrat *CaATM-like*

Das Protein *ATM-like* aus *C.a.* (*CaATM-like*) wird aufgrund einer vorhandenen PWWP-Domäne (konserviertes Pro-Trp-Trp-Pro-Motiv) der „*Royal Superfamily*“ zugeordnet, welche weitere Domänen wie Chromo (Chromatin-Bindung), Tudor und MBT (*malignant brain tumor*) umfasst. Zudem wurde eine Chromatin-Bindestelle für *CaATM-like* vorhergesagt (Maurer-Stroh *et al.*, 2003; Marchler-Bauer *et al.*, 2015; Finn *et al.*, 2016). PWWP-Domänen kommen in einer Vielzahl Chromatin-assoziiierter Proteine vor und sind an biologischen Prozessen, wie z. B. DNA-Methylierung, Histon-Modifizierung, DNA-Reparatur und Transkriptionsregulation, beteiligt (Stec *et al.*, 2000; Alvarez-Venegas & Avramova, 2012; Qin & Min, 2014). *CaATM-like* weist zu ATM aus *A. thaliana* (*AtATM*, AT3G48190) eine AS-Identität von 34 % und eine AS-Ähnlichkeit von 52 % auf. Die *ATM-like*-Homologe in *S. lycopersicum* (AS-Identität von 71 %, AS-Ähnlichkeit von 78 %; Solyc06g071490, XP\_004241490.1), *S. tuberosum* (73 %, 78 %; XP\_006347453.1) und *Nicotiana* spp. (z. B. aus *N.t.* 65 %, 71 %; XP\_016494093.1) sind bisher nicht charakterisiert. Das *AtATM*-Protein gehört zur Familie der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-verwandten Kinasen und ist ein zentraler Regulator bei der Reaktion auf DNA-Schäden. Neben einer N-terminalen PWWP-Domäne besitzt es mit FAT [FRAP (FKBP12-*rapamycin* complex-associated protein), ATM und TRRAP (*transactivation/transformation-domain-associated protein*)], PI3K und FATC (FAT C-terminal) drei weitere charakteristische Domänen der PI3K-Familie (Templeton & Moorhead, 2005). Im Gegensatz zu *AtATM* (3845 AS) weist das Protein *CaATM-like* lediglich eine Größe von 1153 AS auf. *ATM-like*-Homologe in *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* und *N. tabacum* zeigen eine ähnliche Größe (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mittels *ScanProsite tool* wurden für *CaATM-like* keine PI3K-, FAT- oder FATC-Domänen (<https://prosite.expasy.org>) vorhergesagt. Dies lässt vermuten, dass es sich bei *CaATM-like* um keine PI3K-verwandte Kinase, wie *AtATM*, handelt. Allerdings sollte festgestellt werden, ob *CaATM-like* in den Datenbanken (*Sol Genomics* und NCBI) korrekt annotiert wurde. Um die Position des Start- bzw. Stopcodons der kodierenden Sequenz von *CaATM-like* zu bestimmen, könnten RACE (*rapid amplification of cDNA-ends*)-PCRs mit cDNA aus *C.a.* durchgeführt werden. Mittels RACE-PCRs könnte auch die Annotation der *ATM-like*-Homologen aus *A.t.* und *S.l.* überprüft werden. Andererseits könnte *CaATM-like* auch eine bislang unbeschriebene Isoform von ATM aus *C.a.* darstellen, die durch alternatives *splicing* entsteht. Auch für *AtATM* werden mehr als eine Isoform vorhergesagt ([www.uniprot.org/uniprot/Q9M3G7](http://www.uniprot.org/uniprot/Q9M3G7)). Für den Fall, dass es sich bei *CaATM-like* um eine ATM-Isoform handelt, sollten in zukünftigen Experimenten die ATM-Proteine in voller Länge aus *C.a.* bzw. *A.t.* auf eine XopG-abhängige Spaltung getestet werden.

Neuere Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen DDR (*DNA damage response*) und der Pathogenabwehr in der Pflanze hin. Song und Bent (2014) konnten zeigen, dass in einer mikrobiellen Pathogeninfektion (Bakterien, Pilze und Oomyceten) DNA-Schäden in der Pflanze (*A.t.*, Kartoffel oder Tomate) auftreten. Als ein zentraler Regulator bei der Reaktion auf DNA-Schäden koordiniert ATM u. a. die Zellzyklus-Checkpoint-Aktivierung, die DNA-Reparatur und die metabolischen Veränderungen in eukaryotischen Zellen als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche sowie oxidativen Stress (Templeton & Moorhead, 2005; Paull, 2015). Der TF SOG1 (*suppressor of gamma response 1*) wird als Reaktion auf DNA-Schäden durch *At*ATM phosphoryliert, wodurch nachgeschaltete Gene induziert werden. Interessanterweise wurden auch Abwehr-assoziierte Gene (*SAG101* (*senescence-associated gene 10*), *OX11* (*oxidative signal-inducible 1*), *AtMYB44*, *WRKY50*), als SOG1-Zielgene identifiziert und somit eine Beteiligung von SOG1 an der Pflanzenimmunität nahelegt (Yoshiyama *et al.*, 2013; Ogita *et al.*, 2018). Möglicherweise könnte auch eine *Xcv*-Infektion zu DNA-Schäden in der Pflanze führen. In diesem Fall könnte ATM aus *C.a.* oder *S.l.* als zentraler DDR-Regulator z. B. den TF SOG1 als Reaktion auf DNA-Schäden phosphorylieren. XopG aus *Xcv* könnte ATM in der Pflanze spalten, um eine solche Phosphorylierung zu unterbinden und damit die SOG1-vermittelte Aktivierung Abwehr-assoziierten Gene zu verhindern. Eine mögliche Induktion beschriebener Abwehr-assoziierten Gene durch SOG1 sollte mithilfe von qRT-PCR nach *Xcv*-Infektion (WT-Stamm 85-10 und *xopG*-Deletionsmutante) untersucht werden. Zur Identifizierung weiterer ATM-Zielproteine aus *C.a.* oder *S.l.* könnten bereits durchgeführte quantitative phosphoproteomische Analysen in *A.t.* (Roitinger *et al.*, 2015) verwendet werden.

#### 4.1.3 Das XopG-Substrat WD40

WD40 gehört zur Transducin/WD40-repeat-Protein-Superfamilie und besitzt als gemeinsames Merkmal kurze Motive (40 AS), die in der Regel mit einem WD-Dipeptid enden (Neer *et al.*, 1994). WD40-Proteine enthalten 4 bis 16 Kopien sich wiederholender Einheiten (*repeats*), welche mehrblättrige  $\beta$ -Propellerstrukturen ausbilden. Diese sogenannten WD40-Motive dienen als *scaffold* für Protein-Protein-Interaktionen und komplexieren Proteine oder Nukleinsäuren (Neer *et al.*, 1994; Li & Roberts, 2001; Smith, 2008). WD40-Proteine kommen in Eukaryoten häufig vor, z. B. repräsentieren sie 1 % des gesamten Proteoms im Menschen, 1,4 % in *S. cerevisiae* und 0,8 % in *Arabidopsis* (Stirnemann *et al.*, 2010). In Pflanzen haben WD40-Proteine Schlüsselrollen in einer Vielzahl von Prozessen, wie beispielsweise Signaltransduktion, zellulärer Transport, Zellteilung, Entwicklung, Chromatin-Modifikation, Transkriptionsregulation, Sekundärstoffwechsel und pflanzliche Abwehr gegenüber (a)biotischen Stressfaktoren (van Nocker & Ludwig, 2003; Mishra *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

Laut der WD40-Protein-Datenbank WDSPdb besitzt WD40 aus *S.l.* (SMD40) sieben vorhergesagte *repeats* und könnte daher eine, für diese Proteinfamilie typische, siebenblättrige  $\beta$ -Propellerstruktur ausbilden (<http://wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp/>; Wang *et al.*, 2015). Zudem wurden sogenannte *Hotspot*-AS (L282, E298, E385, L387, Y425, I444, I467, R517, N560, L562, E578, Q698, Y715) in den jeweiligen *repeats* von SMD40 vorausgesagt. Diese AS ragen an der Oberseite (*top face*) von WD40-Proteinen hervor und könnten für Protein-Protein-Interaktionen bedeutsam sein (Wang *et al.*, 2015). Die Suche nach Homologen zeigte Ähnlichkeiten zum *WD repeat-containing protein* YMR102C aus *S. tuberosum* (AS-Identität von 95 %, AS-Ähnlichkeit von 97 %) und *WD repeat-containing protein 44-like* aus *N. tabacum* (66 %, 78 %). Bisher wurde die funktionelle Bedeutung von SMD40 und dessen Homologe in der Pflanze nicht geklärt. Daher könnten pflanzliche Interaktoren von SMD40 mittels Y2H-Sichtung identifiziert werden, um mögliche Hinweise für eine Funktion zu erhalten. Für XopG und SMD40 wurden NLSs mittels cNLS-Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)), aber keine NESs (NetNES; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) vorhergesagt (la Cour *et al.*, 2004; Kosugi *et al.*, 2009). Dies würde eine XopG-vermittelte WD40-Spaltung im Zellkern ermöglichen. Untersuchungen mit NES-Fusionen zeigten, dass diese Spaltung Zellkern-unabhängig erfolgen kann (Abbildung 31). Um die Proteolyse von SMD40 im Zytoplasma auszuschließen, sollte dessen NLS mutiert werden. Für den Fall, dass die Proteolyse ausschließlich im Zellkern stattfindet, wären nach transienter Ko-Synthese von XopG und SMD40<sub>NLSm</sub> (mit mutierter NLS) keine Spaltprodukte detektierbar.

Um die XopG-vermittelte Proteolyse von SMD40 und *CaATM-like* zweifelsfrei zu bestätigen, sollten *in vitro*-Protease-Assays mit gereinigten, rekombinanten Proteinen durchgeführt werden. In Vorversuchen dieser Arbeit konnte bisher keine ausreichende Menge an löslichem SMD40 bzw. *CaATM-like*-Protein gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Aus zeitlichen Gründen erfolgte daher keine abschließende *in vitro*-Analyse der XopG-Proteaseaktivität. An welcher Position die mögliche Proteolyse von SMD40 bzw. *CaATM-like* durch XopG stattfindet, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Da mittels Immunoblot Spaltprodukte von ca. 80 kDa für 4xc-Myc-SMD40 und ca. 50 kDa für *CaATM-like*-4xc-Myc detektiert wurden, schneidet XopG das SMD40-Protein vermutlich im c-terminalen Bereich, während das Protein von *CaATM-like* wahrscheinlich zentral geschnitten wird. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass mehrere Schnittstellen von SMD40 sowie *CaATM-like* existieren können. Um die exakte Position der Schnittstellen von SMD40 sowie *CaATM-like* zu identifizieren, sollten *Intact Protein Analysis* (Massenspektrometrie-Analysen mit intakten, d. h. unverdauten Proteinen) durchgeführt werden.

## 4.2 Welche Rolle spielt die pflanzliche Autophagie in der Xcv-Infektion?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der selektiven Autophagie und dem T3E XopG hin. Autophagie (altgriechisch für „sich selbst verzehrend“) ist ein konservierter katabolischer Prozess in eukaryotischen Zellen, bei dem zytoplasmatische Bestandteile (z. B. Proteine und Lipide) in spezialisierten Doppelmembranvesikeln, sogenannten Autophagosomen, eingeschlossen und zum Abbau bzw. zur Wiederverwertung in lytische Kompartimente (Lysosomen oder Vakuolen) geleitet werden (He & Klionsky, 2009; Klionsky & Codogno, 2013; Michaeli *et al.*, 2016; Bozhkov, 2018). Dies bedarf einer koordinierten Aktion von mehr als 30 Kernproteinen, die als ATG-Proteine bekannt sind. Zunächst werden Autophagie-induzierende Signale perzipiert, was zur Ausbildung von Autophagosomen führt (He & Klionsky, 2009; Lamb *et al.*, 2013; Kellner *et al.*, 2017). Ursprünglich wurde die Autophagie als nicht-selektiver Abbaumechanismus bezeichnet, um Nährstoffmangel während einer Hungerphase auszugleichen. Inzwischen ist bekannt, dass Autophagie ein hochselektiver und streng regulierter Vorgang ist (Floyd *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2014; Zaffagnini & Martens, 2016; Kellner *et al.*, 2017). Dabei kommt es zur spezifischen Wechselwirkung zwischen Autophagie-Rezeptoren und ATG8-Proteinen über ein ATG8-Interaktionsmotiv (AIM). Das membranständige ATG8 dient als Andockstelle für Rezeptoren, welche dem wachsenden Autophagosom vielfältige Frachten (Kargo) zuführen, darunter Proteinaggregate, beschädigte Organellen sowie eindringende Pathogene (Stolz *et al.*, 2014; Zaffagnini & Martens, 2016). In Pflanzen nimmt die Autophagie eine zentrale Rolle in der Entwicklung, Reproduktion, Seneszenz und bei der Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren ein (Stolz *et al.*, 2014; Michaeli *et al.*, 2016). Die Rolle der Autophagie in der Pathogenabwehr ist jedoch weitgehend unerforscht.

### 4.2.1 XopG interagiert mit dem Autophagie-Rezeptor Joka2

Da Autophagie-Rezeptoren wie Joka2 wichtige Komponenten der selektiven Autophagie sind, stellt sich die Frage, ob und gegebenenfalls wie XopG die Autophagie beeinflusst. Einer der am besten charakterisierten Autophagie-Rezeptoren in Pflanzen ist NBR1 (*neighbour of brca 1*) aus *A.t.*, welcher den Abbau von poly-ubiquitinierten Proteinaggregaten vermittelt (Svenning *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Joka2 ist das NBR1-Homolog in *Solanaceae* (Zientara-Rytter *et al.*, 2011; Dagdas *et al.*, 2016). Beide Proteine besitzen mehrere funktionelle Domänen: eine N-terminale PB1 (*phox and bem 1*)-Domäne, eine ZZ-Typ-Zink-Finger-Domäne, eine NBR1-spezifische Domäne und zwei nicht identische UBA (*ubiquitin associated*)-Domänen (UBA1 und UBA2) im C-terminalen Bereich (Svenning *et al.*, 2011; Zientara-Rytter *et al.*, 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass beide Rezeptoren sowohl durch die PB1-PB1-Interaktion als auch über die

Interaktion zwischen N-terminalen PB1- und C-terminalen UBA-Domänen Homodimere ausbilden. Lediglich UBA2 besitzt die Fähigkeit Ubiquitin (Ub) zu binden. Ein AIM-Motiv, welches die Interaktion mit ATG8 ermöglicht, befindet sich zwischen den beiden UBA-Domänen (Svenning *et al.*, 2011; Zientara-Rytter *et al.*, 2011; Zientara-Rytter & Sirko, 2014b; Dagdas *et al.*, 2016). Joka2 aus *C.a.* (*CaJoka2*) interagiert mit dem ATG8-Protein aus *S.t.* (*StATG8CL*) und bildet zudem Homodimere bzw. Heterodimere in Hefe (Abbildung 18 und 33). Dies deutet darauf hin, dass *CaJoka2* wahrscheinlich die gleiche Funktion wie homologe Proteine aus *N.t.* und *S.t.* (*NtJoka2* und *StJoka2*) besitzt. *CaJoka2* interagiert spezifisch mit XopG (Abbildung 4, 7 und 17). Allerdings gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass *CaJoka2* ein Substrat von XopG ist (Abbildung 24). In Anwesenheit von *CaJoka2* konnte jedoch eine verminderte XopG-Proteaseaktivität gegenüber dem Substrat *SMD40* detektiert werden (Abbildung 32). Einige Beispiele zeigen, dass die Autophagie-Rezeptoren eine zentrale Bedeutung in der pflanzlichen Abwehr gegenüber Pathogenen einnehmen. Beispielsweise bindet das Joka2-Homolog NBR1 virale Kapsidproteine sowie Partikel des Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflower mosaic virus*; *CaMV*) und vermittelt deren Autophagie-abhängigen Abbau, um die Ausbreitung des Virus einzuschränken (Hafrén *et al.*, 2017). Auch während einer TuMV (*turnip mosaic virus*)-Infektion wurde der selektiven Autophagie eine Rolle in der antiviralen Immunität zugesprochen. Dabei unterdrückt NBR1 die virale Akkumulation, indem der Rezeptor auf die virale Helferprotein-Proteinase (HCpro), einen RNA-*silencing*-Suppressor, abzielt und autophagischen Abbau vermittelt (Hafrén *et al.*, 2018). Neueste Studien für den T3E HopM1 aus *Pst* zeigen, dass es die Virulenz des Bakteriums fördert, indem es die pflanzliche Autophagie aktiviert und somit die Proteaphagie (autophagischer Abbau des Proteasoms) stimuliert. Hingegen blockiert der Autophagie-Rezeptor NBR1 die HopM1-induzierte Wasseraufnahme und unterdrückt somit die bakterielle Proliferation (Üstün *et al.*, 2018). XopG könnte demnach ein Zielprotein von *CaJoka2* darstellen und dadurch die Spaltung von *SMD40* und *CaATM-like* durch XopG zu verhindern. Falls *CaJoka2* auf XopG abzielt, würde der Autophagie-Rezeptor jedoch als ein potentielles Substrat von XopG ausgeschlossen werden.

Um diese Hypothese zu testen, sollten Ko-Lokalisierungsstudien mit beiden Proteinen erfolgen, in denen ATG8 als Marker für Autophagosomen bzw. selektive Autophagie (Avin-Wittenberg *et al.*, 2018) verwendet wird. Darüber hinaus könnte getestet werden, inwieweit XopG in ubiquitiniertes Form in Anwesenheit von Joka2 vorliegt. Hierbei sollte zusätzlich ein Joka2-Derivat verwendet werden, welches keine UBA2-Domäne besitzt oder Substitutionen in dieser aufweist. Des Weiteren sollte die Proteolyse des XopG-Substrates *CaATM-like* in An- und Abwesenheit von *CaJoka2* (bzw. *StJoka2*) analysiert werden, um zu prüfen, ob Joka2 diese negativ beeinflusst.

Da es bisher keine Hinweise gibt, dass Joka2 ein XopG-Substrat ist, sollte XopG mit CaJoka2 bzw. StJoka2 in der Pflanze transient ko-synthetisiert werden. Spezifische Spaltprodukte von Joka2 könnten möglicherweise nach längerer Expressionszeit (mehr als 3 dpi) detektierbar sein. Dabei sollte auch der Einfluss von N- und C-terminalen Epitopen (wie z. B. GFP) an Joka2 analysiert werden.

#### **4.2.2 Der Autophagie-Rezeptor Joka2 interagiert mit den XopG-Substraten SMD40 und CaATM-like**

Selektive Autophagie-Rezeptoren agieren, indem sie zum einen an Ub-konjugierte Zielproteine binden und zum anderen AIM-Motiv-vermittelt mit ATG8-Proteinen auf dem Autophagosom interagieren, was zunächst für die humanen Rezeptoren p62 und NBR1 gezeigt wurde (Lamark *et al.*, 2009; Stolz *et al.*, 2014; Zaffagnini & Martens, 2016). In der Pflanze sind NBR1 (*A.t.*) und Joka2 (*N.t.*) funktionelle Homologe dieser Autophagie-Rezeptoren, welche ATG8 und Ub binden können (Svenning *et al.*, 2011; Zientara-Rytter *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte für CaJoka2 gezeigt werden, dass es sowohl mit SMD40 als auch CaATM-like in Hefe interagiert (Abbildung 19). Zhou *et al.* (2013) zeigten, dass die NBR1-vermittelte Autophagie ubiquitinierte Proteinaggregate abbaut, welche vermutlich aus denaturierten oder anderweitig geschädigten nicht-nativen Proteinen unter Stressbedingungen resultieren. Welche pflanzlichen Proteine derartige Aggregate unter biotischen Stressbedingungen (Pathogenbefall) ausbilden und somit von Rezeptoren erkannt werden, ist ungeklärt. Die Spaltprodukte von SMD40 und CaATM-like könnten ebenfalls Ub-markierte Proteinaggregate ausbilden und von Joka2 gebunden werden, um den autophagischen Abbau der Spaltprodukte zu vermitteln. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich sowohl bei SMD40 als auch CaATM-like um Zielproteine von Joka2 handelt und diese XopG-unabhängig unter Stressbedingungen durch die Autophagie-Maschinerie abgebaut werden. In Ko-Lokalisierungsstudien wurde für CaATM-like neben der GFP-Fluoreszenz im pflanzlichen Zellkern auch außerhalb ein punktförmiges Fluoreszenzmuster beobachtet (Abbildung 22). Es wurden vier mögliche monopartite NLSs mittels cNLS-Mapper, aber kein NES durch NetNES identifiziert (la Cour *et al.*, 2004; Kosugi *et al.*, 2009), welches eine mögliche zytoplasmatische Lokalisierung von CaATM-like erklären könnte. In der Pflanze bilden sich Autophagosomen nach Autophagie-Aktivierung, welche sich als schnell bewegende, punktförmige Strukturen im Zytoplasma mikroskopisch detektieren lassen (Pu & Bassham, 2016). Die beschriebene Beobachtung der Ko-Lokalisierungsstudien könnte ein Indiz dafür sein, dass CaATM-like in Autophagosomen lokalisiert.

Um einen selektiven Autophagie-Abbau nachzuweisen, sollten *SMD40* bzw. *CaATM-like* mit *Joka2* sowie in An- und Abwesenheit von *XopG* ko-synthetisiert werden und Ko-Lokalisierungsstudien mit dem Autophagosom-Marker *ATG8* erfolgen. Des Weiteren könnten Interaktionsstudien mit *SMD40* bzw. *CaATM-like* und einem *Joka2*-Derivat mit mutierter *UBA2*-Domäne durchgeführt werden, um auf eine Ub-abhängige Interaktion zu testen.

### 4.3 Der XopG-induzierte Zelltod in der Pflanze

Der programmierte Zelltod (PCD, *programmed cell death*) findet in allen Organismen statt und wurde in Pflanzen zuerst identifiziert. So spielt der PCD eine große Rolle in der Entwicklung und der pflanzlichen Abwehr gegen abiotische und biotische Stressfaktoren (Huysmans *et al.*, 2017; Locato & De Gara, 2018). Für *XopG* aus *Xcv* wurde gezeigt, dass es einen Zelltod nicht nur in der Wirtspflanze Paprika, sondern auch in einigen Nicht-Wirtspflanzen der Gattungen *Nicotiana* und *Nicandra* nach *Agrobacterium*-Infektion induziert. Dagegen wird in der Wirtspflanze Tomate kein *XopG*-vermittelter Zelltod ausgelöst (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013; Adlung *et al.*, 2016).

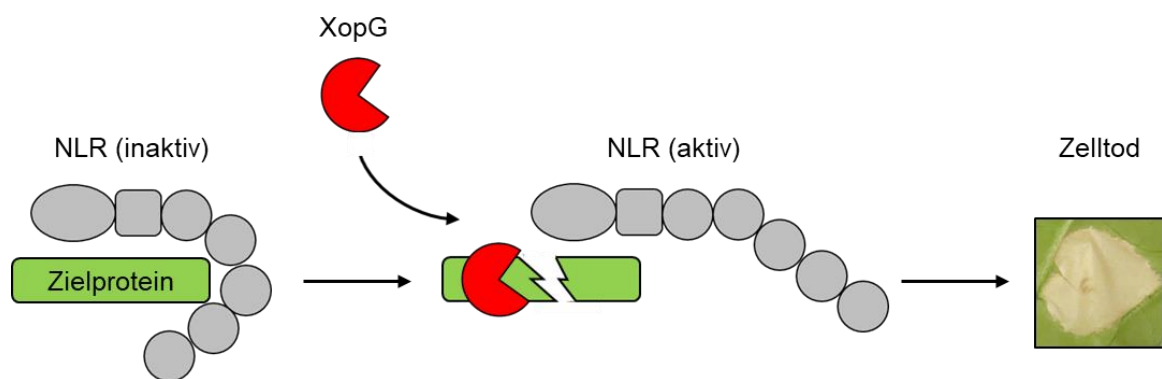
Die *xopG*-Expression *via Agrobacterium* erfolgte unter Kontrolle des 35S-Promotors. Demnach ist die Menge an *XopG*-Protein in der Pflanze vermutlich deutlich höher als während einer *Xcv*-Infektion.

Welcher Mechanismus dem *XopG*-induzierten Zelltod in der Pflanze zugrunde liegt, ist bislang ungeklärt und soll im Nachfolgenden diskutiert werden.

#### 4.3.1 Die mögliche XopG-Erkennung in der Pflanze ist abhängig von dessen Proteaseaktivität

Pflanzen haben im Laufe der Evolution ausgereifte Überwachungssysteme gegen Phytopathogene entwickelt, welche bei der Perzeption von PAMPs oder spezifischen Effektoren helfen. Dabei erkennen meist intrazelluläre Immunrezeptoren, sogenannte NLRs, die Präsenz von Effektorproteinen. Durch die Erkennung wird eine Abwehrreaktion induziert, was häufig einen schnellen lokalen Zelltod (HR) des infizierten Pflanzengewebes zur Folge hat. NLRs lokalisieren in verschiedenen subzellulären Zellkompartimenten, wie dem ER, der PM, dem Zellkern sowie dem Zytosol und können Effektorproteine direkt oder indirekt perzipieren. Bei einer indirekten Erkennung werden entweder *guardees* durch NLRs geschützt oder *decoys* von NLRs überwacht. In beiden Fällen detektieren die NLRs Effektor-vermittelte Modifikationen der *guardees* oder *decoys* (Cui *et al.*, 2015; Cesari, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Könnte auch der XopG-induzierte Zelltod auf einer NLR-vermittelten Perzeption beruhen? Substitutionen konservierter AS im postulierten katalytischen Zentrum von XopG resultieren nicht nur in einer stark verminderten bzw. im vollständigen Verlust der Proteaseaktivität (Abbildung 28 und 29), sondern führen zugleich zum Verlust der Zelltodinduktion in *C.a.* ECW bzw. *N.t.* (Schonsky, 2013; Szczesny, Nagel, Prochaska & Bonas; unpublizierte Daten). Dies lässt vermuten, dass nicht die Struktur des Effektorproteins, sondern die XopG-vermittelte Proteolyse eines pflanzlichen Zielproteins von einem NLR-Protein detektiert und der Zelltod dadurch ausgelöst wird (Abbildung 36).



**Abbildung 35: Modell zur indirekten NLR-vermittelten Erkennung des T3Es XopG.**

NLRs (grau) bestehen meist aus einer variablen N-terminalen Domäne (Ellipse), einer zentralen NB-Domäne (Viereck) sowie einer C-terminalen LRR-Domäne (Kreise) und überwachen in ihrer inaktiven Form pflanzliche Zielproteine (grün), sogenannte *guardees* oder *decoys*. In Anwesenheit des T3Es XopG (rot) wird das pflanzliche Zielprotein durch die Zink-Metalloprotease gespalten, wobei diese XopG-vermittelte Modifizierung bzw. Proteolyse vom NLR detektiert wird. Dies führt zur Aktivierung des NLRs und resultiert in der Induktion des pflanzlichen Zelltodes (Beispiel eines Laborphänotyps).

In diesem Fall könnten *CaATM-like* oder *SMD40 guardees* darstellen. So könnte der Mechanismus der indirekten XopG-Erkennung vergleichbar mit der Erkennung von AvrRpt2 aus *P. syringae* sein. Die Cysteinprotease AvrRpt2 spaltet in *A.t.* RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*), wodurch der NLR RPS2 (*resistance to Pseudomonas syringae 2*) aktiviert und die HR induziert wird (Axtell *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2005). Es ist jedoch auch möglich, dass es sich bei *CaATM-like* oder *SMD40* um *decoys* handelt. So wird der T3E HopZ1a aus *P. syringae* von der *Arabidopsis*-Pseudokinase ZED1 (*HopZ-ETI-deficient 1*) gebunden, was das NLR-Protein ZAR1 (*HopZ activated resistance 1*) aktiviert und die Immunantwort induziert (Lewis *et al.*, 2013).

Die beobachtete XopG-induzierte Zelltodreaktion in verschiedenen Gattungen (*Capsicum*, *Nicotiana* und *Nicandra*) könnte auf dem Vorhandensein entsprechender NLRs beruhen. Da innerhalb der Gattung *Solanum*, konkret in neun verschiedenen Spezies, kein XopG-induzierter Zelltod detektiert wurde (Schonsky, 2013; Adlung *et al.*, 2016), könnte dies auf ein Fehlen des entsprechenden NLR-Proteins hindeuten. Dies lässt sich vermutlich durch die stark variierende Anzahl pflanzlicher NLRs in verschiedenen *Solanaceae*-Arten



erklären. Beispielsweise sind 2042 NLRs in der *C.a.*-Art Chiltepin annotiert, während das *S.l.* Kultivar Heinz1706 478 NLRs codiert (Seo *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016).

Interessanterweise kann die XopG-vermittelte Zelltodinduktion in *C.a.* und *N.t.* in Anwesenheit des T3Es XopB aus *Xcv* unterdrückt werden (Schulze *et al.*, 2012; Schonsky, 2013). Auch die Aktivität anderer T3E, wie XopJ, AvrRxv oder AvrBsT, wird von XopB supprimiert (Schulze *et al.*, 2012). Wie XopB als Zelltod-Suppressor agiert, ist bislang unbekannt. Eine Interaktion zwischen XopB und XopG konnte in Hefe nicht nachgewiesen werden (Schonsky, 2013).

Da XopG vorwiegend im pflanzlichen Zellkern lokalisiert, könnte auch die XopG-Erkennung in diesem Zellkompartiment erfolgen. Hierfür sollte die Zelltodinduktion unter Verwendung der XopG-Variante XopG<sub>NLSm</sub> (mit mutierter NLS) untersucht werden. Um den eventuellen Einfluss von XopB auf die XopG-Proteaseaktivität zu untersuchen, sollte die XopG-vermittelte Proteolyse von SMD40 und CaATM-like in An- und Abwesenheit von XopB untersucht werden. Zur Identifizierung des NLR-Proteins könnte ein Fluoreszenz-basierter Assay (Schultink *et al.*, 2017) in Paprika- und Tabakpflanzen genutzt werden.

#### **4.3.2 Ist die XopG-vermittelte Zelltodinduktion Autophagie-bedingt?**

Auch die pflanzliche selektive Autophagie könnte eine Rolle bei der XopG-vermittelten Zelltodinduktion spielen. In den letzten zehn Jahren hat sich die Autophagie als ein zentraler Prozess in der Regulation des Zelltods, ausgelöst durch Pathogene, herauskristallisiert (Höfius *et al.*, 2009). Für *Xanthomonas citri* ssp. *citri* wurde gezeigt, dass dieses Pathogen in Zitronenpflanzen einen Zelltod auslöst, der nicht nur mit der Störung der Biofilmentwicklung einhergeht, sondern auch Autophagie-assoziierte vakuoläre Prozesse aktiviert (Roeschlin *et al.*, 2017). Ein anderes Beispiel zeigt, dass die Autophagie in TMV (*tobacco mosaic leaf virus*)-infizierten Tomatenpflanzen den ROS-Spiegel und das PCD-Fortschreiten reguliert, um den Erhalt pflanzlicher Zellen zu sichern (Zhou *et al.*, 2018). Möglicherweise ist der XopG-induzierte Zelltod auch Autophagie-abhängig. Um dies zu testen, sollten phänotypische Analysen in An- und Abwesenheit von Autophagie-Inhibitoren, wie Concanamycin-A (ConA) oder 3-Methyladenine (3-MA) (Hanamata *et al.*, 2013; Bassham, 2015) erfolgen. Weiterhin sollte der Einfluss des Autophagie-Rezeptors Joka2 auf den XopG-induzierten Zelltod analysiert werden. Hierfür könnte eine transiente Ko-Expression von *xopG* sowie *CaJoka2* (z. B. Verwendung verschiedener oder induzierbarer Promotoren) und ein effizientes *Joka2-silencing* in *N.t.* oder *C.a.* erfolgen.

Zu diesem Zeitpunkt kann noch nicht ausgeschlossen werden, dass der XopG-induzierte Zelltod weder mit einer indirekten Erkennung durch ein NLR-Protein noch mit der pflanzlichen selektiven Autophagie zusammenhängt. Würde eine dieser beiden Möglichkeiten zutreffen, ist dies eine neue Erkenntnis in der Pathogen-Pflanzen-Interaktion.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adlung, N., & Bonas, U. (2017). Dissecting virulence function from recognition: cell death suppression in *Nicotiana benthamiana* by XopQ/HopQ1-family effectors relies on EDS1-dependent immunity. *Plant J*, 91(3), 430-442.
- Adlung, N., Prochaska, H., Thieme, S., Banik, A., Blüher, D., John, P., Nagel, O., Schulze, S., Gantner, J., Delker, C., Stuttmann, J., & Bonas, U. (2016). Non-host resistance induced by the *Xanthomonas* effector XopQ is widespread within the genus *Nicotiana* and functionally depends on EDS1. *Front Plant Sci*, 7, 1796.
- Alvarez-Venegas, R., & Avramova, Z. (2012). Evolution of the PWWP-domain encoding genes in the plant and animal lineages. *BMC Evol Biol*, 12, 101.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Davis, M. J., Bonas, U., & Jones, J. B. (2000a). Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 13(9), 911-921.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Vallejos, C. E., Davis, M. J., & Jones, J. B. (2000b). *Xv4-vrxv4*: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 13(12), 1346-1355.
- Auld, D. S. (2013). Chapter 78 - Catalytic mechanisms for metallopeptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1, 370-396.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1995). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons*.
- Avin-Wittenberg, T., Baluska, F., Bozhkov, P. V., Elander, P. H., Fernie, A. R., Galili, G., Hassan, A., Hofius, D., Isono, E., Le Bars, R., Masclaux-Daubresse, C., Minina, E. A., Peled-Zehavi, H., Coll, N. S., Sandalio, L. M., Satiat-Jeunemaitre, B., Sirko, A., Testillano, P. S., & Batoko, H. (2018). Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *J Exp Bot*, 69(6), 1335-1353.
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol*, 49(6), 1537-1546.
- Barak, J. D., Vancheva, T., Lefeuvre, P., Jones, J. B., Timilsina, S., Minsavage, G. V., Vallad, G. E., & Koebnik, R. (2016). Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. *Front Plant Sci*, 7, 1805.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F. (2012). Handbook of proteolytic enzymes. *Academic Press*, 370-396.
- Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U. Z., & Börnke, F. (2009). The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 22(6), 655-664.
- Baruch, K., Gur-Arie, L., Nadler, C., Koby, S., Yerushalmi, G., Ben-Neriah, Y., Yogev, O., Shaulian, E., Guttman, C., Zarivach, R., & Rosenshine, I. (2011). Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB. *EMBO J*, 30(1), 221-231.
- Bassham, D. C. (2015). Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods*, 75, 181-188.
- Beattie, G. A. (2016). Plant science: A war over water when bacteria invade leaves. *Nature*, 539(7630), 506-507.
- Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., & Barbas, C. F., 3rd. (1998). Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 14628-14633.

- Binz, T., Bade, S., Rummel, A., Kollwe, A., & Alves, J. (2002). Arg(362) and Tyr(365) of the botulinum neurotoxin type a light chain are involved in transition state stabilization. *Biochemistry*, *41*(6), 1717-1723.
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T. C., Jahn, R., & Niemann, H. (1994). Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulin neurotoxins. *J Biol Chem*, *269*(3), 1617-1620.
- Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Sudhof, T. C., Niemann, H., & Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, *365*(6442), 160-163.
- Blüher, D., Laha, D., Thieme, S., Hofer, A., Eschen-Lippold, L., Masch, A., Balcke, G., Pavlovic, I., Nagel, O., Schonsky, A., Hinkelmann, R., Worner, J., Parvin, N., Greiner, R., Weber, S., Tissier, A., Schutkowski, M., Lee, J., Jessen, H., Schaaf, G., & Bonas, U. (2017). A 1-phytase type III effector interferes with plant hormone signaling. *Nat Commun*, *8*(1), 2159.
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, *48*, 419-436.
- Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., & Nurnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr Opin Plant Biol*, *20*, 47-54.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J., & Balbo, I. (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol Gen Genet*, *238*(1-2), 261-269.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., & Stall, R. E. (1991). Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *4*, 81-88.
- Bonas, U., Stall, R. E., & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, *218*(1), 127-136.
- Bonshtien, A., Lev, A., Gibly, A., Debbie, P., Avni, A., & Sessa, G. (2005). Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. *Mol Plant-Microbe Interact*, *18*(4), 300-310.
- Bozhkov, P. V. (2018). Plant autophagy: mechanisms and functions. *J Exp Bot*, *69*(6), 1281-1285.
- Breidenbach, M. A., & Brunger, A. T. (2004). Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. *Nature*, *432*(7019), 925-929.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev*, *40*(6), 894-937.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J*, *21*(20), 5313-5322.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(2), 107-133.
- Carey, M., Lin, Y. S., Green, M. R., & Ptashne, M. (1990). A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature*, *345*(6273), 361-364.
- Cesari, S. (2017). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytol*.
- Chang, J. H., Desveaux, D., & Creason, A. L. (2014). The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, *52*, 317-345.
- Chen, H. D., & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, *29*(1), 83-98.
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, *65*(10), 1357-1369.
- Cheong, M. S., Kirik, A., Kim, J. G., Frame, K., Kirik, V., & Mudgett, M. B. (2014). AvrBsT acetylates *Arabidopsis* ACIP1, a protein that associates with microtubules and is required for immunity. *PLoS Pathog*, *10*(2), e1003952.

- Chi, T., Lieberman, P., Ellwood, K., & Carey, M. (1995). A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature*, 377(6546), 254-257.
- Cornelis, G. R., & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*, 54, 735-774.
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol*, 16(9), 537-552.
- Cox, R. S., Conover, R. A., & Sowell, G. (1956). Symptomology of bacterial spot of pepper and tomato in southern Florida. *Phytopathol.*, 46, 582-584
- Creuzburg, K., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Scott, N. E., Muhlen, S., Hartland, E. L., & Pearson, J. S. (2017). The type III effector NleD from enteropathogenic *Escherichia coli* differentiates between host substrates p38 and JNK. *Infect Immun*, 85(2).
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol*, 66, 487-511.
- Dagdas, Y. F., Belhaj, K., Maqbool, A., Chaparro-Garcia, A., Pandey, P., Petre, B., Tabassum, N., Cruz-Mireles, N., Hughes, R. K., Sklenar, J., Win, J., Menke, F., Findlay, K., Banfield, M. J., Kamoun, S., & Bozkurt, T. O. (2016). An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *Elife*, 5.
- Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S. T., Li, D., & Staskawicz, B. J. (2005). Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. *Plant Cell*, 17(4), 1292-1305.
- Deslandes, L., & Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci*, 17(11), 644-655.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, 11(8), 539-548.
- Dubrow, Z., Sunitha, S., Kim, J. G., Aakre, C., Girija, A. M., Sobol, G., Teper, D., Chen, Y. C., Ozbaki-Yagan, N., Vance, H., Sessa, G., & Mudgett, M. B. (2018). Tomato 14-3-3 proteins are required for *Xv3* disease resistance and interact with a subset of *Xanthomonas euvesicatoria* effectors. *Mol Plant-Microbe Interact*.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., & Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. of Plant Pathol.*, 59(4), 153-168.
- Dye, D. W., & Lelliott, R. A. (1974). Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed. *The Williams & Wilkins Co*, 187, 243-249.
- El Kasmi, F., Horvath, D., & Lahaye, T. (2018). Microbial effectors and the role of water and sugar in the infection battle ground. *Curr Opin Plant Biol*, 44, 98-107.
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden Gate cloning. *Methods Mol Biol*, 1116, 119-131.
- Erickson, J. L., Adlung, N., Lampe, C., Bonas, U., & Schattat, M. H. (2018). The *Xanthomonas* effector XopL uncovers the role of microtubules in stromule extension and dynamics in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 93(5), 856-870.
- Escobar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O., & Bonas, U. (2001). Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol*, 2(5), 287-296.
- Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M. A., & Parker, J. E. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J*, 20(19), 5400-5411.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J., & Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D279-285.
- Floyd, B. E., Morriss, S. C., Macintosh, G. C., & Bassham, D. C. (2012). What to eat: evidence for selective autophagy in plants. *J Integr Plant Biol*, 54(11), 907-920.

- Fujii, N., Kimura, K., Yokosawa, N., Tsuzuki, K., & Oguma, K. (1992). A zinc-protease specific domain in botulinum and tetanus neurotoxins. *Toxicon*, 30(11), 1486-1488.
- Fukasawa, K. M., Hata, T., Ono, Y., & Hirose, J. (2011). Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *J Amino Acids*, 2011, 574816.
- Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun*, 73(5), 2573-2585.
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2(1), 31-34.
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiol Spectr*, 4(1).
- Gürlebeck, D. (2007). Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Dissertation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Gürlebeck, D., Szurek, B., & Bonas, U. (2005). Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J*, 42(2), 175-187.
- Hafrén, A., Macia, J. L., Love, A. J., Milner, J. J., Drucker, M., & Hofius, D. (2017). Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(10), E2026-E2035.
- Hafrén, A., Ustun, S., Hochmuth, A., Svenning, S., Johansen, T., & Hofius, D. (2018). Turnip mosaic virus counteracts selective autophagy of the viral silencing suppressor HCpro. *Plant Physiol*, 176(1), 649-662.
- Hanamata, S., Kurusu, T., Okada, M., Suda, A., Kawamura, K., Tsukada, E., & Kuchitsu, K. (2013). In vivo imaging and quantitative monitoring of autophagic flux in tobacco BY-2 cells. *Plant Signal Behav*, 8(1), e22510.
- Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., & Rathjen, J. P. (2010). Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr Opin Plant Biol*, 13(4), 388-393.
- Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, 3(1), 66-98.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R., & et al. (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 3(2), 212-230.
- Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*, 354(1), 1-6.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., & Mudgett, M. B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in *planta*. *Mol Microbiol*, 50(2), 377-389.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2), 379-433.
- Huysmans, M., Lema, A. S., Coll, N. S., & Nowack, M. K. (2017). Dying two deaths - programmed cell death regulation in development and disease. *Curr Opin Plant Biol*, 35, 37-44.
- Jacomín, A. C., Samavedam, S., Promponas, V., & Nezis, I. P. (2016). iLIR database: A web resource for LIR motif-containing proteins in eukaryotes. *Autophagy*, 12(10), 1945-1953.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), 1425-1436.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., & Zitter, T. A. (1991). Compendium of tomato diseases. *APS Press*, 27.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*, 27(6), 755-762.
- Jones, J. B., Stall, R. E., & Bouzar, H. (1998). Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 41-58.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.

- Joung, J. K., Koepf, D. M., & Hochschild, A. (1994). Synergistic activation of transcription by bacteriophage  $\lambda$  cl protein and *E. coli* cAMP receptor protein. *Science*, 265(5180), 1863-1866.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648-651.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R., & Bonas, U. (2009). Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 $\Delta$ rep16. *Plant J*, 59(6), 859-871.
- Kazan, K., & Lyons, R. (2014). Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell*, 26(6), 2285-2309.
- Kearney, B., & Staskawicz, B. J. (1990). Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*, 346(6282), 385-386.
- Kellner, R., De la Concepcion, J. C., Maqbool, A., Kamoun, S., & Dagdas, Y. F. (2017). ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification? *Trends Plant Sci*, 22(3), 204-214.
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., & Desveaux, D. (2018). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *Plant J*, 93(4), 651-663.
- Kim, J. G., Li, X., Roden, J. A., Taylor, K. W., Aakre, C. D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., McLane, H., Martin, G. B., & Mudgett, M. B. (2009). *Xanthomonas* T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. *Plant Cell*, 21(4), 1305-1323.
- Kim, J. G., Stork, W., & Mudgett, M. B. (2013). *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SIERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host Microbe*, 13(2), 143-154.
- Kim, J. G., Taylor, K. W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E. A., & Mudgett, M. B. (2008). XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell*, 20(7), 1915-1929.
- Kim, N. H., Choi, H. W., & Hwang, B. K. (2010). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector AvrBsT induces cell death in pepper, but suppresses defense responses in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, 23(8), 1069-1082.
- Klement, Z. (1982). Hypersensitivity [Defense reaction of plants to pathogens]. *Phytopathogenic Prokaryotes; Mount, M. S. and Lacy G.H. (eds). Academic Press*, 2, 149-177.
- Klionsky, D. J., & Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun*, 5(5), 427-433.
- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A., & Bonas, U. (2006). Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol*, 188(21), 7652-7660.
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A., Hsu, P. D., Heidenreich, M., Cong, L., Platt, R. J., Scott, D. A., Church, G. M., & Zhang, F. (2013). Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500(7463), 472-476.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(25), 10171-10176.
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9), 857-860.
- Kwon, C., Neu, C., Pajonk, S., Yun, H. S., Lipka, U., Humphry, M., Bau, S., Straus, M., Kwaaitaal, M., Rampelt, H., El Kasmi, F., Jurgens, G., Parker, J., Panstruga, R., Lipka, V., & Schulze-Lefert, P. (2008). Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature*, 451(7180), 835-840.

- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 17(6), 527-536.
- Lacy, D. B., & Stevens, R. C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol*, 291(5), 1091-1104.
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R., & Stevens, R. C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*, 5(10), 898-902.
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., & Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*, 8(13), 1986-1990.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(12), 759-774.
- Lewis, J. D., Lee, A. H., Hassan, J. A., Wan, J., Hurley, B., Jhingree, J. R., Wang, P. W., Lo, T., Youn, J. Y., Guttman, D. S., & Desveaux, D. (2013). The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(46), 18722-18727.
- Li, D., & Roberts, R. (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58(14), 2085-2097.
- Li, L., Binz, T., Niemann, H., & Singh, B. R. (2000). Probing the mechanistic role of glutamate residue in the zinc-binding motif of type A botulinum neurotoxin light chain. *Biochemistry*, 39(9), 2399-2405.
- Li, Q., Zhao, P., Li, J., Zhang, C., Wang, L., & Ren, Z. (2014). Genome-wide analysis of the WD-repeat protein family in cucumber and *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, 289(1), 103-124.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., & Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One*, 7(9), e46451.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30(4), 415-429.
- Locato, V., & De Gara, L. (2018). Programmed Cell Death in Plants: An Overview. *Methods Mol Biol*, 1743, 1-8.
- Lopez-Otin, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*, 283(45), 30433-30437.
- Ma, K. W., & Ma, W. (2016). Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Mol Biol*, 91(6), 713-725.
- Macho, A. P. (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytol*, 210(1), 51-57.
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell*, 54(2), 263-272.
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol*, 23, 14-22.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112(3), 379-389.
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Reyon, D., Angstman, J. F., Fu, Y., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2013). Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat Methods*, 10(3), 243-245.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(6), 614-629.



- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., & Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D222-226.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N. J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., & Ponting, C. P. (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci*, 28(2), 69-74.
- McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., McCarter, S. M., Jaworski, C. A., & Phatak, S. C. (1988). Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Disease*, 72, 575-579.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C. Q., Al Sady, B., Clark, E. T., & Staskawicz, B. J. (2005). The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 41(6), 801-814.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R., & Avin-Wittenberg, T. (2016). Autophagy in plants-What's new on the menu? *Trends Plant Sci*, 21(2), 134-144.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D., & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 29(2), 143-148.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Staskawicz, B. J., & Stall, R. E. (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant-Microbe Interact*, 3(1), 41-47.
- Mishra, A. K., Puranik, S., & Prasad, M. (2012). Structure and regulatory networks of WD40 protein in plants. *J Plant Biochem Biotechnol*, 21, 32-39.
- Moir, R. D., Quinlan, R. A., & Stewart, M. (1990). Expression and characterization of human lamin C. *FEBS Lett*, 268(1), 301-305.
- Montecucco, C., & Molgó, J. (2005). Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*, 5(3), 274-279.
- Montecucco, C., & Schiavo, G. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol*, 13(1), 1-8.
- Montecucco, C., & Schiavo, G. (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys*, 28(4), 423-472.
- Morales, C. Q., Posada, J., Macneale, E., Franklin, D., Rivas, I., Bravo, M., Minsavage, J., Stall, R. E., & Whalen, M. C. (2005). Functional analysis of the early chlorosis factor gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 18(5), 477-486.
- Müller, O. A., Grau, J., Thieme, S., Prochaska, H., Adlung, N., Sorgatz, A., & Bonas, U. (2015). Genome-wide identification and validation of reference genes in infected tomato leaves for quantitative RT-PCR analyses. *PLoS One*, 10(8), e0136499.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., & Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 39(21), 9283-9293.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., & Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371(6495), 297-300.
- Noël, L., Thieme, F., Gabler, J., Buttner, D., & Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, 185(24), 7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., & Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*, 41(6), 1271-1281.

- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., & Bonas, U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol*, *184*(5), 1340-1348.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, *144*, 31-43.
- Ogita, N., Okushima, Y., Tokizawa, M., Yamamoto, Y. Y., Tanaka, M., Seki, M., Makita, Y., Matsui, M., Okamoto-Yoshiyama, K., Sakamoto, T., Kurata, T., Hiruma, K., Saijo, Y., Takahashi, N., & Umeda, M. (2018). Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *Plant J*, *94*(3), 439-453.
- Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem*, *84*, 711-738.
- Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G., Brunger, J. M., Farin, A. M., Glass, K. A., Guilak, F., Crawford, G. E., Hartemink, A. J., & Gersbach, C. A. (2013). Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods*, *10*(3), 239-242.
- Popelka, H., & Klionsky, D. J. (2015). Analysis of the native conformation of the LIR/AIM motif in the Atg8/LC3/GABARAP-binding proteins. *Autophagy*, *11*(12), 2153-2159.
- Popov, G., Majhi, B. B., & Sessa, G. (2018). The effector gene *xopAE* of *Xanthomonas euvesicatoria* 85-10 is part of an operon and encodes an E3 ubiquitin ligase. *J Bacteriol*.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N. F., Patil, P. B., Ryan, R. P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J. M., Momol, M., White, F. F., Preston, J. F., Vinatzer, B. A., Koebnik, R., Setubal, J. C., Norman, D. J., Staskawicz, B. J., & Jones, J. B. (2011). Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics*, *12*, 146.
- Potnis, N., Minsavage, G., Smith, J. K., Hurlbert, J. C., Norman, D., Rodrigues, R., Stall, R. E., & Jones, J. B. (2012). Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Mol Plant-Microbe Interact*, *25*(3), 307-320.
- Priller, J. P., Reid, S., Konein, P., Dietrich, P., & Sonnewald, S. (2016). The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type-3 effector XopB inhibits plant defence responses by interfering with ROS production. *PLoS One*, *11*(7), e0159107.
- Pu, Y., & Bassham, D. C. (2016). Detection of autophagy in plants by fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*, *1450*, 161-172.
- Qin, J., Zhou, X., Sun, L., Wang, K., Yang, F., Liao, H., Rong, W., Yin, J., Chen, H., Chen, X., & Zhang, J. (2018). The *Xanthomonas* effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. *New Phytol*.
- Qin, S., & Min, J. (2014). Structure and function of the nucleosome-binding PWWP domain. *Trends Biochem Sci*, *39*(11), 536-547.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2012). Duale Reihe Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 262.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D624-D632.
- Rédei, G. P. (2008). Radical amino acid substitution. In: Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. Springer Netherlands, 3.
- Roden, J. A., Belt, B., Ross, J. B., Tachibana, T., Vargas, J., & Mudgett, M. B. (2004a). A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(47), 16624-16629.
- Roden, J. A., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., & Mudgett, M. B. (2004b). Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant-Microbe Interact*, *17*(6), 633-643.
- Roeschlin, R. A., Favaro, M. A., Chiesa, M. A., Alemanno, S., Vojnov, A. A., Castagnaro, A. P., Filippone, M. P., Gmitter, F. G., Jr., Gadea, J., & Marano, M. R. (2017). Resistance to citrus canker induced by a variant of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is

- associated with a hypersensitive cell death response involving autophagy-associated vacuolar processes. *Mol Plant Pathol*, 18(9), 1267-1281.
- Roitinger, E., Hofer, M., Kocher, T., Pichler, P., Novatchkova, M., Yang, J., Schlogelhofer, P., & Mechtler, K. (2015). Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics*, 14(3), 556-571.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., & Lahaye, T. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*, 318(5850), 645-648.
- Ronald, P. C., & Staskawicz, B. J. (1988). The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1(5), 191-198.
- Ryan, R. P., Vorholter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J., & Dow, J. M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol*, 9(5), 344-355.
- Salomon, D., Dar, D., Sreeramulu, S., & Sessa, G. (2011). Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effectors in yeast affects cell growth and viability. *Mol Plant-Microbe Interact*, 24(3), 305-314.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., & Hollier, C. A. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Sec.*, 4(4), 519-537.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., & Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359(6398), 832-835.
- Scholze, H., & Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr Opin Microbiol*, 14(1), 47-53.
- Schonsky, A. (2013). Molekulare Charakterisierung neuer Typ III Effektorproteine sowie des Effektors XopB aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Dissertation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schreiber, T., & Bonas, U. (2014). Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero. *Nucleic Acids Res*, 42(11), 7160-7169.
- Schreiber, T., Sorgatz, A., List, F., Bluher, D., Thieme, S., Wilmanns, M., & Bonas, U. (2015). Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3. *PLoS One*, 10(3), e0120214.
- Schultink, A., Qi, T., Lee, A., Steinbrenner, A. D., & Staskawicz, B. (2017). Roq1 mediates recognition of the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* effector proteins XopQ and HopQ1. *Plant J*, 92(5), 787-795.
- Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Krüger, A., Lee, J., Müller, O., Scheel, D., Szczesny, R., Thieme, F., & Bonas, U. (2012). Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol*, 195(4), 894-911.
- Schwartz, A. R., Potnis, N., Timilsina, S., Wilson, M., Patane, J., Martins, J., Jr., Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Akhunova, A., Almeida, N., Vallad, G. E., Barak, J. D., White, F. F., Miller, S. A., Ritchie, D., Goss, E., Bart, R. S., Setubal, J. C., Jones, J. B., & Staskawicz, B. J. (2015). Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Front Microbiol*, 6, 535.
- Scott, J. W., Jones, J. B., Somodi, G. C., & Stall, R. E. (1995). Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T3. *HortScience*, 30(3), 579-581.

- Segonzac, C., Macho, A. P., Sanmartin, M., Ntoukakis, V., Sanchez-Serrano, J. J., & Zipfel, C. (2014). Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity. *EMBO J*, 33(18), 2069-2079.
- Seo, E., Kim, S., Yeom, S. I., & Choi, D. (2016). Genome-wide comparative analyses reveal the dynamic evolution of nucleotide-binding leucine-rich repeat gene family among *Solanaceae* plants. *Front Plant Sci*, 7, 1205.
- Shidore, T., Broeckling, C. D., Kirkwood, J. S., Long, J. J., Miao, J., Zhao, B., Leach, J. E., & Triplett, L. R. (2017). The effector AvrRxo1 phosphorylates NAD in planta. *PLoS Pathog*, 13(6), e1006442.
- Simpson, L. L. (2004). Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 167-193.
- Singer, A. U., Schulze, S., Skarina, T., Xu, X., Cui, H., Eschen-Lippold, L., Egler, M., Srikumar, T., Raught, B., Lee, J., Scheel, D., Savchenko, A., & Bonas, U. (2013). A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. *PLoS Pathog*, 9(1), e1003121.
- Smith, T. F. (2008). Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell Biochem*, 48, 20-30.
- Song, J., & Bent, A. F. (2014). Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog*, 10(4), e1004030.
- Stall, R. E. (1995). *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. In R. P. Singh, U. S. Singh und K. Kohmoto eds, Pathogenesis and host-parasite specificity in plant disease. *Elsevier Science Ltd.*, 1, 167-184.
- Stec, I., Nagl, S. B., van Ommen, G. J., & den Dunnen, J. T. (2000). The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett*, 473(1), 1-5.
- Stirnemann, C. U., Petsalaki, E., Russell, R. B., & Muller, C. W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem Sci*, 35(10), 565-574.
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 16(6), 495-501.
- Stork, W., Kim, J. G., & Mudgett, M. B. (2015). Functional analysis of plant defense suppression and activation by the *Xanthomonas* core type III effector XopX. *Mol Plant-Microbe Interact*, 28(2), 180-194.
- Stuurman, N., Heins, S., & Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*, 122(1-2), 42-66.
- Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., & Johansen, T. (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy*, 7(9), 993-1010.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A., & Bonas, U. (2010). Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol*, 187(4), 1058-1074.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., & Van den Ackerveken, G. (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J*, 26(5), 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., & Bonas, U. (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol*, 46(1), 13-23.
- Taylor, K. W., Kim, J. G., Su, X. B., Aakre, C. D., Roden, J. A., Adams, C. M., & Mudgett, M. B. (2012). Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS Pathog*, 8(6), e1002768.
- Templeton, G. W., & Moorhead, G. B. (2005). The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep*, 6(8), 723-728.

- Teper, D., Burstein, D., Salomon, D., Gershovitz, M., Pupko, T., & Sessa, G. (2016). Identification of novel *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector proteins by a machine-learning approach. *Mol Plant Pathol*, *17*(3), 398-411.
- Teper, D., Girija, A. M., Bosis, E., Popov, G., Savidor, A., & Sessa, G. (2018). The *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopAU is an active protein kinase that manipulates plant MAP kinase signaling. *PLoS Pathog*, *14*(1), e1006880.
- Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J. G., Mudgett, M. B., & Sessa, G. (2014). *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *Plant J*, *77*(2), 297-309.
- Thieme, F. (2006). Genombasierte Identifizierung neuer potentieller Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Disseration; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., & Kaiser, O. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, *187*(21), 7254-7266.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G., & Bonas, U. (2007). New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant-Microbe Interact*, *20*(10), 1250-1261.
- Toruno, T. Y., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu Rev Phytopathol*, *54*, 419-441.
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci*, *3*, 85.
- Üstün, S., Bartetzko, V., & Börnke, F. (2013). The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. *PLoS Pathog*, *9*(6), e1003427.
- Üstün, S., & Börnke, F. (2015). The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ proteolytically degrades proteasome subunit RPT6. *Plant Physiol*, *168*(1), 107-119.
- Üstün, S., Hafrén, A., Liu, Q., Marshall, R. S., Minina, E. A., Bozhkov, P. V., Vierstra, R. D., & Hofius, D. (2018). Bacteria Exploit Autophagy for Proteasome Degradation and Enhanced Virulence in Plants. *Plant Cell*, *30*(3), 668-685.
- van Nocker, S., & Ludwig, P. (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, *4*(1), 50.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M., & Schell, J. (1975). Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *J Gen Virol*, *26*(1), 33-48.
- Wang, Y., Hu, X. J., Zou, X. D., Wu, X. H., Ye, Z. Q., & Wu, Y. D. (2015). WDSPdb: a database for WD40-repeat proteins. *Nucleic Acids Res*, *43*(Database issue), D339-344.
- Wei, C., Chen, J., & Kuang, H. (2016). Dramatic number variation of *R* genes in *Solanaceae* species accounted for by a few *R* gene subfamilies. *PLoS One*, *11*(2), e0148708.
- Whalen, M., Richter, T., Zakharevich, K., Yoshikawa, M., Al-Azzeh, D., Adefioye, A., Spicer, G., Mendoza, L. L., Morales, C. Q., Klassen, V., Perez-Baron, G., Toebe, C. S., Tzovolous, A., Gerstman, E., Evans, E., Thompson, C., Lopez, M., & Ronald, P. C. (2008). Identification of a host 14-3-3 protein that interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv. *Physiol Mol Plant Pathol*, *72*(1-3), 46-55.
- Whalen, M. C., Wang, J. F., Carland, F. M., Heiskell, M. E., Dahlbeck, D., Minsavage, G. V., Jones, J. B., Scott, J. W., Stall, R. E., & Staskawicz, B. J. (1993). Avirulence

- gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant-Microbe Interact*, 6(5), 616-627.
- White, F. F., Potnis, N., Jones, J. B., & Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol*, 10(6), 749-766.
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol*, 163(1), 5-20.
- Yoshiyama, K. O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., & Umeda, M. (2013). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep*, 14(9), 817-822.
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu Rev Phytopathol*, 55, 109-137.
- Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*, 428(9 Pt A), 1714-1724.
- Zhang, X., Dodds, P. N., & Bernoux, M. (2017). What do we know about NOD-like receptors in plant immunity? *Annu Rev Phytopathol*, 55, 205-229.
- Zhao, B., Dahlbeck, D., Krasileva, K. V., Fong, R. W., & Staskawicz, B. J. (2011). Computational and biochemical analysis of the *Xanthomonas* effector AvrBs2 and its role in the modulation of *Xanthomonas* type three effector delivery. *PLoS Pathog*, 7(12), e1002408.
- Zhou, J., Wang, J., Cheng, Y., Chi, Y. J., Fan, B., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2013). NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet*, 9(1), e1003196.
- Zhou, S., Hong, Q., Li, Y., Li, Q., & Wang, M. (2018). Autophagy contributes to regulate the ROS levels and PCD progress in TMV-infected tomatoes. *Plant Sci*, 269, 12-19.
- Zientara-Rytter, K., Lukomska, J., Moniuszko, G., Gwozdecki, R., Surowiecki, P., Lewandowska, M., Liszewska, F., Wawrzynska, A., & Sirko, A. (2011). Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy*, 7(10), 1145-1158.
- Zientara-Rytter, K., & Sirko, A. (2014a). Selective autophagy receptor Joka2 co-localizes with cytoskeleton in plant cells. *Plant Signal Behav*, 9(3), e28523.
- Zientara-Rytter, K., & Sirko, A. (2014b). Significant role of PB1 and UBA domains in multimerization of Joka2, a selective autophagy cargo receptor from tobacco. *Front Plant Sci*, 5, 13.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 414-420.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol*, 35(7), 345-351.

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Verwendung
pUC57-f	TAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Sequenzierung von pUC57 (-Bsal)
pUC57-r	GGCACCCCAGGCTTTACA	Sequenzierung von pUC57 (-Bsal)
M13-f	GTA AACGACGGCCAG	Sequenzierung von pEGG (WS)
M13-r	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pEGG (WS)
pVM_QE-f	TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG	Sequenzierung von pGGE
pGEX-r	CTATCGCTACGTGACTGGGTCATGG	Sequenzierung von pGGE
35S-f	TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATC	Sequenzierung von pGGA
pVM_BGW-r	GGGAACTACTCACACATTATTCTG	Sequenzierung von pGGA
T7Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung von pGBST7 und pGBK GG
pGBST7-r	TCGTTTTAAACCTAAGAGTC	Sequenzierung von pGBST7 und pGBK GG
GAL4_AD-f	CACTACAGGGATGTTTAATACCACTAC	Sequenzierung von pACT2.2 und pGAD GG
pGAD-r	AGATGGTGCACGATGCACAG	Sequenzierung von pACT2.2 und pGAD GG
300-seq-679_f	GCGTCGGCAAACAGTGGTCC	Sequenzierung von Split-Tale-Vektoren
300-seq-2824_r	CGGGAATACGGCGATTGGTTC	Sequenzierung von Split-Tale-Vektoren
300-seq-2669_f	CCAGTTATCTCGCCCTGATCC	Sequenzierung von Split-Tale-Vektoren
CaJoka2-GG-f	TTTGGTCTCTTATGAGGCAGGACCTGAATCCCTTGAG	Amplifizierung von <i>CaJoka2</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaJoka2-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGCTGCTGCTCTCCAGCAATAAGATCC	Amplifizierung von <i>CaJoka2</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaJoka2-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCCCTGCTGCTCTCCAGCAATAAGATCC	Amplifizierung von <i>CaJoka2</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StJoka2-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAGTCATCTATTGTGATCAAGGTC	Amplifizierung von <i>StJoka2/StJoka2<sub>AIM</sub></i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StJoka2-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGCTGCTCTCCAGCAATAAGATCC	Amplifizierung von <i>StJoka2/StJoka2<sub>AIM</sub></i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StJoka2-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCCCTGCTCTCCAGCAATAAGATCC	Amplifizierung von <i>StJoka2/StJoka2<sub>AIM</sub></i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StATG8CL-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGCCAAAAGCTCCTTCAAATTG	Amplifizierung von <i>StATG8CL</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StATG8CL-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGAACGATCCGAATGTATTCTCTCC	Amplifizierung von <i>StATG8CL</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
StATG8CL-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACC GAACGATCCGAATGTATTCTCTCC	Amplifikation von <i>StATG8CL</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaATM-like-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAACACAGGATATATCAGAAACCC	Amplifizierung von <i>CaATM-like</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaATM-like-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCACGATGAAGAAGGGCCAACCATGG	Amplifizierung von <i>CaATM-like</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaATM-like-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCCGATGAAGAAGGGCCAACCATGG	Amplifizierung von <i>CaATM-like</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIATM-like-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAACACAGAAGATTCAGAAACCC	Amplifizierung von <i>SIATM-like</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIATM-like-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCACGACGAAGAAGAACCAACCATGGTGC	Amplifizierung von <i>SIATM-like</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIATM-like-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCCGACGAAGAAGAACCAACCATGGTGC	Amplifizierung von <i>SIATM-like</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIWD40-GG-f	TTTGGTCTCTTATGTCTGGAGAAGATCCAGTAGATATAGG	Amplifizierung von <i>SIWD40</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen

SIWD40-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCATTCTGATGAGAGCCGACAACCAGCATGAAC	Amplifizierung von <i>SIWD40</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIWD40-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCTTCTGATGAGAGCCGACAACCAGCATGAAC	Amplifizierung von <i>SIWD40</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaDUF869-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGGTGCAGCATCGAAAGTGAAG	Amplifizierung von <i>CaDUF869</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaDUF869-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCACAGGTGGCACTCCACTCTTACTCC	Amplifizierung von <i>CaDUF869</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaDUF869-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCCAGGTGGCACTCCACTCTTACTCC	Amplifizierung von <i>CaDUF869</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIDUF869-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAAAAGAGGAAATGGTTGTGGAAAAGG	Amplifizierung von <i>SIDUF869</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIDUF869-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCATTTATCCTCGATAACTTTTAGAGTTGG	Amplifizierung von <i>SIDUF869</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIDUF869-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCTTTATCCTCGATAACTTTTAGAGTTGG	Amplifizierung von <i>SIDUF869</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaRIC1-GG-f	TTTGGTCTCTTATGTATATGGCATATGGATGGCCACAGG	Amplifizierung von <i>CaRIC1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaRIC1-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCATGTCTCTTCTGAATTTGAAGCGGATGAAAG	Amplifizierung von <i>CaRIC1</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaRIC1-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCTGTCTCTTCTGAATTTGAAGCGGATGAAAG	Amplifizierung von <i>CaRIC1</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaGLDC-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAACTGTGAAAGTCTAGAAAATTGGC	Amplifizierung von <i>CaGLDC</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaGLDC-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAAGCATTTGCAGCTTTTTCTTCCGCC	Amplifizierung von <i>CaGLDC</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaGLDC-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCAAGCATTTGCAGCTTTTTCTTCCGCC	Amplifizierung von <i>CaGLDC</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaUGT89A2-GG-f	TTTGGTCTCTTATGTCTAGCTCTAAAAATGGTGTTTC	Amplifizierung von <i>CaUGT89A2</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaUGT89A2-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGCTTTTTAGTTGGGCCAGCTC	Amplifizierung von <i>CaUGT89A2</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaUGT89A2-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCGCTTTTTAGTTGGGCCAGCTC	Amplifizierung von <i>CaUGT89A2</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIUGT89A2-GG-f	TTTGGTCTCTTATGTCCAAAATGGTGTTTCATATCTTAATTTTTCC	Amplifizierung von <i>SIUGT89A2</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIUGT89A2-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAACTTTTTAGTTGGGCCAACTCTC	Amplifizierung von <i>SIUGT89A2</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIUGT89A2-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCACTTTTTAGTTGGGCCAACTCTC	Amplifizierung von <i>SIUGT89A2</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaAt5g41260-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGGCTGTGGGTGCTCTAAATTC	Amplifizierung von <i>CaAt5g41260</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaAt5g41260-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGGAATTTGTGTTCTTCTCTCTTCG	Amplifizierung von <i>CaAt5g41260</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIAt5g41260-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGGCTGTGAAAGTCTAAACTTG	Amplifizierung von <i>SIAt5g41260</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIAt5g41260-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAAGCAGATGCAATTTTTCTTCTTCG	Amplifizierung von <i>SIAt5g41260</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaNAC-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGAGCAAGAAGGAGCACTTGTTTTAG	Amplifizierung von <i>CaNAC</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaNAC-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAACCATTTCCGACGAGTTTCTCAAGTC	Amplifizierung von <i>CaNAC</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SibHHLH35-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGACAACATTGGTGATGAATATAAAAAT	Amplifizierung von <i>SibHHLH35</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SibHHLH35-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAAGAACTCATCGGGCTATCGGG	Amplifizierung von <i>SibHHLH35</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaGTE4-GG-f	TTTGGTCTCTTATGAGTTTTAAGAGTGAGCTTGATC	Amplifizierung von <i>CaGTE4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaGTE4-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAAATCAAGAGCTTATCATGTTTAGGTG	Amplifizierung von <i>CaGTE4</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIZK-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGCATCCTCTAAGAATGAAGAAAG	Amplifizierung von <i>SIZK</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
SIZK-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCACCGCTTTTTGTTATGCCTCTTGC	Amplifizierung von <i>SIZK</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGCGTTTGAAGCTCTTACC	Amplifizierung von <i>AtEDS1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGGTATCTGTTATTTTCATCCATCATATAG	Amplifizierung von <i>AtEDS1</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG-s-r	TTTGGTCTCTCACCGGTATCTGTTATTTTCATCCATCATATAG	Amplifizierung von <i>AtEDS1</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-f	TTTGGTCTCTTATGGACGATTGTGCGATTGCGAG	Amplifizierung von <i>AtPAD4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG+s-r	TTTGGTCTCTAAGCTTCA AGTCTCCATTGCGTCACTCTC	Amplifizierung von <i>AtPAD4</i> mit Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-s-r	TTTGGTCTCTCAC AGTCTCCATTGCGTCACTCTC	Amplifizierung von <i>AtPAD4</i> ohne Stop mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
CaJoka2-VIGS-f	TTTGGTCTCTTATGCCTCCGTTTCTAACTTGAATTC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment
CaJoka2-VIGS-r	TTTGGTCTCTCACCGATTATAGGATGGCACCCCACTTTT	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment



CaATM-like-VIGS-f	TTTGGTCTCTTATGGGAAAATCTGAAAAAGTTTTGAGTC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment
CaATM-like-VIGS-s-r	TTTGGTCTCTCACCGAGCATTCTGCCGAAGAGAC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment
CaWD40-VIGS-f	TTTGGTCTCTTATGGTTTAACCCAGTGAACGATGAATAC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment
CaWD40-VIGS-s-r	TTTGGTCTCTCACCTTAGATGGGTCTTGTGGAAAAAAGCTG	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment
CaJokA2-qRT-f	CCCTAGGTTTCATATCTAAAGTAAAGGAG	qRT-PCR-Primer für <i>CaJokA2</i>
CaJokA2-qRT-r	GAGCATGTAAACCCCTTGAAAGACCAG	qRT-PCR-Primer für <i>CaJokA2</i>
CaATM-like-qRT-f	GCTAATAAATCTGCTGCCATTGGG	qRT-PCR-Primer für <i>CaATM-like</i>
CaATM-like-qRT-r	CGATAACTGACAAGGGAAGGTCCAAAC	qRT-PCR-Primer für <i>CaATM-like</i>
CaWD40-qRT-f	CTGCATGTGTTCCAAGGGCATAAC	qRT-PCR-Primer für <i>CaWD40</i>
CaWD40-qRT-r	CAGCAGTCACTATGTCTCTGATGTC	qRT-PCR-Primer für <i>CaWD40</i>
PM1/2_Bs4 (2123)_f	TTTGGTCTCAATTCCTATGGTTAGAGTCGAGTTTGTCTATG	Generierung <i>Bs4</i> -Promotor-Modul
PM1/2_Bs4 (1818)_f	TTTGGTCTCAATTCGCGACCAGATGTAATTATAGCCAC	Generierung <i>Bs4</i> -Promotor-Modul
PM1/2_Bs4 (1208)_f	TTTGGTCTCAATTCGAGAATTCTGTTGCATTCTCTTTTCTC	Generierung <i>Bs4</i> -Promotor-Modul
PM1/2_Bs4 (604)_f	TTTGGTCTCAATTC TTGAAGGATAAAAATGGCCGTATATGTATG	Generierung <i>Bs4</i> -Promotor-Modul
AtEDS1-GG-bait_f	TTTGGTCTCAGGTGCCATGGCGTTTGAAGCTCTTACC	Amplifizierung von <i>Bait-AtEDS1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG-bait_r	TTTGGTCTCAAAGCTTTAGGTATCTGTTATTTTCATCCATC	Amplifizierung von <i>Bait-AtEDS1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG-prey_f	TTTGGTCTCATATGGCGTTTGAAGCTCTTACC	Amplifizierung von <i>Prey-AtEDS1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtEDS1-GG-prey_r	TTTGGTCTCATCAAGGTATCTGTTATTTTCATCCATCATATAG	Amplifizierung von <i>Prey-AtEDS1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-bait_f	TTTGGTCTCAGGTGCCATGGACGATTGTCGATTTCGAG	Amplifizierung von <i>Bait-AtPAD4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-bait_r	TTTGGTCTCAAAGCTCTAAGTCTCCATTGCGTCCAC	Amplifizierung von <i>Bait-AtPAD4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-prey_f	TTTGGTCTCATATGGACGATTGTCGATTTCGAG	Amplifizierung von <i>Prey-AtPAD4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AtPAD4-GG-prey_r	TTTGGTCTCATCAAAGTCTCCATTGCGTCCACTC	Amplifizierung von <i>Prey-AtPAD4</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
GFP-GG-bait_f	TTTGGTCTCAGGTGCCATGGTGAAGGCGGAGG	Amplifizierung von <i>Bait-gfp</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
GFP-GG-bait_r	TTTGGTCTCAAAGCTTCACTTGTACAGCTCGTCCATG	Amplifizierung von <i>Bait-gfp</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
GFP-GG-prey_f	TTTGGTCTCATATGGTGAGCAAGGGCGAGG	Amplifizierung von <i>Prey-gfp</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
GFP-GG-prey_r	TTTGGTCTCATCAACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Amplifizierung von <i>Prey-gfp</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
AvrBs3-ADn-prey_f	TTTGGTCTCATATGGAACAAGATGAGGACCCCTTCG	Generierung <i>AvrBs3-ADn</i> -Modul
AvrBs3-ADn-prey_r	AAAGGTCTCTTCAACTGAGGCAATAGCTCCATCAAC	Generierung <i>AvrBs3-ADn</i> -Modul
GG-EBE1_f	TTTGGTCTCACACCTCTATAAACCTGACCCTCTTTC	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE1_r	TTTGGTCTCAGAGCAGATTCCGATTAATAAATAAATTGTATGG	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE2_f	TTTGGTCTCAGCTCTCTATAAACCTGACCCTCTTTC	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE2_r	TTTGGTCTCACGCTAGATTCCGATTAATAAATAAATTGTATGG	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE3_f	TTTGGTCTCAAGCGTCTATAAACCTGACCCTCTTTC	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE3_r	TTTGGTCTCAAGTCAGATTCCGATTAATAAATAAATTGTATGG	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE4_f	TTTGGTCTCAGACTTCTATAAACCTGACCCTCTTTC	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE4_r	TTTGGTCTCAGTCCAGATTCCGATTAATAAATAAATTGTATGG	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE5_f	TTTGGTCTCAGGACTCTATAAACCTGACCCTCTTTC	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
GG-EBE5_r	TTTGGTCTCACCTTAGATTCCGATTAATAAATAAATTGTATGG	Klonierung Reporterkonstrukt mit multiplen <i>EBE<sub>AvrBs3</sub></i>
AvrBs3-AD-A_f	TTTGGTCTCATCAGGAACAAGATGAGGACCCCTTCG	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen <i>AvrBs3-AD</i>
AvrBs3-AD-A_r	AAAGGTCTCTCTGAGGCAATAGCTCCATCAAC	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen <i>AvrBs3-AD</i>

AvrBs3-AD-B_r	AAAGGTCTCTGTTCCCTGAGGCAATAGCTCCATCAAC	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen AvrBs3-AD
AvrBs3-AD-B_f	TTTGGTCTCAGAACAAGATGAGGACCCCTTCG	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen AvrBs3-AD
AvrBs3-AD-C_f	TTTGGTCTCAAGGAACAAGATGAGGACCCCTTCG	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen AvrBs3-AD
AvrBs3-AD-C_r	AAAGGTCTCTTCCTGAGGCAATAGCTCCATCAAC	Klonierung <i>Prey</i> -Konstrukt mit multiplen AvrBs3-AD
Bait-D1-right_f	TTGGTCTCAGGTGCGAGCTCCCAGTCACGAGTACGCTTTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
Bait-D1-right_r	TTGGTCTCAAAGCGTACTCGTGACTGGGAGCTCGCACCTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
Bait-D1_f	TTGGTCTCAGGTGCGAGCTGCCAGTCACGAGTACGCTTTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
Bait-D1_r	TTGGTCTCAAAGCGTACTCGTGACTGGCAGCTCGCACCTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
BaP-D2_f	TATGAGAGACCGCCGCATTAGG	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
Bait-D2_r	AAGCAGAGACCGTCGACCTGC	Generierung pGGA8-sTALE(Bait)-Vektor
Prey-ADc-D1_f	TTGGTCTCATATGTCGGGATCTGGCTCAGGCCTTGATGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(PreyAD)-Vektor
Prey-ADc-D1_r	TTGGTCTCATCAAGGCCTGAGCCAGATCCCGACATATGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(PreyAD)-Vektor
Prey-ADn-D1_f	TTGGTCTCAGGTGCAGGCCTCCAGTCACGAGTACGCTTTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(PreyAD)-Vektor
Prey-ADn-C-D1_r	TTGGTCTCAAAGCGTACTCGTGACTGGAGGCCTGCACCTGAGACCAA	Generierung pGGA8-sTALE(PreyAD)-Vektor
Prey-D2_r	ATCCACCAGAGACCGTCGACCTGC	Generierung pGGA8-sTALE(PreyAD)-Vektor

f forward; r reverse

## 6.2 Verwendete Vektoren und Plasmide

Tabelle 16: Verwendete Vektoren und Plasmide.

Vektor/Plasmid	Eigenschaften/Verwendung	Referenz	
Klonierungsvektoren und -plasmide			
pUC57 (Bsal <sup>r</sup> )	Klonierungsvektor zur <i>blunt end</i> -Insertion von DNA-Fragmenten; pUC19-Derivat; <i>lacZ</i> -Gen in MCS; Amp <sup>R</sup> ; Bsal-Schnittstelle in Amp-Resistenzgen entfernt (R. Morbitzer)	Genscript, USA	
pEGG (WS)	pENTR-D-Derivat mit <i>Golden Gate</i> (GG)-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; mit Stop; Kan <sup>R</sup>	Schreiber & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>xopG<sub>WT</sub></i>	ORF-Modul zur Golden-Gate-Klonierung	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>StJoka2</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>StJoka2<sub>AIM</sub></i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>StATG8CL</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIATM-like</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaDUF869</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaTDI-65</i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>SITDI-65</i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>CaLHW</i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>SILHW</i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>CaRIC1</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaGLDC</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaUGT89A2</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIUGT89A2</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaAt5g41260</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIAt5g41260</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaNAC</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SibHLH35</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>CaGTE4</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIZK</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>SIKRP1</i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten	
pUC57: <i>AtEDS1</i>		Diese Arbeit	
pUC57: <i>AtPAD4</i>		Split-TALE, ORF-Modul zur Golden-Gate-Klonierung	Diese Arbeit
pUC57: <i>GFP</i>			Diese Arbeit

pUC57: <i>HsLaminC</i>	Split-TALE, ORF-Modul zur Golden-Gate-Klonierung	Diese Arbeit
pJET1.2_NTM-AvrBs3		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57_Rep1-6		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57_Rep7-12		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57_Rep13-13.5		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57_C63_NLS_416		Reschke & Boch, unpublizierte Daten
pUC57_SV40_NLS		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57_AD <sub>AvrBs3</sub>		Schreiber & Bonas, 2014
pUC57: ADNTM		Diese Arbeit
pUC57: <i>Bait-AtEDS1</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>Bait-AtPAD4</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>Bait-GFP</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>Prey-AtEDS1-ADc</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>Prey-AtPAD4-ADc</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>Prey-GFP-ADc</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE1</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE2</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE3</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE4</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE5</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE2R</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE3R</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>EBE4R</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADc LA</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADc AR</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADc BR</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADc CR</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>AD AB</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>AD BC</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADn LA</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADn AR</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADn BR</i>		Diese Arbeit
pUC57: <i>ADn CR</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>xopG<sup>HEHEY</sup></i>	ORF-Modul zur GATEWAY®-Klonierung	Diese Arbeit
pEGG: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIATM-like</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaDUF869</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIDUF869</i>	Diese Arbeit	

pEGG: <i>CaDUF869</i>	ORF-Modul zur GATEWAY (GW) <sup>®</sup> -Klonierung	Diese Arbeit
pEGG: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaTDI-65</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SITDI-65</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaLHW</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SILHW</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaRIC1</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaGLDC</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaUGT89A2</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIUGT89A2</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaAt5g41260</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIAt5g41260</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaNAC</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SibHLH35</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>CaGTE4</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIZK</i>		Diese Arbeit
pEGG: <i>SIKRP1</i>	Diese Arbeit	
Vektoren und Plasmide für Interaktionsstudien, Lokalisierungsstudien und phänotypische Analysen <i>in planta</i>		
pGGA1	Binärvektor mit 35S-Promotor, C-terminalem GFP-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Spec <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem GFP-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Spec <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA7	Binärvektor mit 35S-Promotor, C-terminalem 4x-c-Myc-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Spec <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA8	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem 4x-c-Myc-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Spec <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA12	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem mOrange-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Spec <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>ev</i>	Leervektor von pGGA2, kodiert GFP	Sorgatz & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA8: <i>ev</i>	Leervektor von pGGA8, kodiert 4x-c-Myc	Sorgatz & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA1: <i>xopG<sub>WT</sub></i>	Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation und Expression	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA1: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA1: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA1: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGA2: <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>xopG<sub>E174A</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>xopG<sub>Y208A</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten

pGGA2: <i>xopG<sub>HE</sub></i>	Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation und Expression	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGA2: <i>xopG<sub>WT</sub>-gfp</i>		Diese Arbeit
pGGA2: NES- <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA2: nes- <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA7: <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA7: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA7: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA7: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>CaTDI-65</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>SILHW</i>		Diese Arbeit
pGGA8: <i>SIWD40-NES</i>		Diese Arbeit
pGGA12: <i>xopG<sub>WT</sub>-mOrange</i>		Diese Arbeit
pGGA12: <i>xopG<sub>EY</sub>-mOrange</i>		Diese Arbeit
pGGA12: <i>xopG<sub>HEHEY</sub>-mOrange</i>	Diese Arbeit	
Vektoren und Plasmide für Interaktionsstudien mittels Split-TALE-Assay		
pGWB3-GG	Binärvektor ohne Promotor, Epitop, mit GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette, <i>uidA</i> -Reportergen, pGWB3-Derivat; Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Becker & Boch, unpublizierte Daten
pGGA8-sTALE(Bait)	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem 4xc-Myc-Epitop, NTR <sub>AvrBs3</sub> , CRD <sub>AvrBs3</sub> mit 13,5 <i>repeats</i> , C63 <sub>AvrBs3</sub> -SV40-NLS, AS-Linker; (GAS), GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette (TATG/GCTT); Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc)	Binärvektor mit Prey 35S-Promotor, N-terminalem 4xc-Myc-Epitop, AS-Linker (~MSGSGSG~), GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette (TATG/GGTG), SV40-NLS, C-terminaler AD <sub>AvrBs3</sub> ; Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn)	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem 4xc-Myc-Epitop, N-terminaler AD <sub>AvrBs3</sub> , SV40-NLS, AS-Linker (GAG), GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette (TATG/GCTT); Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGWB3:EBE <sub>AvrBs3</sub> - <i>pBs4</i> min	<i>uidA</i> -Reporterkonstrukte mit einfacher EBE <sub>AvrBs3</sub> und <i>Bs4</i> -Promotor	Schreiber & Bonas, 2014
pGWB3:(EBE <sub>AvrBs3</sub> - <i>pBs4</i> min) <sub>2x</sub>	<i>uidA</i> -Reporterkonstrukte mit zweifacher Vervielfältigung der EBE <sub>AvrBs3</sub> und <i>Bs4</i> -Promotors	Diese Arbeit
pGWB3:(EBE <sub>AvrBs3</sub> - <i>pBs4</i> min) <sub>3x</sub>	<i>uidA</i> -Reporterkonstrukte mit dreifacher Vervielfältigung der EBE <sub>AvrBs3</sub> und <i>Bs4</i> -Promotors	Diese Arbeit
pGWB3:(EBE <sub>AvrBs3</sub> - <i>pBs4</i> min) <sub>4x</sub>	<i>uidA</i> -Reporterkonstrukte mit vierfacher Vervielfältigung der EBE <sub>AvrBs3</sub> und <i>Bs4</i> -Promotors	Diese Arbeit
pGWB3:(EBE <sub>AvrBs3</sub> - <i>pBs4</i> min) <sub>5x</sub>	<i>uidA</i> -Reporterkonstrukte mit fünfacher Vervielfältigung der EBE <sub>AvrBs3</sub> und <i>Bs4</i> -Promotors	Diese Arbeit
35S <i>uidA</i>	Binärvektor mit 35S-Promotor, <i>uidA</i> -Reportergen, ohne Epitop	Schreiber & Bonas, 2014
pICH75044	Binärvektor mit 35S-Promotor, <i>uidA</i> -Reportergen, ohne Epitop	Schreiber & Tissier, unpublizierte Daten
pGGA8-sTALE(Bait): <i>AtEDS1</i>	Bait-Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation und Expression in <i>N.b.</i>	Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>AtPAD4</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>gfp</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit

pGGA8-sTALE(Bait): <i>xopG<sub>EY</sub></i>	<i>Bait</i> -Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation und Expression in <i>N.b.</i>	Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>StATG8CL</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>StJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>HsLaminC</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(Bait): <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE (PreyADc): <i>AtEDS1</i>	<i>Prey</i> -Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Transformation und Expression in <i>N.b.</i>	Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>AtPAD4</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>gfp</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADc): <i>StATG8CL</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADc): <i>StJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADc): <i>HsLaminC</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADc): <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADc): <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADc): <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE (PreyADn): <i>AtEDS1</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>AtPAD4</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>gfp</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADn): <i>StATG8CL</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(PreyADn): <i>StJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADn): <i>HsLaminC</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADn): <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADn): <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGA8-sTALE(preYADn): <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
Vektoren und Plasmide für <i>in vitro</i> -Interaktionsstudien		
pGGE2	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotor, N-terminalem GST-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Kan <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGE7	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotor, C-terminalem Strep-Epitop, GG-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; Kan <sup>R</sup>	Thieme & Bonas, unpublizierte Daten
pGGE2: <i>ev</i>	Leervektor von pGGE2, kodiert GST	Sorgatz & Bonas, unpublizierte Daten

pGGE7: <i>gfp</i>	Konstrukt zur Expression in <i>E. coli</i>	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGE7: <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGE7: <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGGE7: <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>CaTDI-65</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>SILHW</i>		Diese Arbeit
pGGE2: <i>Calmpa</i>		Sorgatz & Bonas, unpublizierte Daten
Vektoren und Plasmide für Interaktionsstudien mittels Y2H-System		
pGBST7	Expressionsvektor für Hefe mit <i>ADH1</i> -Promotor, N-terminalem BD <sub>GAL4</sub> und 4x-c-Myc-Epitop, GW-kompatible <i>ccdB</i> -Kassette; Derivat von pGBKT7; Tryptophan-Auxotrophiemarker; Spec <sup>R</sup>	Clontech
pACT2.2gtwy	Expressionsvektor für Hefe mit <i>ADH1</i> -Promotor, N-terminalem AD <sub>GAL4</sub> und HA-Epitop, GW-kompatible <i>ccdB</i> -Kassette; Derivat von pGADT7; Leucin-Auxotrophiemarker; Amp <sup>R</sup>	G. Caldwell, Addgene, Plasmid 11343,
pGBK GG	pGBKT7-Derivat mit GG-kompatibler <i>LacZ</i> -Kassette; Kan <sup>R</sup>	Stuttman & Bonas, unpublizierte Daten
pGAD GG	pGADT7-Derivat mit GG-kompatibler <i>LacZ</i> -Kassette; Amp <sup>R</sup>	Stuttman & Bonas, unpublizierte Daten
pGBST7:StopAD <sub>GAL4</sub>	pGBST7-Derivat, kodiert BD <sub>GAL4</sub>	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGBST7:AD <sub>GAL4</sub>	pGBST7-Derivat, kodiert BD <sub>GAL4</sub> +AD <sub>GAL4</sub>	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGADT7attRpelib	pGADT7-Derivat, enthält eine Paprika-cDNA-Bibliothek	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
pACT2.2gtwy :ev	Leervektor von pACT2.2gtwy, kodiert AD <sub>GAL4</sub>	Sorgatz, Hoppe & Bonas, unpublizierte Daten
pGBST7: <i>xopG<sub>WT</sub></i>	Köder-Konstrukt zur Expression <i>S. cerevisiae</i>	Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGBST7: <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Prochaska & Bonas, unpublizierte Daten
pGBST7: <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
pGBST7: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pGBK: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pGBK: <i>StJoka2</i>		Diese Arbeit
pGBK: <i>StJoka2<sub>AIM</sub></i>		Diese Arbeit
pGBK: <i>StATG8CL</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaJoka2</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaATM-like</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIATM-like</i>	Beute-Konstrukt zur Expression <i>S. cerevisiae</i>	Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIWD40</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaDUF869</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaDUF869</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIDUF869</i>		Diese Arbeit



pACT2.2: <i>CaTDI-65</i>	Beute-Konstrukt zur Expression <i>S. cerevisiae</i>	Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SITDI-65</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaLHW</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SILHW</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaRIC1</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaGLDC</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaUGT89A2</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIUGT89A2</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaAt5g41260</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIAt5g41260</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaNAC</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SibHLH35</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>CaGTE4</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIZK</i>		Diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIKRP1</i>		Diese Arbeit
pGAD: <i>xopG<sub>WT</sub></i>		Diese Arbeit
pGAD: <i>xopG<sub>EY</sub></i>		Diese Arbeit
pGAD: <i>xopG<sub>HEHEY</sub></i>		Diese Arbeit
Vektoren und Plasmide für VIGS		
TRV-RNA1	Binärer VIGS-Vektor, der Replikasen, „Movement“ Protein und Cystein-reiches Protein von TRV kodiert, Kan <sup>R</sup>	(Liu <i>et al.</i> , 2002)
TRV-RNA2a	GW-kompatibles Derivat von pTRV-RNA2 (Liu <i>et al.</i> , 2002), kodiert 3 TRV-Proteine und enthält Integrationsstelle für <i>Silencing</i> -Fragment von Interesse, Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
TRV-RNA2a: <i>gfp</i>	Derivat von pTRV-RNA2a zur Verbreitung der GFP-Sequenz mittels TRV-basiertem VIGS-System	(Gürlebeck, 2007)
TRV-RNA2a: <i>CaJoka2</i>	<i>Silencing</i> -Konstrukt für <i>CaJoka2</i>	Diese Arbeit
TRV-RNA2a: <i>CaWD40</i>	<i>Silencing</i> -Konstrukt für <i>CaWD40</i>	Diese Arbeit
TRV-RNA2a: <i>CaATM-like</i>	<i>Silencing</i> -Konstrukt für <i>CaATM-like</i>	Diese Arbeit

<sup>a</sup> *Ca* (*Capsicum annuum*); *Sl* (*Solanum lycopersicum*); *St* (*Solanum tuberosum*); *ev* *empty vector*, „Leervektor“; Für die Klonierung von *StATG8CL*, *StJoka2* und *StJoka2<sub>AIM</sub>* aus *St* wurden entsprechende *template* (pK7WGF2: *ATG8CL*; pB7RWG2: *Joka2* und pB7RWG2: *Joka2*) von Y. Dagdas (Gregor Mendel Institut für Molekulare Pflanzenbiologie, Wien) zur Verfügung gestellt.

### 6.3 Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen

Tabelle 17: Fusionsproteine mit erwarteten molekularen Massen.

Name Fusionsprotein	molekularen Massen in Kilodalton (kDa)
Interaktionsstudien in Hefe	
BD <sub>GAL4</sub>	21,2
BD <sub>GAL4</sub> -Xop <sub>GWT</sub>	44,4
BD <sub>GAL4</sub> -Xop <sub>GEY</sub> <sup>-</sup>	44,4
BD <sub>GAL4</sub> -Xop <sub>GHEHEY</sub> <sup>-</sup>	44,4
BD <sub>GAL4</sub> -CaJoka2	106,7
BD <sub>GAL4</sub> -SMD40	93,7
BD <sub>GAL4</sub> -CaATM-like	145,8
BD <sub>GAL4</sub> -StJoka2	115,2
BD <sub>GAL4</sub> -StJoka2 <sub>AIM</sub>	115,2
AD <sub>GAL4</sub> -HA	19,2
AD <sub>GAL4</sub> -HA-Xop <sub>GWT</sub>	42,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-Xop <sub>GEY</sub> <sup>-</sup>	42,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-Xop <sub>GHEHEY</sub> <sup>-</sup>	42,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaJoka2	104,7
AD <sub>GAL4</sub> -HA-SMD40	91,7
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaATM-like	143,8
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaRIC1	145,7
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaDUF869	85,5
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/DUF869	93,1
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/ATM-like	141,8
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaGLDC	131,6
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaUGT89A2	70,5
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/UGT89A2	70,2
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaAt5g41260	73,9
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/At5g41260	73,3
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaNAC	64,9
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/bHLH35	47,8
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaGTE4	77,9
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/IZF	98,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaTDI-65	71,8
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/TDI-65	70,3
AD <sub>GAL4</sub> -HA-CaLHW	119,9
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/LHW	119,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/KRP1	142,4
AD <sub>GAL4</sub> -HA-S/ATG8CL	32,9
<i>In vitro</i> Interaktionsstudien	
GST	25,9
GST-CaJoka2	111,7
GST-CaATM-like	150,5
GST-SMD40	98,4
GST-S/DUF869	99,8
GST-CaTDI-65	78,5
GST-S/LHW	126,1
GST-Calmpα	85,1
Xop <sub>GWT</sub> -Strep	24,5
Xop <sub>GEY</sub> <sup>-</sup> -Strep	24,5
Xop <sub>GHEHEY</sub> <sup>-</sup> -Strep	24,5
GFP-Strep	28,1
Transiente Synthese <i>via Agrobacterium in planta</i>	
4xc-Myc	6,7
4xc-Myc-Xop <sub>GWT</sub>	29,9
Xop <sub>GWT</sub> -4xc-Myc	29,9
4xc-Myc-CaJoka2	92,5
CaJoka2-4xc-Myc	92,5
4xc-Myc-SMD40	79,2
4xc-Myc-NES-SMD40	80,7
SMD40-4xc-Myc	79,2
4xc-Myc-CaATM-like	131,8

CaATM-like-4xc-Myc	131,8
4xc-Myc-S/DUF869	80,6
4xc-Myc-CaTDI-65	59,3
4xc-Myc-S/LHW	106,9
GFP	27,2
GFP-XopG <sub>WT</sub>	50,3
GFP-NES-XopG <sub>WT</sub>	51,8
GFP-nes-XopG <sub>WT</sub>	51,8
XopG <sub>WT</sub> -GFP	50,3
GFP-XopG <sub>WT</sub> -GFP	77,2
GFP-XopG <sub>EY</sub>	50,3
GFP-XopG <sub>HEHEY</sub>	50,3
GFP-XopG <sub>E174A</sub>	50,3
GFP-XopG <sub>HE</sub>	50,3
GFP-XopG <sub>Y208A</sub>	50,3
CaJoka2-GFP	112,9
SMD40-GFP	99,5
CaATM-like-GFP	151,4
mOrange	27,1
mOrange-XopG <sub>WT</sub> -mOrange	77,1
mOrange-XopG <sub>EY</sub> -mOrange	77,1
Split-TALE-System	
4xc-Myc-dAvrBs3-13,5 rep	115,0
4xc-Myc-Bait-AtEDS1	161,2
4xc-Myc-Bait-AtPAD4	154,2
4xc-Myc-Bait-GFP	116,6
4xc-Myc-Bait-HsLaminC	108,7
4xc-Myc-Bait-StJoka2	183,5
4xc-Myc-Bait-StATG8CL	103,4
4xc-Myc-Bait-XopG <sub>WT</sub>	111,4
4xc-Myc-Bait-XopG <sub>EY</sub>	111,4
4xc-Myc-Bait-XopG <sub>HEHEY</sub>	111,4
4xc-Myc-Bait-CaJoka2	175,6
4xc-Myc-Bait-SMD40	162,2
4xc-Myc-Bait-CaATM-like	214,0
4xc-Myc-Prey-AtEDS1-ADc	84,0
4xc-Myc-Prey-AtEDS1-ADn	84,0
4xc-Myc-Prey-AtPAD4-ADc	74,1
4xc-Myc-Prey-AtPAD4-ADn	74,1
4xc-Myc-Prey-GFP-ADc	40,1
4xc-Myc-Prey-GFP-ADn	40,1
4xc-Myc-Prey-HsLaminC-ADc	32,1
4xc-Myc-Prey-HsLaminC-ADn	32,1
4xc-Myc-Prey-StJoka2-ADc	107,2
4xc-Myc-Prey-StJoka2-ADn	107,1
4xc-Myc-Prey-StATG8CL-ADc	26,4
4xc-Myc-Prey-StATG8CL-ADn	26,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>WT</sub> -ADc	36,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>WT</sub> -ADn	36,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>EY</sub> -ADc	36,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>EY</sub> -ADn	36,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>HEHEY</sub> -ADc	36,4
4xc-Myc-Prey-XopG <sub>HEHEY</sub> -ADn	36,4
4xc-Myc-Prey-CaJoka2-ADc	98,5
4xc-Myc-Prey-CaJoka2-ADn	98,5
4xc-Myc-Prey-SMD40-ADc	85,7
4xc-Myc-Prey-SMD40-ADn	85,7
4xc-Myc-Prey-CaATM-like-ADc	137,5
4xc-Myc-Prey-CaATM-like-ADn	137,5

## 6.4 AS-Sequenzen von XopG und dessen Derivaten

### AS-Sequenz von XopG<sub>WT</sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVL AHEL IHAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEELRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKYKPHGM

### AS-Sequenz von XopG<sub>EY<sup>-</sup></sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVL AQLIHAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEELRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKFKPHGM

### AS-Sequenz von XopG<sub>HEHEY<sup>-</sup></sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVLAAALIAAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEALRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKAKPHGM

### AS-Sequenz von XopG<sub>HE<sup>-</sup></sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVLAAALIHAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEELRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKYKPHGM

### AS-Sequenz von XopG<sub>E174A</sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVL AHEL IHAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEALRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKYKPHGM

### AS-Sequenz von XopG<sub>Y208A</sub> aus Xcv

MPISQTNFPGIYISTQTSAREEPYKNQVESALEKIAAGSSGSALLEGLGAI SARKNRKVTIAEIGA  
EARPNTTAALSASEVEKYKPRTFSDNQALAMERARKGKGCNAIVEWSPHSHIELNANGSPLRLGSN  
PEESFVVL AHEL IHAQHLLAGTSRAYKGGDRYDETSEAGKEELRAVGVGKYEYRKTRQPSENSIRQ  
EHGLPVRKKAKPHGM

## 6.5 AS-Sequenzen der XopG-Interaktoren

### AS-Sequenz von CaJoka2 aus *C. annuum*

MRQDLNPLRVSVRLNAAERSGRPSARSSGNSTPLRSPQAQPPLLNLSRVTDVLKYIPEPLRESVM  
 KVCSELATSASSSTPI LAELVAAMSEMGLSYNQNEASGPQSVVEEVGFHNGMSNGNTMCADGGKPNV  
 KSGEPSAKKNGSLKALHGAELTLKTTEPKPTASNEAADASVNLKSETLKGQTEAQSSSFKYPK  
 AQTSLVNSEEEKKFSVHAGGKAVGYGYWSGSP I PPEKPSDEQHPRSKPVDLGCSSASSGKLKQCW  
 DAPNADSSGSSIKMPYGSVTPTRLFPLLNNTVNVI PSNAGSSGSSMKI PYDGFRAVNHVQLNPNQ  
 ECPFSGVPTVNNPIPPQNVPFVTLKRSHHQSDGTGTIFHKGVRCGCGVHPITGPRFISKVKENY  
 DLCSICFGEMGNADYIRMDRPVTPHPWSFKGLHALHGRFRPPVVPQVCRGYGLKAGRPKLDSRF  
 IQDVNILDGTLMAPLTRFTKIWRMKNNGNLIWPQGTQLVWIGGDKLSDRFSVELEITTAGLAVDQE  
 LDVAVDFTAPEHPGRYISYWRLASSGQKFGQRVWVLIQVDALLNLPKKGLVHEAFQGLNLP  
 SSVMSVTPDIVNVNVPQNVLPKPKSSSTMELVDSVTEVNQNKEQEAQFPINDSLLVGVGDKSS  
 SPSAPASPI SYPIIDLTEEAPAESSVAPSAAVAMKAPLQDVGGHNEVEMSLLOELEMFGKQVDLN  
 KEILKNEYDLELSVDDLCGVEEWDPMLEVELEEMGFCDKEMNKQLLKNNGSIKRVVMDLIAGEQQ

### AS-Sequenz von CaATM-like aus *C. annuum*

METQDISETLVEGSVDYKPAVSQIPDGKTLLEGSVLFGLSGSLVGSNVVTKVPSSECYGDGGVSAN  
 VQSKANEANGDDGTELVGVGFEPKLVDECDNIDLEGVTEGEEKANVDDNNDLEGVDTQKLMGQ  
 GAVESENKLANIDGDYNDLEVVEIENKFGDVDDGIDLEALGLGNEAVSFENLMEGGTLKHETQALG  
 SII PETNKINDGDVLAEEFGGEINESQNNNGVEKIGMAEVVEAIDMTVDPKPRKVEVSGDGITLTVDV  
 FGPLDGMDDSDPDWMPKMYSSMGANGIKAEGDVGDNQEHNFVGDVWVKIKADLWVPGMICD  
 PHQSKDAGKRDQRRGFFVKHFGNTNSVWCQPFQLKPFIEYFELMSCLNKSGSFCGAIEKALGEFGR  
 LVKQKMTCSFCSKEHQVAAQNFPSKEDGSGSVFLPSQFEPSEFLNFIRLRALGVRSPGRIEFTVT  
 ESCLVAFYSSIGHKQLPLYKLRPTNNVKDSAVNDLISGSKDEDLKDLSGDGVLKSCRSGFDDCRM  
 TEVVPGLFESPRGMGSMISRSQIANEDAGGKSEKGFESRERKSKYLSYPYVNSWGRKNSLGQGE  
 DETEDFEEDSLGGVKRSSSPMVSTPIGNSINKNPLRKRKSVIGNGICNNADFAAVSSAEMLQE  
 LHLLTAIDCFPIQSTCSILMQDFFLSFRSYRDPQVQMEDDEKATLGCQETFESHNILASGGYDLQV  
 EGQPPPSVLPKRRGRKKSEDIKATADGTGMNGPALVGSVETGPDTLKKGIVHRKRKAATAPVTHN  
 EIGVLGGPLDLNNGNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRGKKKEELVSENVDPVSKSTTQFIPLL  
 KSVEVTGSPFEGSPQPDNMWGLQGASSLPNAALLTGQPNAYE IHAAGSSLLNNSQNEGLVLSAKA  
 EGKKRKRKEKASNIQNNSSALPDLNGQVMDPNLKGKEFAELSSVTGQDKPKRRRRRANKSAAIGIP  
 NANGDHNTLLLNFALGPVPSKEYIAASFSGFPLEESKTQYLNDSTAQVVFVKAGDAMEALQSLQS  
 RNPFGPSLVSYRLRQVSTSNMQTSHSFLPADALQPGAVPSNGEENLVVVIKQNLAMTTMLEKAG  
 DNISPENRAKLESEVKGFLKKVSTMVGPSSS

### AS-Sequenz von SMD40 aus *S. lycopersicum*

MGSFSDDEGECECRFFDAPESISQGSDDLGSNFIPIPDSSGSGFVNGVSYDEWIKTPRSVVERRKQFRW  
 MGLSLDGMGSDPVDIGGSSNLSTGEIERIMESSGAVLRTSIHKDEFSSYRASRPGLCGGEGGLDSP  
 KQLGSNRDFSFRSGNVDSGIGCNVHVQAENGQHGNNRPVRLERLLMSRELENSPCTSPVIGELGQG  
 ELDKNGDIPKKNLGVKSRLLSRLRSFTCIANAEGRCLELKDNNSNPVQRSRVQRVKVHHCKKRLKE  
 LSALFTGQDIAHEGSILTIKFSFDGQYLASAGEDKIVRVWQVVEDERSNEFDIPELDPSCMYFTV  
 NHLSQLAPLVTDKEKSSSKLKLKTRDSACVVFPPKVFRIEKPLHVFQGHTEVLDLSWSKNNC  
 LLSSSTDKTVRLWQVGNLCLRVFPHSNYVTCIQFNPVNDEYFISGSIDGKVRIWAINSCQVLDWT  
 DIRDIVTAVSYQPDGKGGIIGSMAGSCRFFSLEGHEIQLEEQMCLANKKKSICKRITGFQFFPQDP  
 SKVMVTCADSHVRILDGVNVIKYGKPRTAGNHLASFTSDGKHIVSASEDSNVYVWNCVDPKDYE  
 SQPKVRSSEFFSSDSTIAIPWSGLKIVNPDNGRHCGGGLSQTSSNNVLPFISSPYLSLRELFL  
 I PKGSATWPEEKLPVSSPRSTSSGMCKSEYNLLRSSCQSSSNHAWGLVIVTAGYDGRIRSFHNYG  
 LPLIQQCVCVAMPLPLIDTYPLVYTCVHAGCRLSSE

## 6.6 AS-Alignment von CaATM-like mit Homologen

<i>CaATM-like</i>	241	DSPTKIEVSGDGISLTVDFVFGPDCT---FYMETDNPMPGVNGNEAEGD-VSDNQEHTFAVG	296
		D KI+VSG ISL VD G + F+ N VN N +G+ +++ F VG	
<i>AtATM</i>	52	DKVRKIQVSGGNISLVDFSGARTSSNFF--ESNASCVNENLVKNGYREDETQEFLVG	109
<i>CaATM-like</i>	297	DLVWVKMKTDLWVPGMICDPQTSKDAGKCNQVDGFFVKHFGSTSSV-WCRPFQLKPFIEY	355
		+LVWV K WWP G + D K + + F V+ G + V W +LKPF E	
<i>AtATM</i>	110	NLVWVMTKYKKWVWVPEVVD-----FKADAKESFMVRSIGQSHLVSWFASSKLPFKES	162
<i>CaATM-like</i>	356	FELMSRQNKRSRFSYGAIEKALGEYGRVVKQKMTCSFCFSKEN-QVAAQNVPKEDENG-GS	413
		FE + Q F+ A++KA+ +K MTCSC + N V+AQN+ +++++	
<i>AtATM</i>	163	FEQVLNQRNDNGFFDALQKAMSLLSNSLKLDMTCSCIADNGIVSAQNITTRKNKPLILR	222
<i>CaATM-like</i>	414	AFSASQFEPKFLKFIKSRALGLLSPSDIEFTVAENCLSAFYSSIGHKQLPLYKLR	469
		FS + EP +F+ +K+ A +L+ +E TV ++ LSAFY+ GHKQ+P+ +L	
<i>AtATM</i>	223	EFSVDRLEPKFVFTQLKNIACVNLNAGVLESTVMQSQLSAFYTLFGHKQIPMAQLH	278

*Ca*, *C. annuum* (CA06g19680); *At*, *A. thaliana* (AT3G48190)

<i>CaATM-like</i>		METQDISETLVEGSDVDYKPAVSOIPDGKTLLEEGSVLFGLS--GSLVGSNNVTKVPSSECY	58
		METQ ISETLVEGSDVDYKP +SQ PDGKTL+ SV+ LS G++ VT+VPS	
<i>SLATM-like</i>		METQKISETLVEGSDVDYKPILSQTPDGKTLKVS SVSSLSSES GAVSELVTVTEVPS----	56
<i>CaATM-like</i>		GDGGVSANVQKSKANEANGDDGTELVGVGFEKLVDECDNIDLE-----	102
		G +ANV K+ AN +G + EL+GVGFE K+VD DNID E	
<i>SLATM-like</i>		--GVGNANVHKNIANVVDGTE--LELMGVGFEQKIVDGYDNIDSEVKSEERLVDGYDHIDS	113
<i>CaATM-like</i>		-GVTGEEEEKANVDDNNDLEGVDTEQKLMGQGAVESENKLANIDGDYNDLEVEIENKFG	161
		GV EE+ ANVD+NN LEGVDTEQKL+DGQG VESENKLAN+D DYNDLE VEIENKFG	
<i>SLATM-like</i>		EGVKSEEKLANVDNNGLEGVDTEQKLVGQGTVESENKLANVD--DYNDLEGEVEIENKFG	172
<i>CaATM-like</i>		DVDDGIDLEALGLGNEAVSFENLMEGGTLKHETQALGSIIPETNKINDGDVLAEEFGGEI	221
		DVDD IDLEALGL NE V+ + LME GTLKHETQ E G E	
<i>SLATM-like</i>		DVDDTIDLEALGLANEDVTL DGLMEAGTLKHETQ-----ESGAEF	212
<i>CaATM-like</i>		NESQNGVEKIGMAEVVEAIDMTV----DPPRKEVSGDGITLTVDFVGPLDGLDDSDP	277
		NES +N VEKIG+A+ VE +D + D P K+EVSGDGI+LTVDFVGP	
<i>SLATM-like</i>		NESLDNRVEKIGVADAVEDMDRSKVHINDSPKIEVSGDGISLTVDFVGP-----	262
<i>CaATM-like</i>		DWMPMKNYSSMGANGIKAEGDVGDNDQEHNFVGDVWVKIKADLWVPGMICDPHQSKDA	337
		D M+ + MG NG +AEGDV DNQEH F VGDLVWVK+K DLWVPGMICDP SKDA	
<i>SLATM-like</i>		DCTFYMETDNPMPGVNGNEAEGDVSDNQEHTFAVGDLVWVKMKTDLWVPGMICDPQTSKDA	322
<i>CaATM-like</i>		GKRDQRRGFFVKHFGNTNSVWCQPFQKLPFIEYFELMSCLNKS GSFCAIEKALGEFGR	397
		GK +Q GFFVKHFG+T+SVWC+PFQKLPFIEYFELMS NKS SF GAIEKALGE+GR	
<i>SLATM-like</i>		GKCNQVDGFFVKHFGSTSSVWCPRPFQKLPFIEYFELMSRQNKRSRFSYGAIEKALGEYGR	382
<i>CaATM-like</i>		VKQKMTCSFCFSKEHQVAAQNFPSKEDGSGSVFLPSQFEPSEFLNFIRLRALGVRSPGRI	457
		VKQKMTCSFCFSKE+QVAAQN PSKED +GGS F SQFEPS+FL FI+ RALG+ SP I	
<i>SLATM-like</i>		VKQKMTCSFCFSKENQVAAQNVPKEDENGSAFASQFEPKFLKFIKSRALGLLSPSDI	442
<i>CaATM-like</i>		EFTVTEESCLVAFYSSIGHKQLPLYKLRPTNNVVDKSAVNDLISGKDEDLDKLSGDGVLK	517
		EFTV E+CL AFYSSIGHKQLPLYKLRPT+N IS SKDEDLDKLS SVLK	
<i>SLATM-like</i>		EFTVAENCLSAFYSSIGHKQLPLYKLRPTSN-----QISASKDEDLDKLSGDSVLK	494
<i>CaATM-like</i>		SCRSGFDDCRMTEVVPVPSGLFESPRGMGSMISRSQIANEDAGGKSEKGFESRERKSKYLS	577
		SCRSG DD +MTE+ SG ESPRG SMISRSQI+NE+AGGKSEKGFESRERKSKYLS	
<i>SLATM-like</i>		SCRSGSDDRKMTEMELSGSLES SPRGTRSMISRSQISNENAGGKSEKGFESRERKSKYLS	554
<i>CaATM-like</i>		YPYVNSWG--RKNSLGQGEDETEDFEEDSLGQVGRSSSPSMVSTPIGNSINKNPLRKRKRS	636
		YPYVNSW RKNSLGQGEDETED EE + GGVRSS+PSMVSTPIGNS NK LRK RKS	
<i>SLATM-like</i>		YPYVNSWASRKNSLGQGEDETEDCEEVTPGGVGRSSNPSMVSTPIGNSNKTSLRKRKRS	614

<i>CaATM-like</i>	VIGNNGICNNADFAAVSSAEMLQELHLTAIDCFPIQSTCSILMQDFFLSFRSYRDPQVQ V +N ICNNADF+AVSSAEMLQ LH TA DCFPIQST SI ++DF+LSFR++RDP+VQ	696
<i>SlATM-like</i>	V-NDNDICNNADFSAVSSAEMLQGLHQTARDCFPIQSTRSIPRDFYLSFRAFRRDPEVQ	673
<i>CaATM-like</i>	MDEDKEATLGCQETFESHNILASGGYDLQVEGQPPPSVLPKKRGRKKSEDIKAT----- +DE KEATLGC TF+S N LASGGYDLQVEGQPPP+VLPKKRG KKS+ I AT	750
<i>SlATM-like</i>	IDEYKEATLGCPTVFQSDNSLASGGYDLQVEGQPPPNVLPKKRGGKKS DGINATGPKFSS	733
<i>CaATM-like</i>	-----ADGTGMNGPALVGSVETGPDTLKKGIVHRKRKKAATAPVTHNEIGVLGGLPD ADGT MNG L+ SV+TGPDTLKKG+VHR+RKKAA A V HNEIG+LGGLPD	802
<i>SlATM-like</i>	KTNLPRMTADGTSMNGLSDVQVQTPDTLKKGVVHRQRKKAIAAVVHNEIGILGGLPD	793
<i>CaATM-like</i>	LNGNNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRGKKKEELVSENVDPVSKSTTQFIPLLKSVE LNGNNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRR +KKEELVSEN+PD+SK TQFIP+LKSVE	862
<i>SlATM-like</i>	LNGNNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRRRRKEELVSENLPDLSKGNTQFIPMLKSVE	853
<i>CaATM-like</i>	VTGSFPFEGSPQPDNMWGLQGASSLPNAALLTGPNAYEIHAAGSSLLNNSQNEGLVLSA VTGS P EG QPDNM G+QGASSLPNA L GQNA IHAAGSSL N SQ GLV SA	922
<i>SlATM-like</i>	VTGSLPLEGGPQPDNMLGVQGASSLPNAELFAGQPNANGIHAAGSSLPNISQITGLVSSA	913
<i>CaATM-like</i>	KAEGKKRKRKEKASNIQNNSSALPDLNGQVMDPNLKGKEFAELSSVTGQDKPKRKRRRAN K EGKKRKRKEKA IQN SSALPDLNGQV DPNLKGKE E+SSV+GQ KPK+KRRRA	982
<i>SlATM-like</i>	KGEGKKRKRKEKALIIQNTSSALPDLNGQVTDPNLKGKEVTEMSSVSGQAKPKQKRRRAT	973
<i>CaATM-like</i>	KSAAIGIPNANGDHNTLLLNFALG-PVPSKEYIAAASFSGFPLEESKTQYLNLDSTAQVVF KSAAIGIPN NGDHNTLLL F G PVPSKEYI A+F+ FGPLEESKT YLNLDSTAQVVF	1041
<i>SlATM-like</i>	KSAAIGIPNPNGDHNTLLLYFTPGSPVPSKEYICATFASFGPLEESKTLYLNLDSTAQVVF	1033
<i>CaATM-like</i>	VKAGDAMEALQSLQSRNPFGPSLSVSYRLRQVSTSNMQTSHSFLPADALQPGAVPSNGEE K DAMEALQSLQSRNPFGPSLSVSYRLR VSTS PA AL GAVPSNGE	1101
<i>SlATM-like</i>	AKDSDAMEALQSLQSRNPFGPSLSVSYRLRHVSTSQ-----PA-ALLSGAVPSNGEG	1083
<i>CaATM-like</i>	PNLVVIKQNL EAMTTMLEKAGDNISPEMRACLESEVKGFLLKVVSTMVGPSSS 1153 P+LVVIKQNL E+MTTMLEKAGDNISPE++AKLESEVKGFLLKVVSTMVGPSSS	
<i>SlATM-like</i>	PDLVVIKQNL ESMTTMLEKAGDNISPEIKAKLESEVKGFLEKVVSTMVGPSSS 1135	

**Ca, *C. annum* (CA06g19680); Sl, *S. lycopersicum* (Solyc06g071490, XP\_004241490.1)**

<i>CaATM-like</i>	METQDISETLVEGSVDYKPAVSQIPDGKTL EEGSVLFGLS--GSLVGSNVVTKVPSSECY METQ ISETLVEGSVDYKP +SQ PDGKTL E+ SV+ LS G + VT+VPS	58
<i>StATM-like</i>	METQK ISETLVEGSVDYKPVLSQTPDGKTL EKVSVVSSLSSES GPFVSELVTVTEVPS----	56
<i>CaATM-like</i>	GDGGVSANVQKSKANEANGDDGTELVGVGFEPKLVDECDNIDLE----- G +ANV K+ AN +G + EL+GVGFE KLVD DNID E	102
<i>StATM-like</i>	--GVGNANVHKNIANVVDGTE--LELMGVGFEPKLVLDGYDNIDSEVKSEERVVDGYDNFDS	113
<i>CaATM-like</i>	-GVTGEEEEKANVDDNNDLEGVDTEQKLMGQGAVESENKLANIDGYNDLEVVEIENKFG GV +E+ ANVD NN LEGVDTEQKL+DGQG VESENKLAN+D DYNDLE VEIENKFG	161
<i>StATM-like</i>	EGVKSDEKLANVDYNNLEGVDTEQKLVLDGQGTVESENKLANVD--DYNDLEGEVEIENKFG	172
<i>CaATM-like</i>	DVDDGIDLEALGLGNEAVSFENLMEGGTLKHETQALGSII PETNKINDGDVLA AEFGGEI DVDD IDLEALGL NE VS + LMEGGTLKHETQ E G E	221
<i>StATM-like</i>	DVDDTIDLEALGLENEDVSLDGLMEGGTLKHETQ-----ESGAEF	212
<i>CaATM-like</i>	NESQNNGVEKIGMAEVVEAIDMTV----DPPRKEVSGDGITLTVDFGPLDGLDDSDP NES +NGVEKIG+A+ VE ID + D P K+EVSGDGI+LTVDFGFP	277
<i>StATM-like</i>	NESLDNGVEKIGVADAVEDIDTSKVHVNDSPTKIEVSGDGISLTVDFGFP-----	262
<i>CaATM-like</i>	DWMPMKNYSSMGANGIKAEGVDGDNQEHNFVGDVWVKIKADLWWPGMICDPHQSKDA D M+ + MG NG +AEG+V DNQEHNF VGDVWVK+K DLWWPGMICDPH +KD	337
<i>StATM-like</i>	DSTFYMETDNPMGVNGNEAEGNVSDNQEHNFAVGDVWVKMKTDLWWPGMICDPHTTKDD	322
<i>CaATM-like</i>	GKRDQRRGFVVKHFGNTNSVWCQPFQKPFIEYFELMSCLNKSGSFCGAIEKALGEFGR GK + + GFFVKHFGNT+SVWC+PFQKPFIEYFELMS NKS SF AIEKALGEFGR	397
<i>StATM-like</i>	GKCNHKDGFVVKHFGNTSSVWCRPFQKPFIEYFELMSRQNKSRSFYAAIEKALGEFGR	382

<i>CaATM-like</i>	VKQKMTCSFCFSKEHQVAAQNFPKEDGSGGSVFLPSQFEPSEFLNFIRLRALGVRSPGRI	457
<i>StATM-like</i>	VKQ+MTCSCFCFSKE+QVAAQNFPKED +GGSVF SQFEPS L FI+ RALG+RSPG + VKQEMTCSFCFSKENQVAAQNFPKEDENGGSVFSASQFEPSNLLLEFIKSRALGLRSPGNV	442
<i>CaATM-like</i>	EFTVTEESCLVAFYSSIGHKQLPLYKLRPTNNVKDSAVNDLISGSKDEDLDKLSGDGVSVLK	517
<i>StATM-like</i>	EFTV E+CL AFY+SIGHKQLPLYKLRPTNN LIS SKDEDLDKLS SVLK EFTVAENCLSAFYTSIGHKQLPLYKLRPTNN-----LISVSKDEDLDKLSGSDSVLK	494
<i>CaATM-like</i>	SCRSGFDDCRMTEVVPSGLFESPRGMGSMISRSQIANEDAGGKSEKGFESRERKSKYLS	577
<i>StATM-like</i>	SCRSG DD +MTE+ SG ESPRGM SMISRSQIANE AGGKSEKGFESRERKSKYLS SCRSGSDDIKMTEMELSGSLESFPRGMRSMSISRSQIANEHAGGKSEKGFESRERKSKYLS	554
<i>CaATM-like</i>	YPYVNSWG-RKNSLGQGEDETEDEFEEDSLGGVGRSSSPSMVSTPIGNSINKNPLRKRKRS	636
<i>StATM-like</i>	YPYVNSW RKNSLGQGEDETEDE EE + GGVK SS+PSMVSTPIGNS NK LRK RKS YPYVNSWASRKNSLGQGEDETEDECEEVTPGGVKSNNPSMVSTPIGNSNKTSLRKRKRS	614
<i>CaATM-like</i>	VIGNNGICNNADFAAVSSAEMLQELHLTAIDCFPIQSTCSILMQDFFLSFRSYRDPQVQ	696
<i>StATM-like</i>	V +N ICNNADF A S+AEMLQELH TA+DCFFPIQSTCS+ ++DF+LSFR++R P+VQ V-SDNDICNNADFGAASAAEMLQELHQTALDCFFPIQSTCSVPIRDFYLSFRAFRRGPEVQ	673
<i>CaATM-like</i>	MDEDKEATLGCQETFESHNILASGGYDLQVEGQPPPSVLPKKRGRKKSEDIKA-----	749
<i>StATM-like</i>	MDE KEATLGCQETF+S NILASGGYDLQVEGQPPP+VLPKKRGRKKS+ I A MDEYKEATLGCQETFQSDNILASGGYDLQVEGQPPPNVLPKKRGRKKS+DGINATGPKFSS	733
<i>CaATM-like</i>	-----TADGTGMNGPALVGSVETGPDTLKKGIVHRKRKKAATAPVTHNEIGVLGGLPD	802
<i>StATM-like</i>	TADGT MNG L SV+TGPD T KKG+VHR+RKKAA A V HNEIGVLGGLPD KTNLPRMTADGTSMNGLSPLNDSVQTPD T FKKGVVHRQRKKAATAAVVHNEIGVLGGLPD	793
<i>CaATM-like</i>	LNGNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRGKKEELVSENVDPVSKSTTQFIPLLKSVE	862
<i>StATM-like</i>	LN NNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRR +KKEEL SEN+PDVSK TQFIP+LKSVE LNVNAGLSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRRRKKEELGSENLPDVSKGNTQFIPMLKSVE	853
<i>CaATM-like</i>	VTGSFPFEGSPQPDNMWGLQGASSLPNAALLTGQPNAYEIIHAAGSSLLNNSQNEGLVLSA	922
<i>StATM-like</i>	VTGS P EG PQPDNM+G+QGASSLPNA LL A EIIHAAGSSL N SQ GLV SA VTGSLPLEGGPQPDNMFVQGASSLPNAELL-----ANEIHAAGSSLPNISQITGLVSSA	908
<i>CaATM-like</i>	KAEGKRRKRKEKASNIQNNSSALPDLNGQVMDPNLKGKEFAELSSVTGQDKPKRKRRRAN	982
<i>StATM-like</i>	KAEGKRRKRKEKA NIQNNSSALPDLNGQV DPNLKGKE E+S V+GQ KPK+KRRRA KAEGKRRKRKEKALNIQNNSSALPDLNGQVTDPNLKGKEVTEMSCVSGQAKPKQKRRRAT	968
<i>CaATM-like</i>	KSAAIGIPNANGDHNTLLLNFALG-PVPSKEYIAASFSGFPLEESKTQYLNLDSTAQVVF	1041
<i>StATM-like</i>	KSAAIGIPN NGDHNTLLL F G PVPSKEYI A+F+ FGPLEESKT YLNLDSTAQVVF KSAAIGIPNPNGDHNTLLLYFTPGSPVPSKEYITATFASFSGFPLEESKTYLNLDSTAQVVF	1028
<i>CaATM-like</i>	VKAGDAMEALQSLQSRNPFGPSLVSYRLRQVSTSNMQTSHSFLPADALQ-----PGAVP	1096
<i>StATM-like</i>	K DAMEALQSLQSRNPFGPSLVSYRLR VSTSNQ TSH LPADALQ GAVP EKESDAMEALQSLQSRNPFGPSLVSYRLRHVSTSNNTQTSHPSPADALQSPAVLSGAVP	1088
<i>CaATM-like</i>	SNGEENLVVIKQNLAMTMMLEKAGDNISPEMRAKLESEVKGFLLKVVSTMVGPSSS	1153
<i>StATM-like</i>	SNGE P+LVVIKQNL+MTTMMLEKAGDNISPEM+AKLESEVKGFLL+KVS MVG SSS SNGEGPDLVVIKQNL+ESMTTMMLEKAGDNISPEMKAKLESEVKGFLEKVSNMVGSSSS	1145

**Ca, *C. annuum* (CA06g19680); St, *S. tuberosum* (XP\_006347453.1)**

<i>CaATM-like</i>	METQDISETLVEGSVDYKPAVSQIPDGKTLEEGSVLFGLSGSLVGSNVVTKVPSSECYGD	60
<i>NtATM-like</i>	METQ+ISETL EGSV+ KP ++ DGKTL EE S L LS S GS +VT + SECY G METQNISETLEEGSVECKPFQENLDGKTL EEVSALSRLSESCAGSELVTNISLSECY G-	59
<i>CaATM-like</i>	GGVSANVQKSKANEANGDDGTELGVGFEPKLVDECDNIDLEGVTGEEKANVDDNDNLE	120
<i>NtATM-like</i>	G S +V K AN G D EL GV FE K+VD D + LEGV E++ A VDDNDNLE -GESVDVLKLAN---GGDNVELEGVEFEQKVVVDGRDKVCLEGVQSEKKLATVDDNDNLE	115
<i>CaATM-like</i>	GVDTEQK-----LMDGQGA VESENKLANIDGDYNDLEVVEIENKFGDVD	164
<i>NtATM-like</i>	GVD+E+K L+DGQG ESE KLAN+D +YNDLE V++EN GDVD GVDSEKFAVDENNAGVDYEEKLVVDGQGA ESEKLANVD-NYNDLEGVLDENNLDVD	174



<i>CaATM-like</i>	DGIDLEALGLGNEAVSFENLMEGGTLKHETQALGSIIPETNKINDGDVLAEEFGGEINES D IDLEALGL NE V+FENLMEG TL+HETQALGSIIPETNK DGDVL AEF NES	224
<i>NtATM-like</i>	DAIDLEALGLENEGVAFENLMEGETLEHETQALGSIIPETNKTKDGDVLGAEF----NES	230
<i>CaATM-like</i>	QNGVEKIGMAEVVEAID--MTVDPPrKVEVSGDGITLTVDVFGPLDG-----ML NG E++ M + E I PR+++ SGDGI+LTVDFVFGPLDG +L	272
<i>NtATM-like</i>	LLNGGEEVDMIDAAETISNVHANGSPREIQFSGDGISLTVDFVFGPLDGFYPVHNLDGQVL	290
<i>CaATM-like</i>	DDSDPDWMPMKNYSSMGANGIKAEGDVGDNQEHNFVGDVWVKIKADLWWPGMICDPH DS D M SMKN S M NG +AE D DNQEHNF VGDVWVK+K DLWWPGMICD	332
<i>NtATM-like</i>	GDSGSDSMLSMKNDS PMAVNGNEAEVDASDNQEHNFVGDVWVKLKTDLWWPGMICDLS	350
<i>CaATM-like</i>	QSKDAGKRDQRRGFFVKHFGNTNSVWCQPFQKLPFIEYFELMSCLNKS GSGFCGAIEKALG SKDAGK D R FFVK+FGNTNS CQPFQKLPF++YFE MS NKS SF GAIEKALG	392
<i>NtATM-like</i>	TSKDAGKCDHRGCFVVKYFGNTNSGLCQPFQKLPFLDYFEHMSRQNKRSFYGAIEKALG	410
<i>CaATM-like</i>	EFGRLVKQKMTCSFCFSKEHQVAAQNFPKEDGSGGSVFLPSQFEPSEFLNFIRLRALGVR E GR VKQKMTCSFCFSKE+QVAAQN SKE SVF SQFEP+ LNFIRLRAL +	452
<i>NtATM-like</i>	EIGRRVKQKMTCSFCFSKENQVAAQNL-SKEK---HSVFSASQFEPANLLNFIRLRALDLC	466
<i>CaATM-like</i>	SPGRIEFTVTESECLVAFYSSIGHKQLPLYKLRPTNNVKDSAVNDLISGSKDEDLDKLSGD SPG IEFTV ES L AF S+GHKQLP+YKLRPTNN KD + L G	512
<i>NtATM-like</i>	SPGSIEFTVNESYLSAFNCMGGHKQLPVYKLRPTNNAKDISNGQLCCGD-----	515
<i>CaATM-like</i>	GSVLKSCRSGFDDCRMTEVVPVPSGLFESPRGMGSMISRSQIANEDAGGKSEKGFESRERKK SVLKSC+S DD + TEV SG ESPRGMGSMIS S+ AN AGGKSEKGFESRERKK	572
<i>NtATM-like</i>	-SVLKSCS SDDRKTTEVEISGSLES PRGMGSMISCSSETANGSAGGKSEKGFESRERKK	574
<i>CaATM-like</i>	SKYLSYPYVNSWGRKNSLQGEDETEDFEEDSLGGVKRSSSPSMVSTPIGNSINKNPLRK SKYLSYPYVNSW RKNLQGEDETED E SLGGVK SS PSMV+TPIG N LRK	632
<i>NtATM-like</i>	SKYLSYPYVNSWRKNSLQGEDETEDHEGVS LGGVKSSSIPSMVATPIGK--SNLKRK	632
<i>CaATM-like</i>	VRKSVIGNNGIC-NNADFAAVSSAEMQLQELHLTAIDCFPIQSTCSILMQDFFLSFRSYR RKS V NGIC NN FAA SSAE+LQEL LTA+DCF P QST SI +++F+LSFR +R	691
<i>NtATM-like</i>	PRKSV-NVNGICHNNVGFAAASSAEVLQELRLTALDCFSPSQSTSSIIPIKEFYLSFRIFR	691
<i>CaATM-like</i>	DP--QVQMEDKEATLGCQETFESHNILASGGYDLQVEGQPPPSVLPKRRGRKKSEDIKA +P +VQMED EATLGCQETF+S L + D QV+G P S P KRRGRKK EDI A	749
<i>NtATM-like</i>	NPELEVQMEDINEATLGCQETFKSP--LGTNISDNQVKGHLPSAFAFPKRRGRKKIEDINA	749
<i>CaATM-like</i>	TADGTGMNGPALVGSVETGPDTLKKGIVHRKRKKAATAPVTHNEIGVLGGLPDLNGNNA T +L+GSVETG D+L+KGIV RK+KK ATA V H+EIGVLGGLPDLNGNNA	809
<i>NtATM-like</i>	T-----SLIGSVETGTDLSLEKGI VGRKKKTATAAVVHHEIGVLGGLPDLNGNNA	800
<i>CaATM-like</i>	LSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRGKKKEELVSE 842 LSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRR +KKEELVSE	
<i>NtATM-like</i>	LSVENMQVIGPAPTQGKLEPKRRKRKKEELVSE 833	

*Ca*, *C. annuum* (CA06g19680); *N.t.*, *N. tabacum* (XP\_016494093.1)

## 6.7 AS-Sequenzen zum Split-TALE-System

### AS-Sequenz von AvrBs3-Derivat mit 13,5 rep aus *Xcv*

MDPIRSRTPSPARELLPGPQPDGVQPTADRGVSPAGGPLDGLPARRTMSRTRLPSPPAPSPAFSA  
 GSFSDLLRQFDPSTLFDLPPFGAHTTEAATGEWDEVQSGLRADAPPPTMRVAVTAARPPR  
 AKPAPRRRAAQPSDASPAQVDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQ  
 HPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDGTGQLLKIA  
 KRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA  
 IASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQV  
 VAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE  
 QVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT  
 PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG  
 LTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQA  
 HGLTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLC  
 QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALEIVAQLSRPDPALAALNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPH  
 APALIKRTNRRIPERTSHRVADHAQVVRVLGFFQCHSHPAQAFDDAMTQFGMSRHGLLQLFRRVGV  
 TELEARSGLTLPASQRWDRIHQASGMKRAKPSPTSTQTPDQASLHAFADSLERDLDAVSPMHEGDQ  
 TRASSRKRSDRAVTPGSAQQSFEVVRVPEQRDALHLPLSWRVKRPRTSIGGGLPDPGTPTAADLA  
 ASSTVMREQDEDPFAGAADDFPAFNEEELAWLMELLPQ

### AS-Sequenz von *AtEDS1* aus *A. thaliana*

MAFEALTGINGDLITRSWSASKQAYLTERYHKEEAGAVVIFAFQPSFSEKDFDPDNKSSSFGGEIKL  
 NRVQFPCMRKIGKGDVATVNEAFLKNLEAVIDPRTSFQASVEMAVRSRKQIVFTGHSSGGATAILA  
 TVWYLEKYFIRNPNVYLEPRCVTFGAPLVGDSIFSHALGREKWSRFFVNFVTRFDIVPRITLARKA  
 SVEETLPHVLAQLDPRNSSVQSEQRITFEYTSVMRDTSTVANQAVCELTGSAEAILETLSFLEL  
 SPYRPAGTFVVFSTEKRLVAVNNSDAIQLMLFYTCQASDEQEWSLIPFRSIRDHHSYEELVQSMGMK  
 LFNHLDGENSIESSLNDLGVSTRGRQYVQAALEEEKRVENQKKIQVIQOQERFLKKLAWIEDEYK  
 PKCQAHKNGYYDSFKVSNEENDFKANVKRAELAGVFDEVLGLLKKCQLPDEFEGDIDWIKLATRYR  
 RLVEPLDIANYHRHLKNEDTGPYMKRGRPTRYIYAQRGYEHHLKPNGMIAEDVFNKVNGLNLGL  
 QLEEIQETLKNSECGSCFWAEVEELKGPYEEVEVRVKTLEGMLEWITAGEVDEKEIFLEGST  
 FRKWWITLPHKSHSPLRDYMMDEITDT

### AS-Sequenz von *AtPAD4* aus *A. thaliana*

MDDCRFETSELQASVMISTPLFTDSWSSCNTANCNGSIKIHDIAGITVVAIPAVSMIQLGNLVGLP  
 VTGDVLFPLGSSDEPLPMVDAAILKFLQLKIKEGLELELLGKKLVITGHSTGGALAAFTALWLL  
 SQSSPPSFRVFCITFGSPLLGNQSLSTSISRSRLAHNFCHVVS IHDLVPRSSNEQFWPFGTYLFCS  
 DKGGVCLDNAGSVRLMFNILNTTATQNTTEHQRYGHYVFTLSHMFLKRSRFLGGSIPDNSYQAGVA  
 LAVEALGFSNDDTSGVLVKECIETATRIVRAPILRSAELANELASVLPARLEIQWYKDRCDASEEQ  
 LGYYDFFKRYSLKRDFKVNMSRIKRAKFWDTVIKMETNELPFDHFLGKKWIYASQFYQLLAEPD  
 IANFYKNRDIKTGGHYLEGNRPKRYEVIDKWQKGVKVPPEECVRSRYASTTQDTCFWAKLEQAKEWL  
 DEARKESSDPQRSLREKIVPFESYANTLVTKKEVSLDVKAKNSSYSVWEANLKEFKCKMGYENE  
 IEMVDES DAMET

**AS-Sequenz von StJoka2 aus *S. tuberosum***

MAMESSIVIKVKEYEETLRRFNACVINEKLDLDIGGLRDKIIQLFNFAHDAELTLTYIDEDGDVVTL  
VDDEDLQDVMRQDLNPLRISARLNAGERSGRASARSSGNSTPLRSRPRVQPPFLNLSRVSDVLKYI  
PEPLRESVMKVCSDMTASASSSAPILAELVDAMSEMGLSYYQNQASGSQPVKEAGSCSGISKGNTM  
SADGGMPNVKIGESSPKKNGPLTALHGEPKPKASNEAVDASVKLVSKSETLEGDRTEALSSSFKGS  
KAQTLLVNSLEKDKKFDVRSLDGRTIGYTYVRNLPPIPEKTSDEQPSKGHPVAKPVDLGGSSASSK  
VKQCNWDSPSADSSGSSINMPYDGFTPSHLVHLNLTNVNDSHNAGSSGSSMKMPYDGFRPAVRHLS  
PLIPVNACLFSGVPTVNNPIPPQNFSEFVPLKRSHNHS DGTGTIFHKGVRC DGCGVHPITGPRFIS  
KVKENYDLCSICFAEMGNDADYIRMDRPLTYPNPWSFKGLHDLHGRLRPRPPTVPQIIRGFGLKAG  
RPKLDSRFIQDVNVLDGTIMAPLTQFTKIWRMKNNGNLVWPQGTQLVWIGGDKLSDRFSVELEIST  
AGLAVDQELDVAVDFTAPEHPGRYISYWRLASASGQKFGQRVWVLIQVDALLCLPKKGLVHEAFQG  
LNLNLPPAGSGVSGPDIINVNSEPQNVLPEPKSSSTMELVDSVAEVNQNKEQEAKFPINDSLLVGF  
GDKSSSPSASGSPISYPVIDLAEKPSADSSMQPSAAVAMQTPLQDARGNFEVEMSLLOELEEMGFK  
QVDLNKEILRKNEYDLEQSVDDL CGVAEWDPILEELKEMGFCDKEMNKLLKKNNGSIKRVMMDLI  
AGEQ

**AS-Sequenz von StATG8CL aus *S. tuberosum***

MAKSSFKLEHPLERRQAEAAARIREKYPDRIPVIVEKAERSDIPDIDKKKYLVPADLTVGQFVYVVR  
KRIKLSAEKAI FIFVKNILPPTAAMMSAIYEEHKDEDGFLYMTYSGENTFGSF

**AS-Sequenz von HsLaminC aus *Homo sapiens***

MSEEVVSREVSGIKAAYEAELGDARKTLDSVAKERARLQLELSKVREEFKELKARNTKKEGDLIAA  
QARLKDLEALLNSKEAALSTALSEKRTLEGELHDLRGQVAKLEAALGEAKKQLQDEMLRRVDAENR  
LQTMKEELDFQKNIYSEELRETKRRHETRLVEID

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name Tina Hoppe  
Geburtsdatum 6. Januar 1988  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Ausbildung und Akademische Qualifikation

- seit 11/2013 MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG  
Promotion an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I;  
Institut für Biologie/Pflanzengenetik
- Thema der Dissertation:  
Identifizierung pflanzlicher Interaktoren des Typ III-Effektors XopG aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
- seit 10/2011-10/2013 MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG  
Master-Studiengang Biologie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I; Institut für Biologie/Mikrobiologie
- Thema der Masterarbeit:  
Untersuchungen zur Regulation der *cydABX* Expression durch den Regulator FLP aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
  - Abschluss: Master of Science (Biologie)
- 10/2007 – 05/2011 MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG  
Bachelor-Studiengang Biologie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I; Institut für Biologie/Mikrobiologie
- Thema der Bachelorarbeit:  
Regulation des *cydA* Gens durch das FNR-ähnliche Protein FLP aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
  - Abschluss: Bachelor of Science (Biologie)
- 09/2000 – 07/2007 KURFÜRST-JOACHIM-FRIEDRICH-GYMNASIUM WOLMIRSTEDT
- Abschluss: Abitur
- 09/1994 – 08/2000 GRUND- UND SEKUNDARSCHULE GOTTFRIED-WILHELM-LEIBNIZ

Halle (Saale), den 07.01.2019

## Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Bereitstellung dieses interessanten sowie anspruchsvollen Forschungsthemas bedanken und für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Weiterhin danke ich Ihr für die Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Problemen, die stetige Diskussionsbereitschaft, das ständige Interesse am Voranschreiten meiner Arbeit sowie für ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Ein großer Dank gilt Heike Prochaska für die Begleitung und Betreuung in den Anfängen dieser Arbeit. Ich möchte Ihr besonders für ihre Unterstützung, Tipps und der Vermittlung ihres Wissens danken.

Für eine schöne Zeit mit angenehmer Arbeitsatmosphäre, gegenseitigem Gedankenaustausch, konstruktiver Kritik sowie wertvollen Tipps, Tricks und Späßen bei der Arbeit danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, speziell den Kollegen des Labors 212. Besonderer Dank gilt dabei Franki (alias schöner Mann), Tom, Moni, Magnus, Chanti, Micha, Johannes und Jana.

Für die Geduld bei der Anzucht vieler Superpflanzen, exzellente technische Unterstützung und viele unterhaltsame Gespräche danke ich Bianka, Marina, Mandy und Karola.

Ein großer Dank gilt auch den hilfsbereiten Korrekturlesern (Sabine, Oli, Hendrik und Sara) meiner Arbeit, die stets nützliche Ratschläge und Kommentare hatten.

Eine Doktorarbeit ist wie ein langer, steiniger Weg mit einigen Höhen und sehr vielen Tiefen. Um das Ziel zu erreichen, braucht es nicht nur Durchhaltevermögen, sondern auch Unterstützung. Daher gilt mein aufrichtiger Dank den lieben Menschen, die an mich geglaubt haben, mich immer wieder aufgemuntert haben und für Ablenkung sorgten, wenn mal wieder eine lange und sehr frustrierende Talfahrt anstand. Ohne Euch (Sara, Hendrik, Franki, Tom, Torte, Loichti, Janine (Mutti) und besonders Jens) hätte ich das nicht geschafft. Danke, dass es euch gibt und ich immer auf euch zählen kann!

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meiner Familie für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass 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 wurden.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den 07.01.2019

Tina Hoppe