

Molekulare Charakterisierung neuer Typ III Effektorproteine
sowie des Effektors XopB aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

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

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Antje Schonsky

geb. am: 01.02.1979 in: Leipzig

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Dierk Scheel
3. Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Halle (Saale), 31.01.2013

Zusammenfassung

Das Gram-negative pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) Stamm 85-10 ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit in Paprika. In dieser Arbeit wurden drei neue Typ III Effektorproteine (T3E) XopR, XopS und XopK in *Xcv* verifiziert, indem unter Verwendung der AvrBs3-Effektordomäne (AvrBs3 Δ 2) als Reporter ihre Typ-III-abhängige Sekretion und Translokation in die Pflanzenzelle nachgewiesen wurde. Die Zahl der bekannten Effektoren aus *Xcv* Stamm 85-10 erhöht sich damit auf 26.

Eine wichtige Herausforderung der derzeitigen Forschung ist die Untersuchung der molekularen Funktion von Typ III Effektorproteinen. Die vorliegende Arbeit gibt erste Einblicke in die Funktion der Effektoren XopH, XopG und XopB. Außerdem wurde der XopI, ein Effektor mit einem F-Box Motiv, untersucht. XopH wirkt wahrscheinlich im Zytoplasma der Pflanzenzelle und führt dort in Abhängigkeit seiner Tyrosinphosphataseaktivität zur Unterdrückung eines langsameren Abwehrprozesses der Pflanze. XopG, eine putative Zink-Metallo-Protease mit Homologie zu Botulinumtoxin, wirkt wahrscheinlich im pflanzlichen Nukleus oder Nukleolus. *Xcv* 85-10 scheint durch XopG einen leichten Wachstumsnachteil - eine geringere Virulenz - zu haben. Außerdem wird XopG in Paprika ECW und in *Nicotiana tabacum* erkannt und löst dort eine HR aus. Diese Erkennung scheint von einem pflanzlichen Protein mit einer SPRY-Domäne abhängig zu sein. Sie ist außerdem abhängig von der Lokalisierung von XopG im pflanzlichen Zellkern und einer funktionalen Zinkbindedomäne. Des Weiteren wurde ein pflanzliches Protein mit einem RNA-Bindemotiv (RRM, *RNA recognition motif*) isoliert, dessen Bindung an XopG in der Pflanze bestätigt werden konnte. Die XopG-HR wird in Paprika nach transienter Expression mittels *Agrobacterium* durch den Effektor XopB unterdrückt, wobei unter natürlichen Bedingungen anscheinend mehrere Faktoren an der Unterdrückung beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass XopB, als ein genereller Zelltodsuppressor, eine Reihe verschiedener Zelltodreaktionen unterdrückt, wobei XopB den durch eine Infektion hervorgerufenen Anstieg der Gehalte der Phytohormone Jasmonsäure und ACC verhindert. Der Wirkort von XopB ist das ER und/oder der Golgi-Apparat, so dass eine Funktion bei der Sekretion von pflanzlichen Proteinen vermutet werden kann. Es wurden in Y2H-Sichtungen verschiedene interagierende Proteine isoliert, deren Einfluss auf die Funktion von XopB teilweise bereits in Gen-Silencing-Experimenten adressiert wurde.

Summary

The Gram-negative plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 is the causal agent of bacterial spot disease in pepper. In this work the three new type III effector proteins XopK, XopR and XopS were verified by using the AvrBs3 effector domain (AvrBs3 Δ 2) as a reporter, to show their type III dependent secretion and translocation into the plant cell. Thereby the number of known effectors in *Xcv* strain 85-10 is increased to 26. An important challenge of science today is the investigation of the effector protein's molecular function. The present work provides first insights into the function of the effectors XopH, XopG and XopB. Furthermore XopI an effector with an F-box motif was investigated. XopH presumably acts in the cytoplasm of plant cells and there it leads - depending of its tyrosine phosphatase activity - to the suppression of a slower defence mechanism in the plant. XopG, a putative zinc metallo protease with homology to botulinum toxin, probably acts in the plant nucleus or nucleolus. *Xcv* 85-10 seems to have a slightly slower growth and thus reduced virulence due to the presence of XopG. Furthermore XopG is recognized in pepper ECW and in *Nicotiana tabacum* and triggers an HR. This recognition seems to be dependent of a plant protein with a SPRY domain. It also seems to depend on the localisation of XopG to the plant nucleus and a functional zinc binding domain. Additionally a plant protein with an RNA binding motif (RRM, *RNA recognition motif*) was isolated and the binding to XopG could be verified *in planta*. The XopG-HR in pepper is suppressed by the effector XopB after *Agrobacterium* mediated transient expression of both effectors. But apparently, under natural conditions there have to be additional factors involved to suppress XopG-HR. In this work it is shown that XopB suppresses a range of different cell death reactions in different plant species whereby increased levels of the phytohormones jasmonic acid and ACC were drastically reduced by XopB. The target location of XopB is the ER and/or the Golgi apparatus, thus there can be assumed a function in the secretion of plant proteins. In yeast-two-hybrid screenings different XopB-interacting proteins were isolated; its influence on XopB function was partially addressed in *in planta* gene silencing experiments, too.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Gram-negative Phytopathogene	1
1.2 Die basale pflanzliche Abwehr	2
1.3 Virulenzfaktoren gram-negativer Phytopathogene	5
1.4 Das Typ III-Sekretionssystem	7
1.4.1 Der Aufbau des T3SS	8
1.4.2 Regulation des T3SS	8
1.4.3 Substrate des T3SS	9
1.5 Typ III-Effektorproteine	10
1.5.1 Unterdrückung der Abwehr durch Effektorproteine	12
1.5.2 Induktion der spezifischen pflanzlichen Abwehr durch T3Es (ETI)	14
1.5.3 Unterdrückung der ETI durch Effektorproteine	16
1.6 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatora</i>	17
1.7 Vorarbeiten und Ziele der Arbeit	19
2 Material und Methoden	23
2.1 Bakterien, Medien und Antibiotika	23
2.2 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen	25
2.3 Inokulation von Pflanzen mit Bakterienstämmen	25
2.4 Gen-Silencing von Beuteproteinen in Paprika und <i>N. benthamiana</i>	32
2.5 Erzeugen von Effektor-Deletionsmutanten	33
2.6 Erstellen von AvrBs3 Δ 2 Fusionsproteinen	34
2.7 Generierung von Expressions- und Fluoreszenz-Fusionskonstrukten für die Expression und Lokalisierung von Proteinen <i>in planta</i>	34
2.8 Die Erzeugung von Punktmutationen in XopG und XopH	35
2.9 Isolierung von RNA aus Tomate und <i>N. benthamiana</i>	35
2.10 cDNA-Synthese und RT-PCR	35
2.11 RACE (rapid amplification of cDNA ends)	36

2.12	Sekretionsexperimente und Proteinanalysen	36
2.13	Fluoreszenzmikroskopie	37
2.14	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation.....	37
2.15	Koimmunopräzipitation	37
2.16	Messung des Phytohormongehaltes in Blättern	38
2.17	Hefe-2-Hybrid-Sichtungen	39
2.17.1	Die c-DNA-Bibliothek	40
2.17.2	Die Sichtung der c-DNA-Bibliothek.....	40
2.17.3	Plasmidisolierung aus Hefe	41
2.18	Bioinformatische Annäherungen	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung des Typ III-Effektors XopI.....	43
3.1.1	Einfluss einer Deletion bzw. Überexpression von xopI auf Virulenz der Mutante 43	
3.1.2	Mögliche Ziele von XopI in der Pflanze	44
3.1.2.1	Subzelluläre Lokalisierung von XopI in der Pflanzenzelle	44
3.1.2.2	An welche Proteine bindet XopI in der Pflanzenzelle?	45
3.2	Charakterisierung des Typ III-Effektors XopH	47
3.2.1	Deletion von xopH hat Effekt auf AvrBs1-HR.....	47
3.2.2	XopH unterdrückt die durch den Typ III-Effektor XopJ ausgelöste HR	49
3.2.3	Cystein267 im aktiven Zentrum von XopH ist essentiell für Unterdrückung der XopJ-HR.....	49
3.2.4	XopH ist in der Pflanzenzelle im Zellkern und Zytoplasma nachweisbar	50
3.2.5	Kernlokalisierung ist nicht notwendig für Funktion von XopH	50
3.2.6	Identifizierung möglicher pflanzlicher Zielproteine von XopH	52
3.2.7	Subzelluläre Lokalisierung von WRKY, LeArcA1 und UMPK.....	53
3.3	Charakterisierung des Typ III-Effektors XopG	55
3.3.1	XopG hemmt das Wachstum von Xcv	55
3.3.2	XopG verursacht Zelltod in Paprika ECW.....	56
3.3.3	Der XopG vermittelte Zelltod wird polygenisch verursacht	57
3.3.4	XopG lokalisiert im pflanzlichen Zellkern und Nukleolus	58
3.3.5	Zinkbindemotiv ist essentiell für die Auslösung einer HR, beeinflusst aber nicht die Lokalisierung von XopG	58
3.3.6	Kernlokalisierung ist notwendig für die Funktion von XopG.....	60
3.3.7	Wird die XopG-HR in Xcv von einem anderen Effektor unterdrückt?	60

3.3.8	Keine direkte Interaktion zwischen XopG und XopB	62
3.3.9	Deletion des Zelltods Suppressors XopB führt zu keiner Veränderung des Phänotyps von Xcv 85-10 auf Paprika ECW	63
3.3.10	Das Signal für die Kernlokalisierung von XopG liegt in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Für die Lokalisierung im Nukleolus ist zusätzlich der N-Terminus wichtig.....	64
3.3.11	Identifizierung pflanzlicher Zielproteine von XopG mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung.....	67
3.3.12	SPRY und RRM sind in pflanzlichen Zellkern lokalisiert.....	68
3.3.13	SPRY und RRM interagieren mit XopG in der Pflanze.....	69
3.3.14	Virus-induziertes Gen-Silencing der Interaktoren SPRY und RRM	71
3.3.15	Suche nach Interaktoren der putativ inaktiven Mutante von XopG.....	74
3.4	Der Typ III-Effektor XopB.....	75
3.4.1	XopB unterdrückt ein breites Spektrum von Zelltodreaktionen auf verschiedenen Pflanzen	75
3.4.2	HopD1 _{pag} hat eine ähnliche Virulenzaktivität wie XopB.....	77
3.4.3	XopB induziert eine Zelltodreaktion in <i>Nicotiana benthamiana</i>	79
3.4.4	XopB ist im ER und Golgivesikeln lokalisiert.....	80
3.4.5	Einfluss von XopB auf Phytohormone.....	83
3.4.6	Suche nach pflanzlichen Zielproteinen von XopB	84
3.4.7	Silencing von 5 putativen XopB-Interaktoren	86
3.5	Verifizierung neuer Effektorproteine.....	91
4	Diskussion	93
4.1	XopI	93
4.2	Der Typ III-Effektor XopH.....	95
4.2.1	Zelltodunterdrückung ist abhängig von enzymatischer Aktivität	96
4.2.2	XopH agiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle	98
4.2.3	WRKY1 und LaArcA1 wurden als Beuteproteine von XopH isoliert.....	98
4.3	Das Typ III-Effektorprotein XopG	100
4.3.1	XopG wird spezifisch in Paprikapflanzen erkannt.....	100
4.3.2	XopG – ein Nachteil für die <i>Xanthomonas</i> ?	101
4.3.3	Zink-Bindemotiv und Kernlokalisierung sind Voraussetzungen für die Erkennung von XopG in Paprika	101
4.3.4	Die Erkennung von XopG erfolgt indirekt.....	103
4.3.5	XopG interagiert in planta mit den kernlokalisierten Proteinen SPRY und RRM	103

4.3.6	SPRY spielt möglicherweise eine Rolle bei der Erkennung von XopG in Paprika ECW	105
4.3.7	Neue Kandidaten, die Virulenzziele von XopG darstellen könnten	106
4.4	Das Typ III-Effektorprotein XopB	107
4.4.1	XopB – ein genereller Zelltodsuppressor.....	107
4.4.2	XopB ist im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Vesikeln lokalisiert und löst eine Zelltodreaktion in <i>N. benthamiana</i> aus	109
4.4.3	XopB Homologe in anderen Phytopathogenen haben möglicherweise ähnliche Funktionen.....	110
4.4.4	Ein Transmembranprotein und ein hypothetisches Protein beeinflussen die Erkennung von XopB in <i>N. benthamiana</i>	111
4.4.5	Die Identifizierung neuer Interaktoren von XopB ermöglicht spannende Perspektiven für die Untersuchung des Mechanismus der HR-Suppression ...	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Komponenten der durch PAMPs ausgelösten Abwehrreaktion und ihre Interaktion untereinander.	4
Abbildung 2: Modell des T3SS von <i>Xanthomonas</i>	9
Abbildung 3: Modelle der Erkennung von Effektoren durch R-Proteine.	15
Abbildung 4: Bilder der Infektion mit <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	18
Abbildung 5: XopG hat ein Zink-Bindemotiv und ist homolog zur Proteasedomäne von Neurotoxinen.	21
Abbildung 6: Struktur von XopI.	22
Abbildung 7: Das GAL4-Hefe-Diybrid-System.	40
Abbildung 8: Deletion von <i>xopI</i> in <i>Xcv</i> 85-10 führt zu keiner veränderten Virulenz.	43
Abbildung 9: XopI ist im pflanzlichen Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert.	45
Abbildung 10: XopI und Teile von XopI binden unspezifisch im Hefe-2-Hybrid-System.	47
Abbildung 11: Deletion von XopH hat Einfluss auf die AvrBs1-HR im Stamm <i>Xcv</i> 85-10. .	48
Abbildung 13: XopH unterdrückt, abhängig von Cystein 267, die durch XopJ ausgelöste Zelltodreaktion.	50
Abbildung 14: Kernlokalisierung ist für die Virulenzfunktion von XopH nicht notwendig. ..	51
Abbildung 15: Spezifische Interaktion isolierter Beuteprotein-Fragmente mit XopH.	52
Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisierung der XopH-Interaktoren.	54
Abbildung 17: Stärkeres Wachstum der XopG-Deletionsmutante im Vergleich zu 85-10 WT.	55
Abbildung 18: Xop G verursacht Zelltod auf Paprika ECW (A), nicht aber auf ECW-30R (B).	56
Abbildung 19: Punktmutation E174A im Zinkbindemotiv verhindert die XopG-HR, Lokalisierung von XopG im pflanzlichen Zellkern und Nukleolus, wird durch diese Mutation nicht beeinflusst.	59
Abbildung 20: Lokalisierung von XopG im Nukleus/Nukleolus scheint wichtig für die Funktion in der Pflanze.	61
Abbildung 21: XopB unterdrückt die XopG-HR.	62
Abbildung 22: XopB und XopG binden im Gal4 Hefe-2-Hybrid-System nicht aneinander. ..	63
Abbildung 23: Deletion des Suppressors XopB hat auch bei Überexpression von XopG keinen Einfluss auf das Wachstum von <i>Xcv</i> 85-10 in Paprika ECW.	64
Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisierung und Expression von XopG-Deletionsderivaten <i>in planta</i>	66
Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisierung der XopG-Interaktoren SPRY, POM und RRM. .	69
Abbildung 26: Bindung von XopG an SPRY und PPM <i>in planta</i>	70
Abbildung 27: Koimmunopräzipitation von XopG und RRM.	71
Abbildung 28: <i>Silencing</i> von SPRY reduziert die XopG-HR in ECW.	73
Abbildung 29: XopB unterdrückt ein breites Spektrum an Zelltodreaktionen in verschiedenen Pflanzen.	76
Abbildung 30: HopD1 _{Pag} hat eine mit XopB überlappende Virulenzfunktion.	78
Abbildung 31: Expression von HopD1, HopD1m und AvrRxv.	79

Abbildung 32: XopB und das homologe Protein HopD1 _{pag} lösen eine Zelltodreaktion in <i>N. benthamiana</i> aus, die durch die Punktmutationen A408V und K550R verhindert wird.	80
Abbildung 33: XopB ist im ER und in Golgi-Vesikeln lokalisiert.	82
Abbildung 34: XopB reduziert den Gehalt von Salizylsäure (SA) und ACC in der Pflanzenzelle.	84
Abbildung 35: Bestätigung der spezifischen Bindung von Beuteproteinen an XopB in Hefe.	85
Abbildung 36: Die Transkriptmengen von <i>TPX2</i> und <i>PMP1</i> wurde durch das Gen- <i>Silencing</i> deutlich reduziert.	89
Abbildung 37: Die N-Termini von XopK, XopR und XopS besitzen Typ III-Sekretionssignale und übertragen AvrBs3Δ2 in die Pflanzenzelle.	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Typ III-Effektorproteine aus <i>Xcv</i>	20
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.	24
Tabelle 3: Verwendete Plasmide.	27
Tabelle 4: Phänotypen der Effektoren XopG, XopH und XopI in verschiedenen Pflanzenspezies.	44
Tabelle 5: Keine Aufspaltung der XopG-HR in der F2-Generation einer Kreuzung aus ECW- und ECW-30R-Paprikapflanzen.	58
Tabelle 6: Auflistung der XopG-Interaktoren.	67
Tabelle 7: Liste der identifizierten Interaktoren von XopG _{EI74A}	74
Tabelle 8: Einfluss von XopB-Expression auf verschiedene Zelltodreaktionen.	77
Tabelle 9: Auflistung aller identifizierter XopB Beuteproteine.	86
Tabelle 10: Einfluss des <i>Silencing</i> von 4 XopB-Interaktoren auf die XopB-HR und die Suppression der AvrBsT-HR durch XopB.	88
Tabelle 11: Zusammenfassung der Phänotypischen Analysen der analysierten Effektorproteine.	90

Abkürzungsverzeichnis

<i>avr-</i> , Avr-	Avirulenz
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA-AFLP	<i>complementary DNA-amplified fragment length polymorphism</i>
CDPK	<i>calcium dependent protein kinase</i>
CDS	<i>cell death suppression</i> (Zelltodsuppression)
<i>cfu</i>	<i>colony forming units</i> (Koloniebildende Einheiten)
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
ECW	Early Californian Wonder; <i>Capsicum annuum</i> -Kultivar
EFR	EF-Tu Rezeptor
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EPS	extrazelluläres Polysaccharid
ETI	<i>effector triggered immunity</i>
FLS2	<i>flagellin-sensing 2</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
Hop	<i>hrp outer protein</i>
<i>hpa</i> , Hpa	<i>hrp-associated</i>
HR	hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i> , Hrc	<i>hrp-conserved</i>
<i>hrp</i> , Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunopräzipitation
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LRR-RK	<i>leucine-rich repeat - receptor kinase</i>
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
MAPK	Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NB-LRR	<i>nucleotide binding site – leucine rich repeat</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PIP	<i>plant inducible promoter</i>
PR	<i>pathogenicity related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
pv.	Pathovar
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RK	<i>receptor kinase</i>
R-Protein	Resistenzprotein
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spp.	<i>species pluralis</i> ; Subspezies
T3E	Typ III Effektorprotein
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
TMH	Transmembranhelix
T3S-	Typ III-Sekretions-
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i>
<i>xop</i> , Xop	<i>Xanthomonas outer protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb-fluoreszierendes Protein
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1 Einleitung

Im Laufe der Evolution haben sich Bakterien durch das Besiedeln von höheren Organismen ein reichhaltiges Nährstoffreservoir erschlossen. Einige von ihnen leben symbiotisch, z.B. bilden Cyanobakterien und Pilze Flechten, die neue Lebensräume besiedeln können; Rhizobien bilden Wurzelknöllchen an Leguminosen und fixieren Stickstoff. Sehr vielfältige Symbiosen mit Bakterien gibt es auch im Tierreich. Allein beim Menschen übernehmen Bakterien der Normalflora, z.B. Vertreter der Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* und Laktobacillen, unzählige Funktionen. Einige schützen z.B. durch die Besiedlung von Haut und Darm oder durch Säureproduktion vor dem Befall mit potentiellen Krankheitserregern. Sie synthetisieren Vitamine, entgiften Toxine, bauen Cholesterin ab, fördern die Darmperistaltik und stimulieren das Immunsystem. Allerdings sind nicht alle Interaktionen von Bakterien mit höheren Organismen auf gegenseitigen Vorteil ausgelegt. So werden beim Kommensalismus Abfallstoffe des Wirtes verwertet, ohne dass dieser einen Nutzen davon hat. Beim Parasitismus hingegen wird der Wirt geschädigt oder sogar getötet. Solche parasitischen Bakterien werden als Pathogene bezeichnet, wobei zwischen Tierpathogenen und Pflanzenpathogenen (= Phytopathogenen) unterschieden werden kann.

1.1 Gram-negative Phytopathogene

Unter natürlichen Bedingungen sind die meisten Pflanzen gesund. Sie sind in der Lage durch verschiedene Mechanismen eine Reihe von Phytopathogenen zu erkennen, wodurch deren Vermehrung verhindert wird (Boller und He, 2009).

Dass ein Pathogen in der Lage ist, eine Pflanze zu besiedeln und in Nischen wie Wurzeln, Leitgewebe, Blättern, Blüten oder Früchten zu wachsen, ist eher die Ausnahme und erfordert ausgeklügelte Strategien. Aufgrund des Anbaus von Nutzpflanzen durch den Menschen und die damit verbundenen Monokulturen, ist ein Pathogen, das die Abwehrmechanismen der Pflanzen einmal umgehen kann, jedoch in der Lage sich stark zu vermehren und hohe Ernteaufälle zu verursachen. Diese Ernteaufälle stellen besonders in der heutigen Zeit ein Problem bei der Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung dar. So wird z.B. durch das Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, das die Weißblättrigkeit auslöst, bis zu 50% der

Reisernte im tropischen Asien zerstört (Reddy, 1989). Auch andere Gram-negative Phytopathogene führen zu, wenn auch weniger drastischen, Ernteaussfällen. Die am besten untersuchten, sind, neben anderen Xanthomonaden, Vertreter der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Xylella* und *Agrobacterium*.

Die Pflanzen reagieren auf Infektion mit Bakterien auf zwei Wegen. Einerseits erkennen und reagieren sie auf bestimmte Moleküle, die viele Bakterien gemeinsam haben, darunter auch nicht-pathogene Bakterien. Andererseits reagieren sie spezifisch auf verschiedene zur Pathogenität beitragende sogenannte Virulenzfaktoren von pathogenen Bakterien. Die Erkennung kann entweder direkt geschehen oder durch das Registrieren von Veränderungen, die die Virulenzfaktoren verursachen (Büttner und Bonas, 2010; Zipfel und Robatzek, 2010).

1.2 Die basale pflanzliche Abwehr

Die erste Stufe der pflanzlichen Abwehr ist die basale Resistenz. Diese umfasst sowohl mechanische Barrieren wie die Kutikula und die dicke pflanzliche Zellwand, wie auch die Induktion einer Vielzahl von Abwehrmechanismen. Dazu gehören beispielsweise das Schließen der Stomata, um das Eindringen von Bakterien zu verhindern, Kalloseauflagerungen, um die Zellwand zu verstärken, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und von Stickstoffoxid, die Anhebung des zytosolischen Ca^{2+} -Levels und die Signalübertragung über Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPK) und Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK)-Kaskaden (Nicaise *et al.*, 2009). Letzteres schließt häufig auch die Aktivierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren mit ein und führt zur Transkription von PR (*pathogenicity related*)-Genen (Abbildung 1).

Ausgelöst werden diese Abwehrmechanismen durch die Erkennung bestimmter konservierter Oberflächenstrukturen der Mikroorganismen, den sogenannten PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), aufgrund des generellen Auftretens, auch in nicht-pathogenen Organismen, auch MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) genannt, durch pflanzliche Rezeptoren: PRRs (*pattern recognition receptors*; Medzhitov und Janeway, 1997; He *et al.*, 2007).

MAMPs sind molekulare Signaturen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass eine ganze Klasse von Mikroorganismen sie besitzen, sie sich in der Evolution nur langsam verändern und in Pflanzen nicht vorkommen (Medzhitov und Janeway, 1997). Dazu gehören bei Gram-negativen Phytopathogenen beispielsweise Flaggelin als Bestandteil des bakteriellen Flagellums, der Elongationsfaktor EF-Tu, der sekretiert werden kann und dann

möglicherweise als Adhäsion wirkt, der Zellwandbestandteil Peptidoglykan, Harpine (Kapitel 1.4.3), Lipopolysaccharide (LPS) und Kälteschockproteine (Boller und Felix, 2009; Zipfel *et al.*, 2006; Erbs *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004; Silipo *et al.*, 2005; Felix und Boller, 2003).

Darüber hinaus können auch durch den Abbau bakterieller Enzyme freigesetzte pflanzeigene Moleküle, z.B. Bestandteile der pflanzlichen Zellwand, ebensolche Abwehrreaktionen auslösen. Diese Abbauprodukte werden in Publikationen der letzten Jahre auch als DAMPs (*damage associated molecular pattern*) bezeichnet (Lotze *et al.*, 2007).

DAMPs und MAMPs werden von PRRs an der pflanzlichen Zellmembran erkannt, was eine Vielzahl von Reaktionen auslöst. Diese Abwehrreaktion wird auch als PTI (*PAMP triggered immunity*) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006).

Bisher sind zwar viele MAMPs, jedoch sehr wenige Rezeptoren bekannt. Die bekannten PRRs gehören zu den LRR-RKs (*leucine rich repeat - receptor kinases*). Sie besitzen eine 21 Aminosäuren lange extrazelluläre LRR (*leucine rich repeat*)-Domäne, eine Transmembran-Domäne und eine in das Zytoplasma ragende Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Die am besten untersuchten MAMP/PRR-Paare sind Flagellin/FLS2 (*flagellin-sensing 2*) und EF-Tu/EFR (EF-Tu Rezeptor; Boller und Felix, 2009; Zipfel *et al.*, 2006). Der Rezeptor von flg22 FLS2 ist einige Minuten nach einer MAMP-Behandlung nicht mehr an der Plasmamembran nachzuweisen, sondern in Vesikeln; es findet Endozytose statt. Ob FLS2 in den Vesikeln eine bestimmte Signalfunktion hat oder ob dies ein Weg der Pflanze ist, einen aktivierten Rezeptor zu entfernen, ist noch nicht bekannt (Robatzek *et al.*, 2006; Nicaise *et al.*, 2009). Vor diesem Prozess interagiert FLS2 mit BAK1 (*BRI1-associated receptor kinase 1*; Chinchilla *et al.*, 2007). BAK1 ist eine membranständige LRR-RLK, die Komplexe mit verschiedenen PRRs bildet und von der angenommen wird, dass es sich um einen zentralen Regulator der Abwehr handeln könnte (Chinchilla *et al.*, 2009). Erstmals wurde BAK1 als Interaktionspartner des Brassinosteroid-Rezeptors BRI1 isoliert.

Die auf die Erkennung folgende Signalweiterleitung ist vermutlich zwischen verschiedenen Pflanzen konserviert. So reagiert *Nicotiana (N.) benthamiana*, eine Pflanze die kein eigenes EF-Tu Erkennungssystem besitzt, nach transienter Expression von EFR aus *Arabidopsis* auf elf18 (das kürzeste responsive Peptid von EF-Tu) mit einer Abwehrreaktion (Zipfel *et al.*, 2006).

Die PTI ist eine sehr frühe Reaktion der Pflanze und findet zum großen Teil bereits innerhalb von 10 Minuten nach der MAMP-Erkennung statt. Durch die Nutzung von *Arabidopsis*-Zellkulturen konnte der zeitliche Ablauf der auf die MAMP-Erkennung folgenden Reaktionen bestimmt werden: Zu sehr frühen Reaktionen gehören ein Ionenstrom einhergehend mit der

Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Levels und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies geschieht in der Regel nach einer sehr kurzen *lag*-Phase von 0,5-2 min (Boller und Felix, 2009). Nur wenig später folgt die Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden.

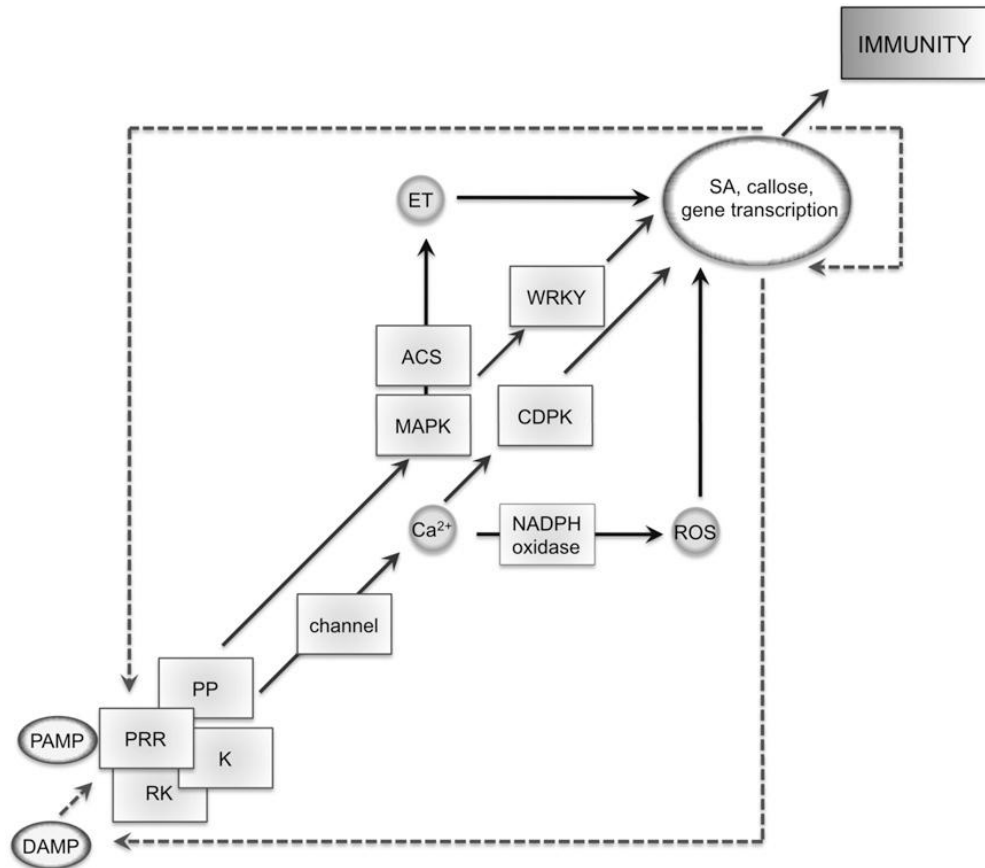


Abbildung 1: Molekulare Komponenten der durch PAMPs ausgelösten Abwehrreaktion und ihre Interaktion untereinander. PAMP, DAMP, PRR, regulatorische RK, zytoplasmatische Kinasen (K), Phosphatase (PP), CDPKs, MAPKs, 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat Synthase (ACS), WRKY Transkriptionsfaktoren, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Ethylen (ET) und Salizylsäure (SA). Die schwarzen Pfeile zeigen *downstream* Interaktionen, die gestrichelten Pfeile deuten auf mögliche positive Verstärkungen. Abbildung aus Zipfel und Robatzek, 2010.

Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und der damit verbundene Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma ist ein entscheidender Schritt in der pflanzlichen basalen Resistenz (Kapitel 1.3; Ma und Berkowitz, 2007; Zipfel und Robatzek, 2010). Die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration wird von Calcium-bindenden Proteinen wie Calmodulin oder CDPKs erkannt (Abbildung 1; Boudsocq *et al.*, 2010). Für einige solcher Proteine konnte gezeigt werden, dass sie in der Abwehr eine Rolle spielen, beispielsweise bei der Kontrolle von ROS und Salizylsäure (SA; Galon *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009).

ROS können sowohl direkt antimikrobiell wirken, als auch indirekt durch *Crosslinking* der Zellwand (Bradley *et al.*, 1992). Außerdem wirken sie als sekundäre Stress-Signale, um

Abwehrreaktionen auszulösen (Apel und Hirt, 2004). Sowohl ROS, als auch MAP-Kinasen regulieren die Expression von PR-Genen durch die Regulation von WRKY- und anderen Transkriptionsfaktoren. Während MAP-Kinasen die Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung von meist Serin- und Threonin-Resten aktivieren, geschieht die Regulation durch ROS durch die Oxidation von Cysteinresten. Zusätzlich aktivieren ROS selbst ebenfalls MAP-Kinase-Kaskaden (Apel und Hirt, 2004).

All dies resultiert in einem stark veränderten Phosphorylierungsmuster der pflanzlichen Proteine und schließlich in der Veränderung der Genexpression. So sind 30 Minuten nach Induktion mit flg22 und elf26 nahezu 1000 Gene induziert und 200 reprimiert (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Das Muster unterscheidet sich zwischen beiden MAMPs nur wenig und auch bei Elicitoren aus Pilzen wurde ein vergleichbares Expressionsmuster gefunden (Ramonell *et al.*, 2002). Dies und die Tatsache, dass es keinen additiven Effekt bei Behandlung mit flg22 und elf18 gibt, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Signale an einem frühen Punkt zusammenlaufen und es dann eine gemeinsame Signalweiterleitung gibt (Zipfel *et al.*, 2006; Boller und Felix, 2009).

Weitere frühe Reaktionen, die in Zellkulturexperimenten ca. 10-20 Minuten nach der Behandlung mit dem Elicitor auftreten, sind die Ethylen-Biosynthese und die bereits oben erwähnte Endozytose des Rezeptors FLS2 (Boller und Felix, 2009).

Zu den späteren Reaktionen der Pflanze gehören Kalloseauflagerungen und das Schließen der Stomata (Gudesblat *et al.*, 2009). Auch wenn die biologische Funktion von Kalloseauflagerungen noch nicht sicher geklärt ist, so sind sie doch häufig im Zusammenhang mit PTI beobachtet und oft als ein Marker für dieselbe genutzt worden (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Abramovitch *et al.*, 2006a). Es wird angenommen, dass die damit verbundene Zellwandverstärkung um die Infektionsstelle, die Abwehr erhöht (Chisholm *et al.*, 2006).

Die Summe aller Abwehrreaktionen lässt die Pflanze eine Besiedelung mit unspezifischen pathogenen Bakterien abwehren. Jedoch haben Pathogene eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, ihre Virulenz zu verbessern oder überhaupt zu ermöglichen.

1.3 Virulenzfaktoren Gram-negativer Phytopathogene

Um die basale Abwehr zu umgehen oder die Pathogenität zu steigern, bedient sich das Bakterium vielfältiger Virulenzfaktoren. Dazu gehören unter anderem Toxine, hydrolytische Enzyme, extrazelluläre Polysaccharide, verschiedene Pili, Adhäsine sowie Transportsysteme, welche Proteine, darunter Effektorproteine, in den Apoplasten oder die Pflanzenzelle

übertragen. Bereits vor dem Eindringen in die Pflanze können Pathogene von Virulenzfaktoren profitieren. So wird spekuliert, dass z.B. Typ 4-Pili, indem sie die Aggregation der Bakterien unterstützen, gegen Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung und Austrocknung auf der Blattoberfläche helfen (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002). Auch beim Eindringen in die Pflanze spielen Typ 4-Pili anscheinend eine wichtige Rolle. So wurde für *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* gezeigt, dass nach Spray-Inokulation von Bohnenblättern nur Bakterien mit Pili Symptome verursachten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich diese Bakterien an den Stomata befanden, während Mutanten ohne Pili gleichmäßig auf der ganzen Blattoberfläche verteilt waren (Romantschuk und Bamford, 1986). Eine Konzentration der Bakterien mit Typ 4-Pili an den Stomata von Hyazinthen-Blättern konnte ebenfalls bei *X. campestris* pv. *hyacinthi* beobachtet werden (van Doorn *et al.*, 1994), was auf eine Funktion beim Eindringen durch geöffnete Stomata hinweisen könnte. Im Gegensatz dazu akkumuliert *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) abhängig von Typ 4-Pili an Trichomen von Tomaten-Blättern, wobei jedoch ein Einfluss auf die Virulenz nicht nachgewiesen werden konnte (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). Eine neuere Studie (Bahar *et al.*, 2009) zeigt, dass Typ4-Pili für die Virulenz von *Acidovorax avenae* spp. *citrulli* auf Melonenkeimlingen essentiell sind. Auch die Ausbreitung von systemischen Pathogenen im Xylem gegen die Strömungsrichtung kann mit Hilfe von Typ 4-Pili erfolgen (Meng *et al.*, 2005).

Im Apoplasten angekommen, schützen Lipopolysaccharide (LPS) und Exopolysaccharide (EPS), z.B. Xanthan, vor dem Austrocknen, helfen beim Anheften an die Wirtszellen und können die Zugänglichkeit von Nährstoffen verbessern. LPS machen außerdem die bakterielle Zellwand undurchdringlicher und können somit zum Schutz vor antimikrobiellen Substanzen beitragen (Newman *et al.*, 2007). Bei systemischen Pathogenen wie *Xylella fastidiosa* oder *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* spielt EPS als Virulenzfaktor eine besonders große Rolle. Hier kann es die pflanzlichen Leitgefäße verstopfen und dadurch die Pathogenität steigern sowie Welke verursachen (Denny, 1995; Roper *et al.*, 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl EPS als auch LPS die durch MAMPs hervorgerufene basale Resistenz durch die Bildung von Ca^{2+} -Chelaten unterdrücken können (Aslam *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2007), was noch einmal die Bedeutung von Ca^{2+} in der Signaltransduktion der pflanzlichen Abwehr verdeutlicht.

Beim anschließenden Durchdringen der pflanzlichen Zellwand spielen verschiedene Enzyme, wie Zellulasen, Hemizellulasen und Pektinasen eine entscheidende Rolle. So können die 3 Hauptbestandteile der Zellwand: Zellulose, Hemizellulose und Pektin in Einfachzucker

gespalten und somit gleichzeitig als Nahrungsquelle zugänglich gemacht werden (Lagaert *et al.*, 2009).

Alle erwähnten Substanzen werden durch 6 verschiedene Klassen von Transportsystemen aus der Zelle geschleust. Das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) und das Typ V-Sekretionssystem (T5SS) sind vom generellen Sec-System, welches Proteine über die innere Membran transportiert, abhängig und benötigen eine spezielle N-terminale Signalsequenz. Hingegen können das Typ I- (T1SS), Typ III- (T3SS), Typ IV- (T4SS) und das Typ VI-Sekretionssystem (T6SS) Proteine über beide bakterielle Membranen in die Umgebung oder direkt in das Innere der Wirtszelle übertragen (Büttner und Bonas, 2010).

Das erst vor relativ kurzer Zeit entdeckte T6SS (Pukatzki *et al.*, 2006) scheint ein essentieller Pathogenitätsfaktor zu sein, da es in virulenten Bakterienstämmen vorkommt, nicht aber in nicht virulenten Spezies der gleichen Gattung. So sind Gene mit Homologie zu Bestandteilen des T6SS in *Xanthomonas campestris*, *X. oryzae* und *X. axonopodis* zu finden, nicht jedoch in den nicht virulenten Stämmen *X. codiaei* und *X. populi* (Shrivastava und Mande, 2008).

1.4 Das Typ III-Sekretionssystem

Das T3SS ist in den vergangenen Jahrzehnten besonders in den Fokus der Forschung gerückt. Es ist essentiell für die Pathogenität der meisten Gram-negativen Phytopathogene und kann Effektorproteine in einem Schritt über beide bakteriellen Membranen bis direkt in das Innere der Wirtszelle übertragen (Büttner und Bonas, 2002a). Interessanterweise ist das T3SS zwischen Tier- und Pflanzenpathogenen konserviert und hat einen gemeinsamen Ursprung mit dem Flagellensystem (He *et al.*, 2004; Van Gijsegem *et al.*, 1995). Zuerst wurde es bei *Yersinia enterocolitica* beschrieben (Heesemann *et al.*, 1984), schon bald darauf wurden bei den Phytopathogenen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* und *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* erste Pathogenitätsgene, die für das T3SS kodieren, durch Mutationsanalysen entdeckt (Niepold *et al.*, 1985; Lindgren *et al.*, 1986). Mittlerweile ist viel über den Aufbau, die Regulation, die Substrate und die Regulation der Sekretion bekannt (Cornelis, 2006; Büttner und He, 2009).

1.4.1 Der Aufbau des T3SS

Das T3SS setzt sich aus einem basalen Teil, welcher beide bakteriellen Membranen durchspannt und den extrazellulären Anhängen, Pilus und Translokon, zusammen (Abbildung 2). Der Pilus überbrückt den langen Weg durch die pflanzliche Zellwand bis zur Zellmembran, in der das Translokon dann eine abschließende Pore bildet (Abbildung 2; Büttner und Bonas, 2002b; Weber *et al.*, 2005; Büttner und He, 2009).

Gene, die für das T3SS kodieren, befinden sich häufig auf Pathogenitätsinseln oder Plasmiden, mit einem stark vom Genom abweichenden GC-Gehalt; oft flankiert von *direct repeats*, IS Elementen, t-RNA Genen und/oder Genen von Integrasen und Transposasen, weshalb spekuliert werden kann, dass sie sich über horizontalen Gentransfer verbreitet haben (Hacker und Kaper, 2000). Bei Phytopathogenen werden die Komponenten des T3SS einschließlich einer assoziierten filamentösen Struktur, dem Hrp-Pilus, von einem Cluster kodiert, das als *hrp*-Gencluster (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) bezeichnet wird, weil es sowohl für die Pathogenität eines Bakteriums als auch für die Fähigkeit eine als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnete Zelltodreaktion auszulösen, essentiell ist. Das *hrp*-Gencluster umfasst mehr als 20 Gene, wovon einige zwischen Tier- und Pflanzenpathogenen konserviert sind. Diese Gene werden als *hrc* (*hrp conserved*) Gene bezeichnet und kodieren für den basalen Teil des T3SS (He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). Die angrenzenden Gen-Regionen sind häufig sehr variabel und kodieren für Substrate des T3SS (Kapitel 1.4.3).

1.4.2 Regulation des T3SS

Die Typ III-Sekretion ist ein regulierter Prozess. Gene, die für Bestandteile des T3SS kodieren, werden nicht ständig abgelesen. Verschiedene Umweltfaktoren, wie z.B. die Umgebungstemperatur, pH-Wert, Zelldichte oder Mg^{2+} -Konzentration, können dazu führen, dass die Expression aktiviert wird (Francis *et al.*, 2002). Bei *Xcv* wird erst in der Pflanze oder in einem Minimalmedium, das die Bedingungen im pflanzlichen Apoplasten nachahmt, die Expression aktiviert (Wengelnik und Bonas, 1996). In *Xcv* sind 2 Proteine für die Regulation verantwortlich, die beide außerhalb des *hrp*-Genclusters liegen (Bonas *et al.*, 1991), HrpG und HrpX (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996). HrpG ist der übergeordnete Transkriptionsaktivator und gehört zur OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Regulatoren. Er erhält ein noch unbekanntes Signal und aktiviert anschließend ein genomweites Regulon, einschließlich der *hrp*-Gene und der sogenannten *xop*-Gene (*Xanthomonas outer proteins*; Noël *et al.*, 2001). In einigen Fällen geschieht das direkt, meistens jedoch über HrpX, einen Transkriptionsaktivator der AraC/XylS-Familie (Wengelnik und Bonas, 1996).

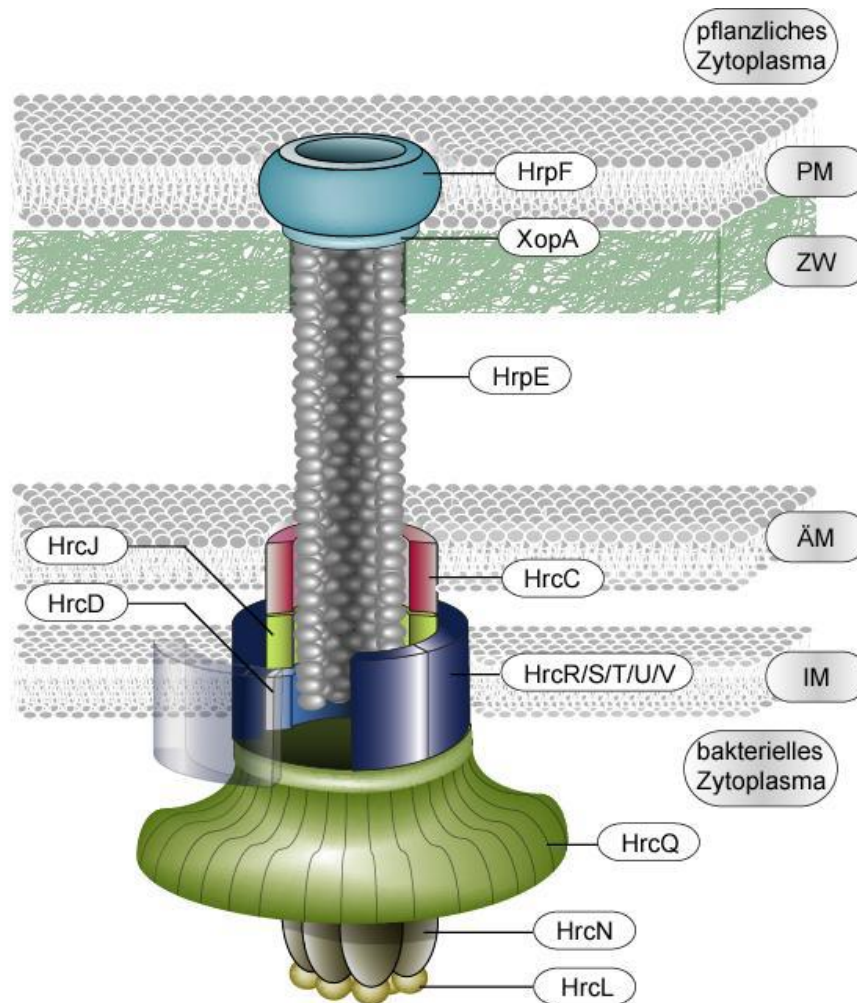


Abbildung 2: Modell des T3SS von *Xanthomonas*. Der basale Teil des T3-Sekretionsapparates besteht aus Hrc-Proteinen und durchspannt beide bakterielle Membranen. Mit diesem Komplex ist der Pilus assoziiert, der die dicke pflanzliche Zellwand durchspannt und schließlich in einer Translokation-Pore aus HrpF und XopA mündet. Über den Pilus und durch das Translokation-Pore werden Effektorproteine in das Innere der Pflanzenzelle geschleust. PM, Plasmamembran; ZW, Zellwand; ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran. Abbildung aus Berger *et al.*, 2006.

Viele von HrpX regulierten Gene besitzen in ihrem Promotorbereich eine sogenannte PIP-Box (PIP - *plant inducible promoter*), mit der Konsensussequenz TTCG-N16-TTCG, an die HrpX direkt bindet (Koebnik und Krüger *et al.*, 2006). PIP-Box-ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen Xanthomonaden und in *Ralstonia solanacearum* gefunden (da Silva *et al.*, 2002).

1.4.3 Substrate des T3SS

Bevor Effektorproteine in die Pflanzenzelle übertragen werden können, muss zuerst das T3SS vollständig aufgebaut werden. Während dieses Prozesses werden als erste Substrate

extrazelluläre Komponenten des Apparates aus dem Bakterium in die Umgebung transportiert (Lorenz und Büttner, 2011). Dazu zählen Bestandteile des Pilus und des Translokons.

Eine weitere Gruppe von Substraten des T3SS sind die Harpine, die im *hrp*-Gencluster kodiert sind. Sie wurden zuerst in *Erwinia amylovora* isoliert (Wei *et al.*, 1992), kurze Zeit später auch in anderen Gram-negativen Phytopathogenen wie *P. syringae* pv. *syringae* (He *et al.*, 1993) *Ralstonia solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994) und *Xanthomonas* spp. (Kim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Harpine sind untereinander nicht homolog, haben aber gemeinsame Merkmale: das Auftreten zahlreicher Glycine, das Fehlen von Cysteinresten sowie Hitzestabilität; im Apoplasten von Pflanzen lösen sie eine unspezifische Zelltodreaktion aus (Kim und Beer, 1998; Kim *et al.*, 2004). Die genaue Funktion von Harpinen ist noch nicht bekannt, jedoch konnte für HrpZ aus *P. syringae* pv. *syringae* gezeigt werden, dass es mit dem wachsenden Pilus assoziiert ist (Li *et al.*, 2002) und für HrpZ aus *P. syringae* pv. *phaseolicola* und PopA und PopW aus *R. solanacearum*, dass sie an Membranen binden und dort sogar Poren bilden können (Lee *et al.*, 2001; Racapé *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Für einige Harpine konnte gezeigt werden, dass sie Amyloid-ähnliche fibrilläre Strukturen bilden (Oh *et al.*, 2007), diese Strukturbildung korreliert mit der Fähigkeit eine HR auszulösen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Harpine beim Aufbau des Apparates helfen könnten. Sie könnten die pflanzliche Membran destabilisieren und so die Integration des Translokons unterstützen oder selbst ein Teil des Translokons sein. Eine weitere derzeit diskutierte Möglichkeit ist, dass die durch Harpine gebildeten Poren zur Nährstoffversorgung der Pathogene beitragen (Engelhardt *et al.*, 2008).

Die dritte und umfangreichste Gruppe von T3SS-Substraten sind die Typ III-Effektor Proteine (T3Es). Sie werden über die bakteriellen Membranen und zusätzlich über die pflanzliche Zellwand und die Zytoplasmamembran direkt in das Zytoplasma transloziert. Die effiziente Sekretion und/oder Translokation hängt von einem Signal im N-Terminus der jeweiligen Proteine ab. Dieses Signal ist auf Aminosäureebene nicht konserviert und die genauen Eigenschaften dieses Signals sind trotz intensiver Studien noch nicht bekannt (Arnold *et al.*, 2009).

1.5 Typ III-Effektorproteine

Phytopathogene injizieren einen individuellen Mix aus verschiedenen T3Es in die Pflanzenzelle, wo sie zur vollständigen Pathogenität der Bakterien beitragen (Mudgett, 2005; Büttner und Bonas, 2010). Aufgrund des großen Sets von Effektorproteinen von ca. 30-40 bei

Xanthomonaden oder *Pseudomonas syringae* (<http://www.xanthomonas.org/>; <http://www.pseudomonas-syringae.org/>) und der funktionellen Redundanz, ist es schwer, Aussagen über die Funktionen einzelner Effektoren zu treffen (Kvitko *et al.*, 2009; Büttner und Bonas, 2010). Die ersten T3Es wurden daher auch aufgrund ihrer Avirulenzaktivität identifiziert, d.h. aufgrund ihrer Erkennung in der Pflanze (Ronald und Staskawicz, 1988; Bonas *et al.*, 1989; Kearney und Staskawicz, 1990; Whalen *et al.*, 1993; Ciesiolka *et al.*, 1999; Astua-Monge *et al.*, 2000a; Kapitel 1.5.2).

Effektoren sind sehr unterschiedlich bezüglich ihrer Größe, Sequenz, Struktur und Funktion, was die Identifizierung weiterer Kandidatengene zunächst erschwert hat. Aufgrund einiger Gemeinsamkeiten und besonderer Merkmale war es jedoch später möglich, eine Vielzahl neuer T3Es zu identifizieren, besonders nach der vollständigen Sequenzierung einiger Genome von Phytopathogenen (da Silva *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2005).

Ein wichtiges Merkmal vieler T3Es ist die Koregulation mit dem T3SS. So konnten Kandidatengene für neue Effektoren mittels cDNA-AFLP (Noël *et al.*, 2001) oder, nach der Genomsequenzierung, mittels Mikroarray identifiziert werden (Occhialini *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006). Jedoch gibt es hier einige Ausnahmen. Während bei *P. syringae* alle Effektoren mit dem T3SS koreguliert sind (Chang *et al.*, 2005), trifft dies bei *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* nicht zu. So sind beispielsweise die Effektoren AvrRxv, AvrBs3 und das in dieser Arbeit näher charakterisierte XopG konstitutiv exprimiert (Knoop *et al.*, 1991; Ciesiolka *et al.*, 1999; Thieme, 2006).

Genombasierte Ansätze nutzten unter anderem das Wissen um bestimmte konservierte Promotorbereiche von Effektorgenen, wie die PIP-Box oder die Hrp-Box; zusätzlich konnten Effektor-Kandidaten aufgrund des von der Umgebung abweichenden GC-Gehaltes oder dem Vorkommen bestimmter eukaryotischer Motive, wie beispielsweise eine F-Box oder ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localisation signal*), identifiziert werden (Guttman *et al.*, 2002; Büttner *et al.*, 2003; Thieme, 2006; Furutani *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2009; Samudrala *et al.*, 2009). Diese genombasierten Ansätze sind unabhängig von der Regulation der Effektorgene. Darüber hinaus ist ein neuer genomweiter „funktioneller Screen“ zur Identifizierung von T3Es entwickelt worden (Mukaihara *et al.*, 2010). Über die Summe vieler verschiedener Ansätze wurden zahlreiche Effektorkandidaten isoliert.

Sind solche Kandidaten gefunden, wird überprüft, ob sie ein Signal besitzen, was sie zum Transport über das T3SS in die Pflanzenzelle befähigt. Über solche Signale ist bereits viel spekuliert worden. Es ist bekannt, dass sich das Sekretions- und das Translokationssignal im

N-Terminus der Proteine befinden. Verlässliche gemeinsame Merkmale eines solchen Signals sind aber bisher nicht bekannt, so dass es bisher auch nicht möglich ist, ein Translokationssignal visuell oder computergestützt vorherzusagen. Jedes dieser Kandidatenproteine muss daher experimentell auf Translokation überprüft werden, bevor man davon ausgehen kann, dass es sich tatsächlich um ein T3E handelt. Die Verifizierung eines T3Es erfolgte häufig durch Fusionen mit einem Reporter gen, beispielsweise Adenylatcyclase oder AvrBs3 ohne eigenes Translokationssignal, dessen Phänotyp in der Pflanzenzelle leicht bestimmbar ist (Casper-Lindley *et al.*, 2001; Casper-Lindley *et al.*, 2002; Noël *et al.*, 2003). Die große Bandbreite und Diversität der T3Es lässt auf ein großes Repertoire an unterschiedlichen Funktionen schließen. Eine erste und wahrscheinlich wichtigste Aufgabe von Effektoren ist es, die Besiedelung überhaupt zu ermöglichen, also in einem ersten Schritt die PTI zu unterdrücken.

1.5.1 Unterdrückung der Abwehr durch Effektorproteine

Effektorproteine greifen an verschiedenen Stellen an, um die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken. Man spricht dabei von Zelltodsunterdrückung (CDS, *cell death suppression*). Dabei sind bisher verschiedene grundsätzliche Strategien bekannt: So inaktivieren einige Effektoren, wie z.B. HopAO1 (früher HopPtoD2), HopAI1 und HopF2 den MAP Kinase-Signalweg (Espinosa *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). HopAO1 zeigt *in vitro* Protein-Tyrosinphosphataseaktivität und kann in Tabak den durch die transiente Expression einer konstitutiv aktiven MAPKK, initiierten Zelltod unterdrücken (Espinosa *et al.*, 2003). Espinosa *et al.* zeigen in ihrer Arbeit ebenfalls, dass die Unterdrückung des durch Infektion mit *P. syringae* ausgelösten Zelltodes von der Tyrosin-Phosphataseaktivität abhängig ist.

HopAI1 inaktiviert in *Arabidopsis* eine durch PAMP-Erkennung aktivierte MAP Kinase durch das Entfernen eines Phosphatrestes durch die ihr eigene Phosphothreoninlyase-Aktivität (Zhang *et al.*, 2007). Eine physikalische Interaktion von HopAI1 mit MPK3 und MPK6 konnte gezeigt werden. Und schließlich HopF2, eine ADP-Ribosyltransferase, inhibiert die Phosphorylierung von MAP Kinasen. Eine physikalische Interaktion mit MKK5 ist essentiell für die Unterbrechung des Signalweges: HopF2 inaktiviert MKK5 und ADP-ribosyliert den C-Terminus von MKK5 *in vitro* (Wang *et al.*, 2010).

PRRs sind die erste wichtige Barriere der PTI, sie gehören daher zu den bevorzugten Zielen von T3Es. So fördert beispielsweise der Effektor AvrPtoB aus *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (PtoDC3000) in *Arabidopsis* den Abbau des Rezeptors FLS2 (Göhre *et al.*, 2008). Bereits seit einigen Jahren wird spekuliert, dass die beiden nicht homologen Effektoren

AvrPtoB und AvrPtoB relativ früh in die Signaltransduktion eingreifen, da sie viele mit der PTI verbundene Veränderungen, wie beispielsweise die durch flg22 induzierte Callosedeposition und Transkription, unterdrücken (Hauck *et al.*, 2003; He *et al.*, 2006; de Torres *et al.*, 2006). Die Untersuchung der Struktur von AvrPtoB zeigte, dass es sich um eine Ubiquitin E3 Ligase handelt, die wahrscheinlich mit der wirtseigenen Ubiquitin Maschinerie interagiert und für die Abwehr wichtige Proteine dem Abbau überführt (Janjusevic *et al.*, 2006; Abramovitch *et al.*, 2006b). Und tatsächlich bestätigte sich diese Annahme: Zu diesen Proteinen gehören neben FLS2 beispielsweise Fen aus Tomate und CERK1, das nicht, wie zuerst angenommen, nur bei der Chitin-Erkennung eine Rolle spielt (Rosebrock *et al.*, 2007; Ntoukakis *et al.*, 2009; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009). AvrPtoB ist zwischen verschiedenen Phytopathogenen, einschließlich Xanthomonaden, *Erwinia*, und in vielen Pseudomonaden, konserviert (Abramovitch *et al.*, 2003). Diese weite Verbreitung unterstreicht die wichtige Rolle, die AvrPtoB bei der Unterdrückung der wirtseigenen Abwehr einnimmt. Auch bei Säugetieren ist bekannt, dass E3 Ligasen zur Immunantwort beitragen, indem sie negative Regulatoren der PRR-Signaltransduktion degradieren und MAPKs und Transkriptionsfaktoren aktivieren (Nicaise *et al.*, 2009).

In resistenten Tomatenpflanzen werden AvrPto und AvrPtoB durch die physische Interaktion mit der Proteinkinase Pto erkannt (Abramovitch *et al.*, 2003). Dies und die Tatsache, dass AvrPto ein kleines Triple-Helix-Protein ist, und so als Kinase-Inhibitor wirken könnte, legte die Hypothese nahe, dass die eigentlichen Virulenzziele von AvrPto Kinasedomänen sind, beispielsweise die von PRR Proteinen (Xing *et al.*, 2007). Und auch für AvrPto bestätigte sich, dass es, wie AvrPtoB, an die Rezeptoren FLS2 und EFR bindet. Jedoch ist der Mechanismus der PTI-Unterdrückung hier ein anderer. *In vivo* inhibiert es Dosis-abhängig deren Autophosphorylierung (Xiang *et al.*, 2008). Entgegen früherer Annahmen ist der Korezeptor BAK1 kein direktes Ziel von AvrPto (Xiang *et al.*, 2011).

Eine weitere Strategie für Phytopathogene ist der Eingriff in die Hormon-Signalweiterleitung der Pflanze. Beispielsweise ähnelt Coronatin, ein Phytotoxin, das von einigen Pseudomonaden gebildet wird, strukturell Jasmonsäure (JA) - Derivaten. Es wird angenommen, dass Coronatin das JA-Gleichgewicht stört, indem es den JA-Signalweg imitiert und dadurch die durch SA ausgelöste Abwehrreaktion unterdrückt (Spoel und Dong, 2008).

Auch das Pflanzenhormon Auxin spielt eine Rolle bei der Pathogenität. Dass es auch ein Ziel für Effektorproteine sein kann, unterstützt die Beobachtung, dass die Überexpression von AvrRpt2, einem *P. syringae* Effektor, zu einem veränderten morphologischen Phänotyp führt,

den man von Auxin-Mutanten kannte (Chen *et al.*, 2007). Tatsächlich war in solchen Pflanzen ein erhöhter Gehalt von freier Indol-3-Essigsäure (IAA) feststellbar. Darüber hinaus führte die Zugabe von synthetischem Auxin zu verstärkter Suszeptibilität der Pflanzen gegenüber *P. syringae*, während Pflanzen mit Mutationen, die in der Auxin-Signaltransduktion beeinträchtigt sind, stärker resistent waren (Chen *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2006). Dies unterstreicht die Rolle von Auxin in der pflanzlichen Immunabwehr.

1.5.2 Induktion der spezifischen pflanzlichen Abwehr durch T3Es (ETI)

Für Pflanzen ist es essentiell, sich auch gegen besser angepasste Phytopathogene schützen zu können. Sie haben daher als weitere Stufe der pflanzlichen Abwehr Resistenzmechanismen entwickelt, heute auch als ETI (*effector triggered immunity*) bezeichnet, die Effektorproteine spezifisch erkennen können. Solche spezifischen Interaktionen sind bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts durch Harald Flor bei der Infektion von Flachs und Flachsrost beobachtet worden, was als Grundstein für die Gen-für-Gen Hypothese gilt (Flor, 1955; 1971). Diese besagt, dass für ein spezifisches Resistenzprotein (R) der Pflanze ein passendes Avirulenzprotein (Avr) existiert. Die direkte Interaktion der Beiden führt zu einer inkompatiblen Interaktion und somit zum lokalen Zelltod (HR). Fehlt einer der beiden Interaktionspartner, kann sich das Pathogen vermehren und Krankheitssymptome auslösen, man spricht von einer kompatiblen Interaktion.

Im Gegensatz zur strukturellen Diversität von T3Es, gehören die meisten Resistenzproteine zur großen Klasse der NB (*nucleotide binding site*)-LRR Resistenzproteine (Dangl und Jones, 2001). Einige dieser Rezeptoren erkennen die korrespondierenden Effektorproteine im pflanzlichen Zytoplasma durch direkte Interaktion, man spricht hier vom Rezeptor-Liganden-Modell (Jia *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006; Catanzariti *et al.*, 2010). Weiter verbreitet scheint jedoch das sogenannte Guard-Modell zu sein. Die NB-LRRs agieren als Wächter (Guardee) für wichtige Wirtsproteine. Erkennen sie eine Veränderung oder den Verlust des bewachten Proteins, wird Zelltod ausgelöst (Jones und Dangl, 2006). Das Guard-Modell hat Ähnlichkeit zu dem Konzept der bereits erwähnten DAMPs, bei dem die durch Pathogene hervorgerufene Zerstörung von Wirtsproteinen wahrgenommen wird und dies eine Immunantwort auslöst (Lotze *et al.*, 2007).

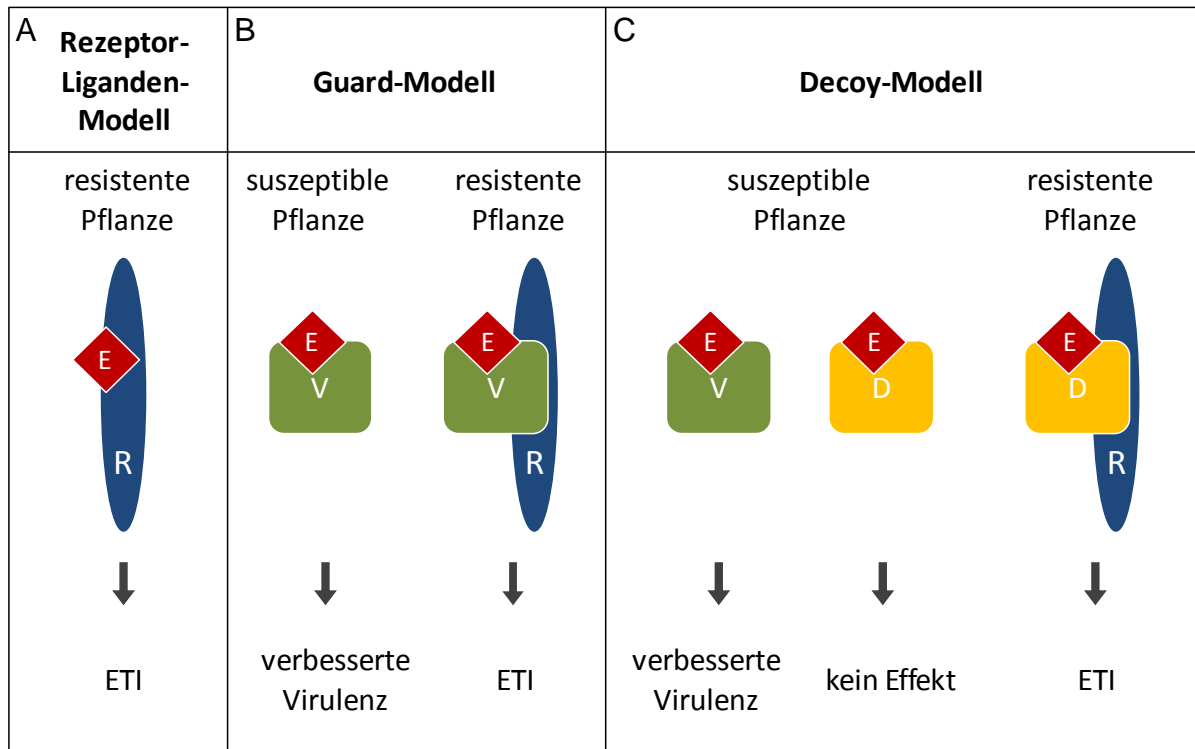


Abbildung 3: Modelle der Erkennung von Effektoren durch R-Proteine. (A) Direkte Interaktion zwischen Effektorprotein (E) und Resistenzprotein (R) führt zur spezifischen Abwehr (ETI, *effector triggered immunity*) und damit zur Resistenz der Pflanze. (B) Der Effektor bindet an sein Virulenzziel (V) und verändert es. Besitzt die Pflanze ein korrespondierendes R-Protein wird diese Veränderung erkannt und ETI wird ausgelöst. (C) Die Pflanze hat ein dem eigentlichen Virulenzziel ähnliches Protein als Decoy (D, Falle) entwickelt. Die Bindung des Effektors oder die Veränderung durch den Effektor wird in resistenten Pflanzen durch ein R-Protein erkannt und ETI wird ausgelöst. Das Pathogen hat von der Decoy-Effektor-Interaktion keinen Vorteil.

Ein klassisches Beispiel für das Guard-Modell ist die Aktivierung des Resistenzproteins RPM1 durch die Phosphorylierung des Wirtsproteins RIN4 (*RPM1 interactor 4*), einem negativen Regulator der basalen Abwehr in *Arabidopsis* (Mackey *et al.*, 2002; DeYoung und Innes, 2006). Die Phosphorylierung mit Hilfe der Proteinkinase RIPK wird durch die *P. syringae* Effektoren AvrRpm1 und AvrB ausgelöst und führt zur Resistenzreaktion (Liu *et al.*, 2011).

Eine Variation des Guard-Modells ist das Decoy-Modell. Dabei ist das bewachte Protein kein eigentliches Virulenzziel, sondern ein Köder, der ein Virulenzziel des Effektors nachahmt (Abbildung 3). Der Unterschied besteht also in erster Linie darin, ob das Pathogen von der Interaktion oder Modifikation einen Nutzen hat oder nicht (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Beispiele für dieses Modell sind die Resistenzproteine Prf und Bs3: Die T3Es AvrPto und AvrPtoB werden im Zytoplasma resistenter Tomaten von einem Komplex bestehend aus der Serin-Threonin Protein Kinase Pto und dem NB-LRR Protein Prf erkannt (Zipfel, 2009). Pto ist der Kinase Fen, einem der eigentlichen Zielproteine von AvrPtoB, sehr ähnlich und

wird durch AvrPtoB nicht abgebaut, da es dessen E3 Ligasedomäne inaktiviert (Ntoukakis *et al.*, 2009). Dieser programmierte Zelltod benötigt in Tomate und *N. benthamiana* die MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK α) als positiven Regulator und die Aktivierung eines 14-3-3 Proteins (del Pozo *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2010).

Auch der als Transkriptionsaktivator wirkende T3E AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* wird in Pflanzen mit dem Bs3-Resistengen erkannt und löst eine spezifische Abwehrreaktion aus (Bonas *et al.*, 1993). Jedoch scheint eines der eigentlichen Virulenzziele das zur Zellgrößenregulierung beitragende Protein Upa20 zu sein, dessen Transkription AvrBs3 spezifisch induziert (Kay *et al.*, 2007). Bindet AvrBs3 jedoch an den ähnlichen Promotor von *Bs3*, das für ein ungewöhnliches Resistenzprotein, eine Flavin-Monooxygenase, kodiert, wird durch dessen Expression ein schneller lokaler Zelltod ausgelöst (Römer *et al.*, 2007a).

Die Reaktion, die der Erkennung eines T3Es durch eine resistente Pflanze folgt, unterscheidet sich in vielen Punkten nicht von der PTI (Boller und Felix, 2009 und darin erwähnte Referenzen). Sie ist durch Akkumulierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), phenolischer Substanzen, antimikrobieller Proteine und Phytoalexine charakterisiert, benötigt MAPK-Kaskaden und gipfelt in lokaler Apoptose (HR) im Infektionsbereich (Park, 2005). Diese sehr starke und schnelle Zellantwort, die auch durch die Aktivierung der SA-Signaltransduktion charakterisiert ist, stellt eine extrem erfolgreiche Strategie bei der Bekämpfung von biotrophen Pathogenen dar (Glazebrook, 2005). Darüber hinaus gibt es jedoch auch SA-unabhängige Signalwege, z.B. den von EDS1 (*enhanced disease susceptibility-1*; Parker *et al.*, 1996) abhängigen Weg, der ebenfalls zur HR führt (Bartsch *et al.*, 2006). So wurde beschrieben, dass EDS1 und SA in redundanter Weise die Resistenzgen-vermittelte Signaltransduktion regulieren (Venugopal *et al.*, 2009; Straus *et al.*, 2010).

1.5.3 Unterdrückung der ETI durch Effektorproteine

Für die Pathogene ist es überlebenswichtig auch gegen diese spezifische Abwehr Strategien zu entwickeln. Einige T3Es unterdrücken speziell die ETI. Beispiele hierfür sind die *Pseudomonas*-Effektoren HopF2, HopZ1a und AvrPtoB.

Das Zielprotein von HopF2 ist beispielsweise der Guardee RIN4. Durch direkte Interaktion von HopF2 mit RIN4 wird die normalerweise durch AvrRpt2 hervorgerufene Spaltung von RIN4 unterdrückt und somit die Erkennung durch das Resistenzprotein RPS2 verhindert (Wilton *et al.*, 2010).

HopZ1a gehört zur HopZ Effektorfamilie von Cysteinproteasen und löst selbst eine spezifische Abwehrreaktion in *Arabidopsis* aus. Bemerkenswerterweise ist diese

Abwehrreaktion der Pflanze unabhängig von SA, EDS1, JA und Ethylen-abhängigen Signalwegen. Darüber hinaus reduziert HopZ1a die durch den Effektor AvrRpt2 ausgelöste Expression von PR1 und PR5 drastisch und interagiert mit den Signalwegen der durch AvrRpt2-, AvrRps4- oder AvrRpm1 ausgelösten ETI, was auf eine Virulenzfunktion hinweist (Macho *et al.*, 2010). Diese Funktion ist ebenfalls abhängig von der Cysteinproteinaseaktivität. Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt, löst AvrPtoB in Tomatenpflanzen mit dem korrespondierenden Resistenzgen *Pto* eine Resistenzreaktion aus, die Reaktion bleibt jedoch in *pto*-Pflanzen aus. Ein verkürztes Derivat von AvrPtoB ohne C-Terminus (Ligasedomäne; Abramovitch *et al.*, 2006b) war jedoch wieder in der Lage eine Abwehrreaktion in *pto*-Pflanzen hervorzurufen. Diese „neue“ Reaktion ist von einem weiteren Resistenzgen – *Rsb* – abhängig. Das Vollängenprotein AvrPtoB ist also in der Lage, die Erkennung durch *Rsb* zu unterdrücken (Abramovitch *et al.*, 2003).

So entwickeln sich in einer Art Wettrüsten der Evolution immer neue Abwehrstrategien der Pflanzen und immer neue Wege der Phytopathogene, diese Abwehr zu umgehen. Ein auf lange Sicht spannendes Thema der Forschung.

1.6 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Vertreter der Gattung *Xanthomonas* sind aerobe Gram-negative stäbchenförmige γ -Proteo Bakterien und lösen eine Vielzahl verschiedener Pflanzenkrankheiten aus. Dazu gehören beispielsweise die Weißblättrigkeit auf Reis, ausgelöst durch *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, die Adernschwärze auf verschiedenen Kohlgewächsen durch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* oder der Zitruskrebs auf verschiedenen Zitrusgewächsen durch *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* als wirtschaftlich wichtigste Vertreter. Xanthomonaden sind in der Regel durch das Pigment Xanthomonadin gelb gefärbt. Es trägt zum Schutz vor photochemischen Schäden bei und eine Verbesserung des epiphytischen Überlebens und der Infektionsrate konnte bei *Xcc* beobachtet werden (Rajagopal *et al.*, 1997; Poplawsky *et al.*, 2000). Ein wichtiger und im Hinblick auf die Pathogen-Wirts-Interaktion bereits sehr gut charakterisierter Modellorganismus ist *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*; Abbildung 4). *Xcv* persistiert an Pflanzenresten in Böden und ist auch bereits im Aerosol von Feldern nachgewiesen worden (McInnes *et al.*, 1988), wo es besonders in feuchtwarmen Gebieten und bei früher Infektion zu hohen Ernteausfällen bei Tomate und

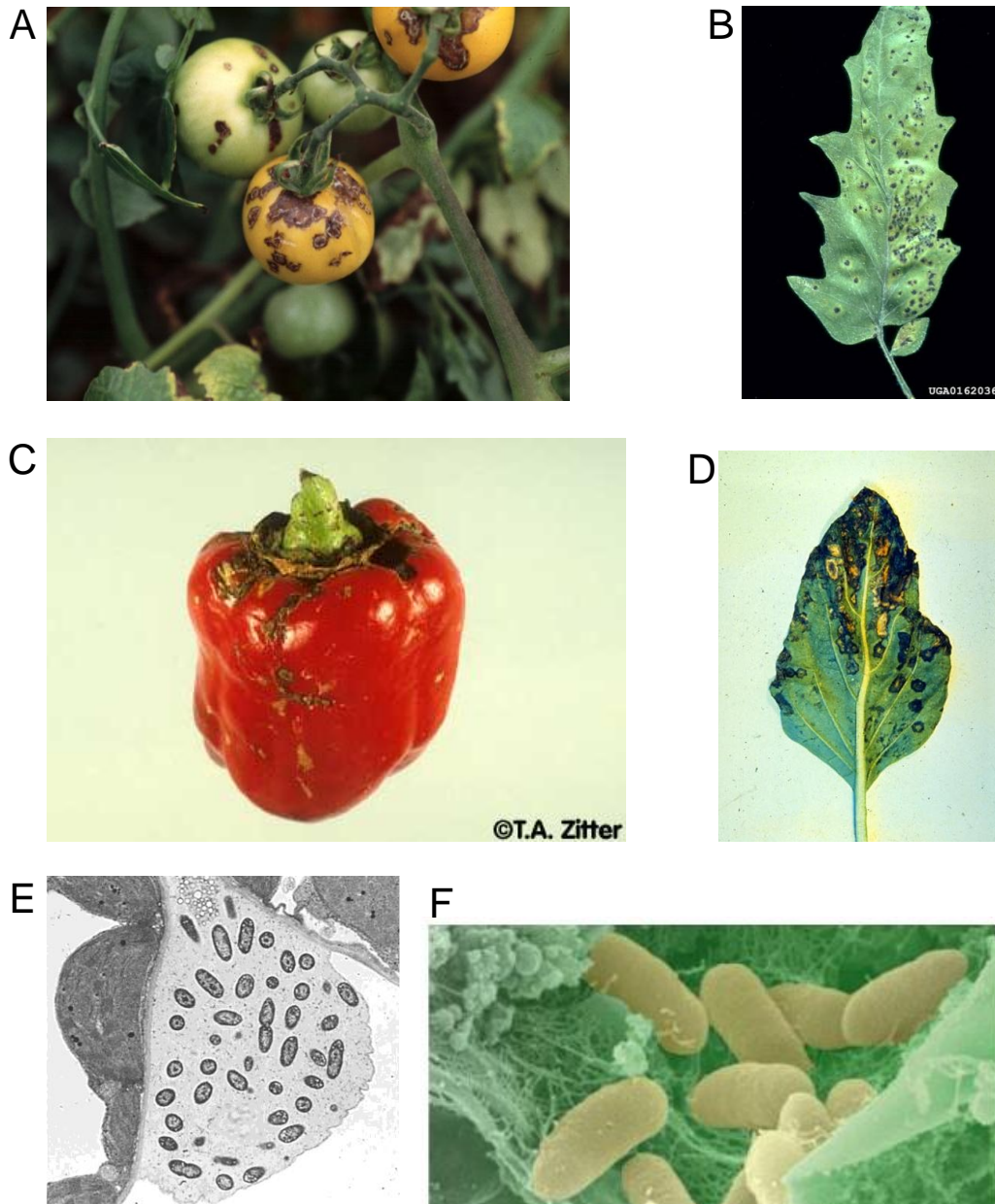


Abbildung 4: Bilder der Infektion mit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Nachdem *Xcv* in die Pflanze eingedrungen ist, kommt es zur lokalen Vermehrung im Interzellularraum (E und F zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen. F ist zur Verdeutlichung koloriert). Es kommt zur Ausbildung von wässrigen Läsionen und nekrotischen Flecken auf (A-B) Tomaten und (C-D) Paprika. (Bildquellen: (A): J. B. Jones, University of Florida, photo gallery (B, D): USDA Cooperative Extension Slide Series, (C): T. A. Zitter, Cornell University (E, F): D. Gürlebeck, G. Hause

Paprika führen kann (Dougherty, 1978; Bashan *et al.*, 1985). Bei Regen oder durch Kulturarbeiten kann *Xcv* durch Spaltöffnungen, Hythatoden oder kleine Wunden in die Pflanze eindringen und lokal Krankheitssymptome auslösen. Die Bakterien vermehren sich im Interzellularraum von suszeptiblen Pflanzen zu hohen Dichten (Abbildung 4 e, f). Die Krankheitssymptome werden anfangs als wässrige Läsionen und später als nekrotische Flecken sichtbar (Abbildung 4).

Ob die Pflanzen Krankheitssymptome ausbilden oder gesund bleiben, hängt vom Zusammenspiel der verschiedenen T3Es und pflanzlichen Rezeptoren in verschiedenen Kultivaren von Paprika oder Tomate ab. Mittlerweile sind mehr als 30 T3Es und Kandidaten in *Xcv* identifiziert worden (Tabelle 1, Bonas unveröffentlichte Daten). Die Ersten wurden aufgrund ihrer Avirulenzaktivität identifiziert, beispielsweise AvrBs1 und AvrBs3, weitere wegen ihrer Koregulation mit dem T3SS in einem cDNA-AFLP-Screen, z.B. XopJ und XopB; schließlich wurden viele Effektoren erst nach der vollständigen Sequenzierung des *Xcv*-Genoms entdeckt, beispielsweise XopG und XopE1 (Ronald und Staskawicz, 1988; Bonas *et al.*, 1989; Noël *et al.*, 2001; Thieme, 2006; Thieme *et al.*, 2007). Eine Auflistung bekannter Typ III-Effektoren aus *Xcv* ist Tabelle 1 zu entnehmen.

1.7 Vorarbeiten und Ziele der Arbeit

Vor Beginn dieser Arbeit waren 3 neue Effektorprotein-Kandidaten isoliert worden: XopG (XCV1298; Akzessionsnummer: CAJ22929), XopH (XCVd0105; Akzessionsnummer: CAJ19917) und XopI (XCV0806; Akzessionsnummer: CAJ22437). Für alle konnte gezeigt werden, dass sie ein Typ III-Sekretionssignal besitzen und somit *hrp*-abhängig sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert werden (Thieme, 2006). XopG und XopH waren aufgrund von Homologien zu bekannten Effektorproteinen HopH1 bzw. HopAO1 aus *Pseudomonas syringae* (siehe auch 1.5.1) identifiziert worden; XopG weist darüber hinaus einen stark vom Genom abweichenden GC-Gehalt auf (52.% im Vergleich zum genomweiten Durchschnitt von 64.75%) und ist durch mobile genetische Elemente und ein tRNA-Gen flankiert (Thieme *et al.*, 2005; Thieme, 2006).

XopG ist ein im Vergleich zu anderen Effektoren kleines Protein, bestehend aus 213 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom von *Xcv* kodiert und besitzt keine PIP-Box im Promotorbereich. Es ist bereits gezeigt worden, dass *xopG* unabhängig von HrpG und HrpX konstitutiv exprimiert wird (Thieme, 2006). Homologiesuchen zeigen, dass XopG Homologie zur Proteasedomäne von Neurotoxinen, wie Tetanus- und Botulinumtoxin aus *Clostridium* aufweist (Abbildung 5, Altschul *et al.*, 1997). Insbesondere ein Zinkbindemotiv mit der Konsensussequenz HE(X)₂H(X)_nEE ist zwischen Proteinen dieser Art konserviert (Abbildung 5; Lalli *et al.*, 2003). Es wird daher angenommen, dass es sich bei XopG ebenfalls um eine Zink-Metalloprotease handeln könnte (Thieme, 2006).

Tabelle 1: Bekannte Typ III-Effektorproteine aus *Xcv*.

Effektor	Homologie	Vorhergesagte Funktion und Motive	Referenzen
AvrBs1	AvrA ¹	unbekannt	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; O Garro <i>et al.</i> , 1997; Ronald und Staskawicz, 1988)
AvrBs2	UgpQ ²	Diesterase	(Kearney und Staskawicz, 1990; Swords <i>et al.</i> , 1996)
AvrBs3	AvrBs4 ³	Transkriptionsfaktor	(Bonas <i>et al.</i> , 1989; Kay <i>et al.</i> , 2007)
AvrBs4	AvrBs3 ³	Transkriptionsfaktor	(Bonas <i>et al.</i> , 1993; Gürlebeck <i>et al.</i> , 2009)
AvrBsT	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999; Escolar <i>et al.</i> , 2001; Minsavage <i>et al.</i> , 1990)
AvrRxv	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999; Whalen <i>et al.</i> , 2008)
AvrXv3	HopAF1 ¹	unbekannt	(Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a)
AvrXv4	YopJ ⁴	SUMO-Protease / Acetyltransferase C55	(Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000b; Roden <i>et al.</i> , 2004a)
HpaA		Unbekannt	(Huguet <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 2008)
XopB	HopD1 ¹	Armadillo Repeats	(Noël <i>et al.</i> , 2001); diese Arbeit
XopC		Phosphoribosyltransferase	(Noël <i>et al.</i> , 2003)
XopD	Ulp1 ⁵	SUMO-Protease, C48	(Hotson <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2008; Noël <i>et al.</i> , 2002)
XopE1	HopX ¹	N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopE2	HopX ¹	N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopF1	XopF2 ³	Unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopF2	XopF1 ³	Unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopG	HopH1 ¹	Zink-Metalloprotease	(Thieme, 2006); diese Arbeit
XopH	HopAO1 ¹	Tyrosinphosphatase	(Thieme, 2006); diese Arbeit
XopI		F-Box	(Thieme, 2006); diese Arbeit
XopJ	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopN	HopAU1 ¹	Unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopO	HopK1 ¹ AvrRps4 ¹	Unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopP		Unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopQ	HopQ1 ¹	Nukleosid Hydrolase	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Roden <i>et al.</i> , 2004b)
XopX	HopAE1 ¹	Supprimiert Abwehr in <i>N. benthamiana</i>	(Metz <i>et al.</i> , 2005)
Ecf	HopAE1 ¹	<i>early chlorosis factor</i>	(Morales <i>et al.</i> , 2005)

1 = *P. syringae*, 2 = *E. coli*, 3 = *X. campestris*, 4 = *Yersinia* spp., 5 = *Saccharomyces cerevisiae*. Die fett gedruckten Effektorproteine sind Bestandteil dieser Arbeit.

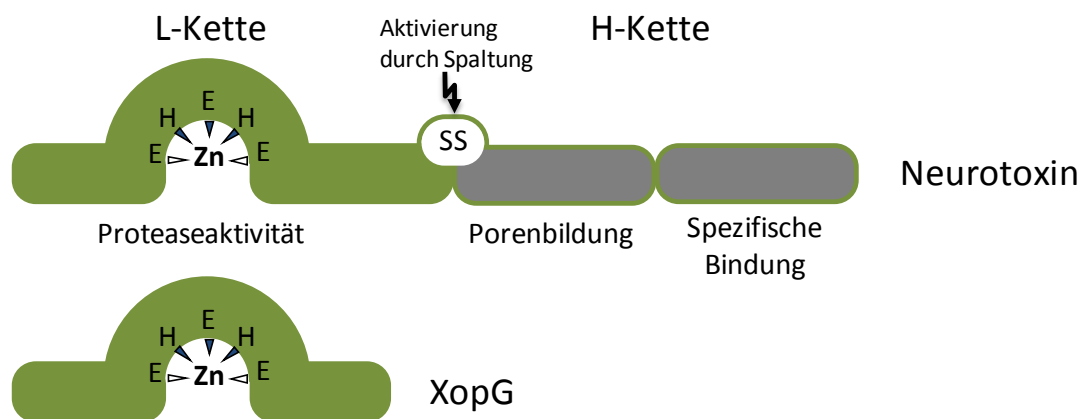


Abbildung 5: XopG hat ein Zink-Bindemotiv und ist homolog zur Proteasedomäne von Neurotoxinen. Neurotoxine setzen sich aus einer schweren (H) und einer leichten (L) Kette zusammen. Die L-Kette beherbergt das Zink-Bindemotiv und besitzt Proteaseaktivität. Die H-Kette, die später abgespalten wird, besteht aus einer Domäne, die die spezifische Bindung an Nervenzellen vermittelt und einer Domäne, die für die Porenbildung verantwortlich ist. Verbunden sind beide Ketten durch eine Disulfidbrücke (SS). XopG ist homolog zur Proteasedomäne der Neurotoxine und besitzt ebenfalls ein Zink-Bindemotiv mit den konservierten Aminosäuren HE--H---//---EE.

XopH ist auf dem größten Plasmid von *Xcv* 85-10 (pXCV183) kodiert, direkt stromaufwärts des Effektorgens *avrBs1*, besitzt eine PIP-Box im Promotorbereich und ist ebenfalls von mobilen Elementen flankiert (Thieme *et al.*, 2005). Blast-Analysen haben gezeigt, dass es XopH-Homologe in vielen Pseudomonaden und Xanthomonaden gibt (NCBI; Altschul *et al.*, 1997). In Vorarbeiten ist gezeigt worden, dass *xopH* HrpG- und HrpX-abhängig induziert exprimiert wird (Thieme, 2006). XopH ist ein Effektorprotein mittlerer Größe und besteht aus 356 Aminosäuren. Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab eine Homologie zu Tyrosinphosphatasen, denen ein konserviertes aktives Zentrum mit der Konsensussequenz HC(N)₂G(N)₂RT eigen ist (Hallé *et al.*, 2007). Vor kurzem konnte für XopH, wie bereits zuvor für das homologe Effektor HopAO1 aus *P. syringae* pv. *tomato*, eine Tyrosinphosphataseaktivität nachgewiesen werden (Espinosa *et al.*, 2003; Bretz *et al.*, 2003; Potnis *et al.*, 2012). Ein Ausschnitt des Alignments von XopH und HopAO1 mit dem aktiven Zentrum ist in Abbildung 12 dargestellt.

XopI ist ein im Vergleich zu anderen Effektoren größeres Protein, bestehend aus 451 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom von *Xcv* kodiert und besitzt eine PIP-Box im Promotorbereich. Die Expression von *xopI* wird HrpG- und HrpX-abhängig induziert (Thieme, 2006). XopI konnte aufgrund des Vorkommens eines eukaryotischen Motivs, der F-Box, identifiziert werden (Thieme, 2006). Die F-Box wurde in eukaryotischen Proteinen nachgewiesen, die Teil des Ubiquitin-Proteasoms sind (Ho *et al.*, 2008). Außerdem wurden 4

Sequenzwiederholungen (*Repeats*) vorhergesagt (Thieme, 2006, Abbildung 6). Diese *Repeat*-Strukturen könnten mögliche Interaktionsflächen der direkten Interaktion von XopI mit Proteinen sein. Es wurde daher spekuliert, dass XopI zur Steigerung der Virulenz von *Xcv* in die Proteindegradation der Wirtspflanze eingreift, indem es ein bestimmtes Protein zum SCF-Komplex (Skp1/Cullin/F-Box Protein; (Ho *et al.*, 2008) rekrutiert (Thieme, 2006).

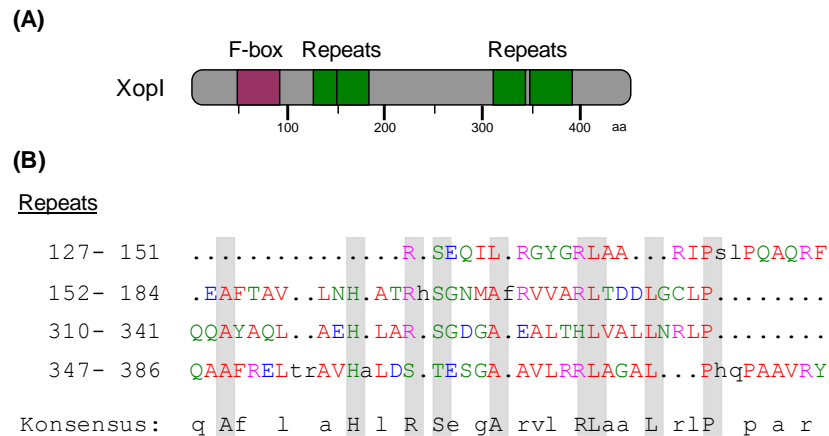


Abbildung 6: Struktur von XopI. (A) XopI besteht aus 450 Aminosäuren und hat eine vorhergesagte F-Box (lila, aa 47-96) und *Repeat*-Strukturen (grün). (B) Alignment der vorhergesagten *Repeats* (RADAR, <http://www.ebi.ac.uk/Radar/>). Grau unterlegt sind die in mindestens drei *Repeats* übereinstimmenden Aminosäuren.

Ziel dieser Arbeit war es, die drei genannten Effektorproteine XopG, XopH und XopI phänotypisch und molekular zu charakterisieren. Später sollte sich, je nach Verlauf der Experimente, auf die molekulare und funktionelle Charakterisierung eines Kandidaten konzentriert werden. Hier war es zunächst interessant, mögliche Phänotypen der Effektoren aufzuspüren und anschließend die Zielkompartimente in der Pflanzenzelle zu identifizieren, um Hinweise auf die Funktion des entsprechenden Effektors in der Pflanze und den möglichen Wirkort in der Pflanzenzelle zu erhalten. Anschließend sollte nach pflanzlichen Zielproteinen mittels Hefe-2-Hybrid Screening gesucht und versucht werden, Interaktionen in der Pflanze zu verifizieren. Schließlich war es Ziel, einen möglichen Einfluss einzelner Interaktoren auf die Aktivität des Effektors in der Pflanze durch Gen-*Silencing*-Experimente zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien, Medien und Antibiotika

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Die Kultivierung des Bakteriums *Escherichia coli* erfolgte in LB Medium (Bertani, 1951; Miller, 1972) bei 37°C. Transformierte *E. coli* Zellen wurden zuerst im nährstoffreicheren SOC Medium (Invitrogen) aufgenommen. Das Einbringen von Plasmiden erfolgte bei *E. coli* und *Agrobacterium* durch Elektroporation, bei *Xanthomonas* durch Konjugation (Triparentales Mating) unter Verwendung des Helferplasmids pRK2013 (Figurski und Helinski, 1979). *Xanthomonas*-Stämme wurden in NYG Medium (Daniels *et al.*, 1984) bei 30°C angezogen. Die Kultivierung von Agrobakterien erfolgte ebenfalls bei 30°C in YEB-Medium (Vervliet *et al.*, 1975). Um feste Medien zu erhalten wurde jeweils 1.5% Agar zugesetzt bzw. 1% für die Konjugationsexperimente.

Zum Lagern bei –80°C wurde dem jeweiligen Medium DMSO in einer Endkonzentration von 7% zugegeben. Die Bakterien wurden mit folgenden Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen selektiert:

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin (Ap)	100 µg/ml in festen Medien 50 µg/ml in flüssigen Medien
Gentamycin (Gm)	15 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	25 µg/ml
Rifampicin (Rf)	100 µg/ml
Spectinomycin (Sm)	100 µg/ml

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

Organismus	relevante Eigenschaften	Referenzen
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(araleu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für die Konjugation; enthält Plasmid mit <i>tra</i> -Funktion	(Boyer und Roulland- Dussoix, 1969)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
DB 3.1	F- <i>gyr462 endA</i> $\Delta(sr1-recA)$ <i>mcrB mrr</i> <i>hsdS20</i> (rB-, mB-) <i>supE44 ara14 galK2</i> <i>lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl5 λ- leu mtl1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Paprika-Tomatenrasse 2; Wildtyp; trägt <i>avrBs1</i> ; Rif ^r	(Canteros, 1990)
<i>Xcv</i> 85-10 $\Delta xopG$	genomische <i>xopG</i> -Mutante, 201 bp mit Teil des Promotors und nt 1-56 von <i>xopG</i> wurden deletiert, Rif ^r	diese Arbeit
<i>Xcv</i> 85-10 $\Delta xopH$	genomische <i>xopH</i> -Mutante, 580 bp kodierend für die Aminosäuren 1-194 wurden deletiert, Rif ^r	diese Arbeit
<i>Xcv</i> 85-10 $xopH^{-}$	genomische <i>xopH</i> -Mutante, Frameshift, der zu frühem Stop nach Aminosäure 4 führt, Rif ^r	diese Arbeit
<i>Xcv</i> 85-10 $\Delta xopI$	genomische <i>xopI</i> -Mutante, Deletion von Start bis Stop, Rif ^r	diese Arbeit
<i>Xcv</i> 85-10 $\Delta xopB$	genomische <i>xopB</i> -Mutante, Deletion von <i>xopB</i> , Rif ^r	(Noël <i>et al.</i> , 2001)
<i>Xcv</i> 85-10 $\Delta xopB$ <i>xopH^{-}</i>	Kombination von Deletion von <i>xopB</i> und <i>frameshift</i> in <i>xopH</i> , Rif ^r	diese Arbeit
85*	85-10-Derivat mit <i>hrpG</i> *-Mutation, woraus konstitutive Expression der <i>hrp</i> -Gene resultiert, Rif ^r	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1996; Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
<i>Xcv</i> 85* $\Delta hrcV$	Deletion in <i>hrcV</i> ; T3SS defizient, Rif ^r	

85-10 Δ <i>hpaB</i>	<i>hrpB</i> -Deletionsmutante von 85-10; 420 bp kodierend für die Aminosäuren 13-149 von HrpB wurden deletiert, Rif ^r	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
82-8	Paprika-Tomatenrasse 1; Wildtyp; trägt <i>avrBs3</i> und <i>avrBs4</i> ; Rif ^r	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
82*	82-8 Derivat mit <i>hrpG</i> *-Mutation, woraus konstitutive Expression der <i>hrp</i> -Gene resultiert, Rif ^r	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
75-3	Tomatenrasse 1, Wildtyp; Rif ^r	(Minsavage <i>et al.</i> , 1990)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Gm ^r , Rif ^r	(Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)

2.2 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

In dieser Arbeit wurden die Paprikapflanzen *Capsicum annuum* der Kulturvarietät Early Californian Wonder (ECW) und verschiedene nahezu isogene Linien verwendet, in die jeweils ein Resistenzgen eingekreuzt worden ist: ECW, ECW-10R (*Bs1*), ECW-20R (*Bs2*) und ECW-30R (*Bs3*) (Minsavage *et al.*, 1990; Kousik und Ritchie, 1998). Die Pflanzen wurden bei 26 °C, einer relativen Luftfeuchte von 65 % und einer 16-stündigen Lichtperiode im Gewächshaus angezogen (Bonas *et al.*, 1991).

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) der Kulturvarietät Moneymaker, *N. benthamiana*, Bs2-transgene *N. benthamiana* (Leister *et al.*, 2005), N-transgene *N. benthamiana* Linie 310A (Bendahmane *et al.*, 1999), *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicandra physaloides*, *Petunia spec.*, *Physalis alkekengi*, *Physalis peruviana*, *Solanum americanum*, *Solanum nigrum*, *Solanum pseudocapsicum*, *Solanum suaveolens* und *Solanum tuberosum* mit Agrobakterien oder *Xanthomonas*-Stämmen inokuliert. Diese Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 25°C und 60 % relative Luftfeuchte am Tag und 19°C und 40 % relative Luftfeuchte in der Nacht angezogen.

2.3 Inokulation von Pflanzen mit Bakterienstämmen

Für die Inokulationen wurden *Xanthomonas*-Stämme frisch auf NYG-Agar ausgestrichen und nach 2-tägigem Wachstum in 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf Konzentrationen zwischen 1 x 10⁶ cfu/ml (OD₆₀₀ = 0,001) und 4 x 10⁸ cfu/ml (OD₆₀₀ = 0,4) eingestellt. Die Infiltration erfolgte in vollständig entwickelte Blätter der zu

testenden Pflanzen. Die Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer kanülenlosen 1 ml Einwegspritze durch leichten Druck in die Blattunterseite in den Apoplasten inokuliert. Infizierte Pflanzen wurden in eine Phytokammer überführt (Series 101, Percival Scientific), in der 28 °C am Tag und 26 °C in der Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von 80% herrschten. Agrobakterien wurden über Nacht in flüssigem YEB-Medium unter Verwendung der entsprechenden selektiven Antibiotika angezogen, vom Medium durch Zentrifugation getrennt und in Infiltrationsmedium (20 mM Zitronensäure, 2 % Saccharose, pH 5,2; 200 µm Acetosyringon; (Chung *et al.*, 2004) auf die gewünschte OD₆₀₀ (0,1-1) eingestellt. Pflanzen die mit *Agrobacterium* inokuliert wurden, verblieben im Gewächshaus. Hypersensitive Reaktionen waren 1-3 Tage nach Inokulation sichtbar. Die HR ist durch eine bräunliche Verfärbung und Kollaps des Blattgewebes sowie eine deutliche Abgrenzung des infiltrierten Bereiches erkennbar. Krankheitssymptome wurden über einen längeren Zeitraum beobachtet.

Für die Analyse der Zelltodspressionen wurden jeweils 2 Agrobakterienstämme koinfiltriert. Agrobakterienstämme, die 35S-*avrBs3*, 35S-*avrB*, 35S-*avrRxv*, 35S-*xopG* oder 35S-*xopJ* in die Pflanze übertragen, wurden mit einer finalen Bakteriendichte von 4×10^8 cfu/ml inokuliert, und Stämme, die 35S-*xopH*, 35S-*xopB*, 35S-*hopD1* und deren Derivate übertragen, mit einer finalen Bakteriendichte von 6×10^8 cfu/ml. Für die Unterdrückung der relativ schnellen und starken AvrBsT-HR wurden die Bakteriendichten zur besseren Visualisierung des Suppressionseffekts angepasst. *Agrobacterium*, das 35S-*avrBst* überträgt, wurde mit einer Dichte von 3×10^8 und *Agrobacterium*, das 35S-*xopB* überträgt, mit einer Dichte von 7×10^8 inokuliert.

Nach deutlicher Ausprägung der Phänotypen wurden die Blätter entweder bei Tageslicht fotografiert oder zur besseren Visualisierung der Phänotypen abgetrennt und in Ethanol mindestens 4 h bei 65 °C gebleicht. Um die bei der HR entstehenden phenolischen Substanzen sichtbar zu machen, wurden Blätter unter UV-Licht fotografiert (Park, 2005).

Für *in planta*-Wachstumskurven wurden Bakterien mit einer Konzentration von 10^4 cfu/ml in Blätter von ECW-Paprikapflanzen inokuliert. Die Bestimmung des bakteriellen Wachstums erfolgte wie zuvor beschrieben (Bonas *et al.*, 1991), die Zerkleinerung der Blattscheiben erfolgte mit einer Kugelmühle (Rentsch GmbH, Haan, Germany) in 100 µl 10 mM MgCl₂ bei 30 Hz für 40 Sekunden. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Für die Translokationsexperimente wurden die Bakterien mit 4×10^8 cfu/ml wie zuvor beschrieben in die Blätter infiltriert (Noël *et al.*, 2003).

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	Km	Erstellen von genomischen Deletionsmutanten in <i>Xcv</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobsacB</i> :: Δ xopG	Km	zur Erstellung der <i>xopG</i> -Deletionsmutante, 2.7Kb EcoRV-Fragment in SmaI-sites kloniert	diese Arbeit
pK18 <i>mobsacB</i> :: Δ xopH	Km	zur Erstellung der <i>xopH</i> -Deletionsmutante	diese Arbeit
pK18 <i>mobsacB</i> ::xopH ⁻	Km	zur Erstellung der <i>xopH</i> - <i>early stop</i> Mutante	diese Arbeit
pK18 <i>mobsacB</i> :: Δ xopI	Km	zur Erstellung der <i>xopI</i> -Deletionsmutante	diese Arbeit
pENTR/D-Topo	Km	Entry-Vektor, zur Klonierung von PCR-Produkten (attL flankiert)	Invitrogen, Karlsruhe, D
pENTR/D-xopG _{rev}	Km	volle Länge, ohne Stop, für C-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-xopG _{Stop}	Km	volle Länge, mit Stop, für N-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-xopH _{rev}	Km	volle Länge, ohne Stop, für C-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-xopH _{Stop}	Km	volle Länge, mit Stop, für N-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-xopI _{rev}	Km	volle Länge, ohne Stop, für C-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-xopI _{Stop}	Km	volle Länge, mit Stop, für N-terminale Fusionen	diese Arbeit
pENTR/D-F-Box	Km	F-Box-Fragment ohne <i>Repeats</i> , als Köder im Y2H	diese Arbeit
pENTR/D-I-rep	Km	<i>Repeat</i> -Fragment, als Köder im Y2H	diese Arbeit
pENTR/D-xopB	Km	volle Länge, ohne Stop, für C-terminal Fusionen	C. Caldana, U.Bonas unveröffentlicht
pENTR/D-SPRY	Km	volle Länge, ohne Stop	diese Arbeit
pENTR/D-RRM	Km	volle Länge, ohne Stop	diese Arbeit
pENTR/D-SPRY1	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-SPRY2	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-RRM1	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
pENTR/D-Bip5	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-Bip22	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-Bip23	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-Bip27	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pENTR/D-Bip30	Km	Fragment für <i>Silencing</i>	diese Arbeit
pDGW4M	Cm, Sm	<i>Gateway</i> [®] -kompatibles <i>pDSK602-Derivat</i> <i>triple lacUV5:attR::4 x c-myc</i>	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008)
pDGW4M- <i>xopG</i>	Sm	zur Expression von <i>XopG</i> in <i>Xcv</i> mit 4 x c-myc	diese Arbeit
pDGW4M- <i>xopH</i>	Sm	zur Expression von <i>XopH</i> in <i>Xcv</i> mit 4 x c-myc	diese Arbeit
pDGW4M- <i>avrBs1</i>	Sm	zur Expression von <i>AvrBs1</i> in <i>Xcv</i> mit 4 x c-myc	diese Arbeit
pDGW4M- <i>xopI</i>	Sm	zur Expression von <i>XopI</i> in <i>Xcv</i> mit 4 x c- myc	diese Arbeit
pGWB17	Km, Hyg, Cm	35S:attR::4xmyc	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
pGWB18	Km, Hyg, Cm	35S:4xmyc::attR	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
pGWB17- <i>xopG</i>	Km, Hyg	35S: <i>xopG</i> ::4xmyc	diese Arbeit
pGWB18- <i>xopG</i>	Km, Hyg	35S:4xmyc:: <i>xopG</i>	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopH</i>	Km, Hyg	35S: <i>xopH</i> ::4xmyc	diese Arbeit
pGWB18- <i>xopH</i>	Km, Hyg	35S:4xmyc:: <i>xopH</i>	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopI</i>	Km, Hyg	35S: <i>xopI</i> ::4xmyc	diese Arbeit
pGWB18- <i>xopI</i>	Km, Hyg	35S:4x myc:: <i>xopI</i>	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopH</i> _{H266A, C267A}	Km, Hyg	35S: <i>xopH</i> _{H266A,C267A} ::4x myc	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopH</i> _{C267A}	Km, Hyg	35S: <i>xopH</i> _{C267A} ::4x myc	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopH</i> _{C267S}	Km, Hyg	35S: <i>xopH</i> _{C267S} ::4xmyc	diese Arbeit
pGWB15- <i>xopB</i>	Km, Hyg	35S:4xHA:: <i>xopB</i> , für Suppressions- experimente genutzt	Camila Caldana, unveröffentlicht
pGWB17- <i>avrRxv</i>	Km, Hyg	35S: <i>avrRxv</i> ::4x myc	diese Arbeit
pGWB17- <i>xopD</i>	Km, Hyg	35S: <i>xopD</i> ::4x myc	diese Arbeit
pGWB5- <i>XopJ</i>	Km, Hyg	35S: <i>xopJ</i> :: <i>gfp</i>	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pVS4- <i>avrBst</i>	Km	Derivat von pBI1.4 1x myc	(Escobar <i>et al.</i> ,

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
			2001)
pGWB2-avrBs1	Km, Hyg	35S: <i>avrBs2</i>	(Gürlebeck <i>et al.</i> , 2009)
pGWB6-xopC	Km, Hyg	35S: <i>gfp::xopC</i>	Büttner D., unveröffentlicht
pK7FWG2-xopE1	Km, Sm	35S: <i>xopE1::gfp</i>	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pGWB5-xopE2	Km, Hyg	35S: <i>xopE2::gfp</i>	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pGWB20-xopF	Km, Hyg	35S: <i>xopF::10× c-Myc</i>	Thieme F., Bonas U., unveröffentlicht
pVSF300	Km, Hyg	35S: <i>avrBs3</i> in pVB60	(Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996)
pVS200F	Km, Hyg	30S: <i>avrBs4</i> in pVB60	(Ballvora <i>et al.</i> , 2001)
pMB-TMV p50	PPT	35S: <i>TMV p50</i>	(Erickson <i>et al.</i> , 1999)
pMD1-avrBs2	Km	35S: <i>avrBs2</i>	(Tai <i>et al.</i> , 1999)
pGWB20-hpaA	Km, Hyg	C-terminal 10 x myc	M. Egler, U. Bonas unveröffentlicht
pGWB5-Bs3	Km, Hyg	35S: <i>bs3::gfp</i>	(Römer <i>et al.</i> , 2007a)
pGWB1-Bs3	Km, Hyg	native Promotor: <i>bs3</i>	(Römer <i>et al.</i> , 2007a)
pGWB17-HopD1 _{pag}	Km, Hyg	35S: <i>hopD1_{pag}:4x myc</i>	diese Arbeit
pGWB17-HopD1m _{pag}	Km, Hyg	35S: <i>hopD1_{pag}::4x myc</i>	diese Arbeit
pNESI-GW	Km, Hyg, Cm	pGWB5-Derivat; 35S:NES:: <i>attR</i> ::GFP	S. Schornack, unveröffentlicht
pINES-GW	Km, Hyg, Cm	pGWB5-Derivat; 35S: <i>attR</i> ::NES:: GFP	S. Schornack, unveröffentlicht
pNESI-xopG	Km, Hyg	35S:NES:: <i>xopG</i> ::GFP	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
pNESI-xopH	Km, Hyg	35S:NES:: <i>xopH</i> ::GFP	diese Arbeit
pINES-xopG	Km, Hyg	35S: <i>xopG</i> ::NES::GFP	diese Arbeit
pINES-xopH	Km, Hyg	35S: <i>xopH</i> ::NES::GFP	diese Arbeit
pK7WGF2	Km, Sm, Cm	35S:eGFP::attR, für transiente Expression von GFP-Fusionen mittels <i>Agrobacterium</i>	(Karimi <i>et al.</i> , 2002)
pK7FWG2	Km, Sm, Cm	35S:attR::GFP, für transiente Expression von GFP-Fusionen mittels <i>Agrobacterium</i>	(Karimi <i>et al.</i> , 2002)
pK7WGF2-xopG _{Stop}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopG</i>	diese Arbeit
pK7FWG2-xopG	Km, Sm	35S: <i>xopG</i> ::eGFP	diese Arbeit
pK7WGF2-xopG _{ΔN51}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopG</i> _{ΔN51}	diese Arbeit
pK7WGF2-xopG _{N107}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopG</i> _{N107}	diese Arbeit
pK7FWG2-xopG _{N107}	Km, Sm	35S: <i>xopG</i> _{N107} ::eGFP	diese Arbeit
pK7WGF2-xopG _{C106}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopG</i> _{C106}	diese Arbeit
pK7FWG2-xopG _{Sig}	Km, Sm	35S: <i>xopG</i> _{Sig} ::eGFP	diese Arbeit
pK7WGF2-xopG _{Sig}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopG</i> _{Sig}	diese Arbeit
pK7WGF2-xopH _{Stop}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopH</i>	diese Arbeit
pK7FWG2-xopH	Km, Sm	35S: <i>xopH</i> ::eGFP	diese Arbeit
pK7WGF2-xopI _{Stop}	Km, Sm	35S:eGFP:: <i>xopI</i>	diese Arbeit
pK7FWG2-xopI	Km, Sm	35S: <i>xopI</i> ::eGFP	diese Arbeit
pK7FWG2-xopB	Km, Sm	35S: <i>xopB</i> ::eGFP	diese Arbeit
pK7FWG2-HopD1 _{Pag}	Km, Sm	35S: <i>hopD1</i> _{Pag} ::eGFP	diese Arbeit
pK7FWG2-HopD1 _{Pag}	Km, Sm	35S: <i>hopD1</i> _{Pag} ::eGFP	diese Arbeit
pBIN20-ER-mCherry	Km	ER-Fluoreszenzmarker	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
pBIN20-Golgi-mCherry	Km	Golgi-Apparat-Fluoreszenzmarker	(Nelson <i>et al.</i> , 2007)
pSPYNE-35S-GW	Km, Cm	35S:attR:: <i>c-myc-YN</i> , Derivat von pSPYNE (Walter <i>et al.</i> , 2004), attR kloniert <i>XbaI/XhoI</i> in MCS von pSPYNE	(Schornack, 2006)
pSPYCE-35S-GW	Km, Cm	35S:attR:: <i>HA-YC</i> , Derivat von pSPYCE (Walter <i>et al.</i> , 2004), attR kloniert <i>XbaI/XhoI</i> in MCS von pSPYCE	(Anand <i>et al.</i> , 2007)
pSPYNE-xopG	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-xopH	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-LaminC	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
pSPYCE-xopG	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-xopH	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-LaminC	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-WRKY1	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-LeArcA1	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-Kinase	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-WRKY1	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-LeArcA1	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-Kinase	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-SPRY	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYNE-RRM	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-SPRY	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pSPYCE-RRM	Km	BiFC-Konstrukt	diese Arbeit
pGBKT7	Km, Cm	ADH1:GAL4-BD-myc::MCS	Clontech
pGBKT7-LamC	Km	LaminC, Spezifitätskontrolle für Interaktionen in Hefe	Clontech
pGBST7	Sm, Cm	pGBKT7-Derivat mit attR-Kassette und Sm-Resistenz	O. Kirchner und U. Bonas unveröffentlicht
pGBST7-xopG	Sm	volle Länge Konstrukt als Köder im Hefe-2-Hybridscreen	diese Arbeit
pGBST7-xopG _{mut}	Sm	volle Länge Konstrukt als Köder im Hefe-2-Hybridscreen	diese Arbeit
pGBST7-xopH	Sm	volle Länge Konstrukt als Köder im Hefe-2-Hybridscreen	diese Arbeit
pGBST7-xopI	Sm	volle Länge Konstrukt als Köder im Hefe-2-Hybridscreen	diese Arbeit
pGBST7-F-Box	Sm	codiert für N-terminale 127 AS von XopI	diese Arbeit
pGBST7-I-rep	Sm	codiert für C-terminale 347 AS von XopI	diese Arbeit
pGBST7-xopB	Sm	volle Länge Konstrukt als Köder im Hefe-2-Hybridscreen	diese Arbeit
pGADT7	Amp	ADH1:GAL4-AD-HA	Clontech
pGADT7-LamC	Amp	LaminC, Spezifitätskontrolle für Interaktionen in Hefe	diese Arbeit
pGAD-xopG	Amp	volle Länge, für Interaktionsstudien	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Verwendungszweck	Referenz
pGAD-xopG _{E174A}	Amp	volle Länge, für Interaktionsstudien	diese Arbeit
pGAD-xopB	Amp	volle Länge, für Interaktionsstudien	diese Arbeit
pGADT7-Int124	Amp	cDNA-Fragment, das für Interaktor mit SPRY-Domäne kodiert	diese Arbeit
pGADT7-SPRY	Amp	Interaktor mit SPRY-Domäne in voller Länge	diese Arbeit
pTRV1	Cm	Teil des TRV Genoms für <i>Silencing</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2002)
pTRV2a	Cm, Amp	Derivat von pTRV2 (Liu <i>et al.</i> , 2002) mit zusätzlicher Ampicillinresistenz	T. Lahaye, P. Römer unveröffentlicht
pTRV2a-SPRY1	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-SPRY2	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-RRM1	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-Bip5	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-Bip22	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-Bip23	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-Bip27	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit
pTRV2a-Bip30	Amp	Fragment für VIGS	diese Arbeit

2.4 Gen-Silencing von Beuteproteinen in Paprika und *N. benthamiana*

Für das Stilllegen von Genen in der Pflanze wurde Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) mit dem Tabakmosaikvirus (*tobacco rattle virus*, TRV) durchgeführt (Liu *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004). Dieses basiert auf der Verwendung von 2 Plasmiden (pTRV1 und pTRV2a; Tabelle 3), die jeweils Teile des TRV-Genoms enthalten. Erst bei gemeinsamer Expression der Gene in einer Pflanzenzelle entsteht ein infektiöser Virus. Fragmente von 400-500 bp Länge des jeweiligen stillzulegenden Gens wurden in *antisense* Orientierung in pENTRD-Topo kloniert und anschließend durch Rekombination in den Vektor pTRV2a integriert. Die so entstandenen Plasmide wurden in *Agrobacterium* transformiert. Die Infiltration für das *Silencing* erfolgte in ca. 3-4 Wochen alte Pflanzen (*C. annuum* oder *N. benthamiana*) mit einem 1:1 Gemisch aus Agrobakterien OD₆₀₀=0,8, die entweder pTRV2a mit dem jeweiligen *Silencing*-Fragment übertragen oder pTRV1. Als *Silencing*-Kontrolle diente ein Fragment der Phytoendesaturase (PDS) aus *N. benthamiana*, dessen *Silencing* zu einem lichtabhängigen

Ausbleichen der Blätter TRV-infizierter Pflanzen führt (Liu *et al.*, 2002). Dies gibt einen Hinweis darauf, wann das Silencing etabliert ist, und mit der Inokulation der Effektoren begonnen werden kann. Insgesamt wurde wie zuvor bei Chung *et al.*, 2004 beschrieben vorgegangen. Als guter Zeitpunkt für die Inokulation stellte sich 3 Wochen nach der Infiltration der *Silencing*-Konstrukte heraus.

2.5 Erzeugen von Effektor-Deletionsmutanten

Um eine Deletionsmutante der Effektors *XopI* zu erstellen, wurden die *xopI*-flankierenden genomischen Bereiche von ca. 1kb Länge mittels PCR aus dem *Xcv* Stamm 85-10 amplifiziert und nebeneinander in die *HindIII/EcoRI*-Stellen des Suizidplasmids *pK18mob::sacB* kloniert. Das entstandene Konstrukt *pK18mobsacB::ΔxopI* wurde in *Xcv* 85-10 und 85* konjugiert und die Deletion durch zweifache Rekombinationsereignisse in das Genom integriert, wodurch *xopI* in voller Länge deletiert wurde. Die so entstandenen potentiellen *Xcv* 85-10 Δ *xopI*-Deletionsmutanten wurden wie zuvor beschrieben analysiert (Huguet *et al.*, 1998). Es wurden bei allen in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten zunächst jeweils drei unabhängige Deletionsmutanten analysiert. Verhielten sich diese identisch, wurde für weitere Experimente ein Stamm ausgewählt.

Um eine Deletionsmutante des Effektors *XopH*, *Xcv* 85-10 Δ *xopH*, zu erhalten, wurde wie für *XopI* beschrieben vorgegangen, mit dem Unterschied, dass, um den potentiellen Promotor des im Genom stromabwärts von *XopH* kodierten Effektors *AvrBs3* zu erhalten, nur der 5'-Bereich des *xopH* Gens (1-580) deletiert wurde (*pK18mobsacB::ΔxopH*). Zusätzlich wurde in gleicher Weise eine frameshift-Mutante, die gleichzeitig zu einem frühen Stop nach 4 Aminosäuren führt, erstellt (*pK18mobsacB::xopH^F*). Hierbei wurde ebenfalls eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle integriert, die eine einfache Suche nach Mutanten durch Restriktionsverdau ermöglichte. Die Mutation wurde neben *Xcv* 85-10 auch in *Xcv* 85-10 Δ *xopB* eingeführt, um mögliche kumulative Effekte beider HR-Suppressoren zu untersuchen. Alle genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle X aufgelistet.

Zum Erstellen der genomischen *XopG*-Mutante *Xcv*85-10 Δ *xopG*, wurde von einem Cosmid (*pTrueBlue rop*) welches ein 8 kb-DNA-Fragment aus *Xcv*85-10 enthielt, ein 2,7 kb großes *EcoRV*-Fragment mit *xopG*, ausgeschnitten und in die *SmaI*-Stellen von *pK18mob::sacB* kloniert. Anschließend wurde das Plasmid mit *XhoI* verdaut und religiert, wodurch ein 201 bp Fragment entfernt wurde, das die ersten 56 Nukleotide von *xopG* mit einschließt. Dies resultierte im Konstrukt *pK18mobsacB::ΔxopG*. Die Integration der Deletion in das Genom von 85-10 und 85* erfolgte wie zuvor beschreiben.

2.6 Erstellen von AvrBs3 Δ 2 Fusionsproteinen

Um translationale Fusionen mit *avrBs3 Δ 2* zu erstellen, wurden die Promotoren und 5' kodierenden Sequenzen der *xop* Gene per PCR von genomischer *Xcv* 85-10 - DNA amplifiziert, in pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) kloniert und in pL6GW356 rekombiniert. Die PCR Produkte enthielten entsprechend die ersten 156 Codons von *xopK* und 1008 bp Sequenz stromaufwärts, die ersten 152 Codons von *xopR* und 998 bp Sequenz stromaufwärts und die ersten 157 Codons von *xopS* und 1041 bp Sequenz stromaufwärts. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang in Tabelle A1 angegeben.

2.7 Generierung von Expressions- und Fluoreszenz-Fusionskonstrukten für die Expression und Lokalisierung von Proteinen *in planta*.

Um Expressionskonstrukte und translationale Fusionen mit GFP zu erhalten, wurden die Gene von *xopG*, *xopH*, *xopI*, *xopB*, *hopD1* und ihre Derivate sowie die Gene verschiedener in den Y2H-Sichtungen isolierter Beuteproteine mit und/oder ohne Stop-Codon von genomischer DNA von *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 bzw. *S. lycopersicum* cv. Moneymaker amplifiziert und in pENTR/D-TOPO (Invitrogen) kloniert und sequenziert (Tabelle 3). Anschließend wurden sie in pGWB17, pGWB18 (Nakagawa *et al.*, 2007), pK7FWG2 und pK7WGF (Karimi *et al.*, 2002) rekombiniert, so dass N-Terminale und C-terminale 4xMyc- oder GFP-Fusionen entstanden (Tabelle 3). Da sich die N-terminalen und C-terminalen Epitop-Fusionen in allen untersuchten Fällen phänotypisch nicht unterschieden, werden in dieser Arbeit nur Experimente mit den C-terminalen Fusionen gezeigt. Für eine Fusion mit dem *nuclear export signal* (NES) wurden *xopG* und *xopH* in Plasmide pNESI und pINES rekombiniert, wodurch sie zur Visualisierung gleichzeitig an *gfp* fusioniert sind (Tabelle 3).

Für die Expression in *Xcv* 85-10 wurden Effektorproteine mit 4-fachem C-terminalem myc Epitop versehen. Dazu wurden *xopG*, *xopH*, *xopI* und *xopB* jeweils in das Plasmid pDGW4M rekombiniert (Tabelle 3). Die so entstandenen Bakterienstämme *Xcv* 85-10 (pDGW4M-*xopG*), *Xcv* 85-10 (pDGW4M-*xopH*) und *Xcv* 85-10 (pDGW4M-*xopI*) wurden neben verschiedenen Paprika-Kultivaren auch in einem größeren Gewächshausexperiment in eine Reihe von Solanaceen inokuliert. Die stabile Expression der Effektorproteine wurde mittels Immunoblotting unter Nutzung eines Myc-spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

2.8 Die Erzeugung von Punktmutationen in XopG und XopH

In XopG wurde ein Nukleotidaustausch an Position 174 mit Hilfe einer SOE-PCR eingefügt. Unter Nutzung der Oligonukleotidpaare xopG_Start, xopG-mut1-rev und xopG_rev, xopG_fwd3 wurden 2 überlappende Fragmente des *xopG*-Gens amplifiziert. In den Primer xopG-mut-rev war der Nukleotidaustausch von GAA (Glutamat) zu GCA (Alanin) integriert worden. Die beiden Fragmente wurden mit Hilfe eines Agarosegels analysiert und gereinigt. Anschließend wurden sie gemischt als Template in eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden xopG_Start und xopG_rev eingesetzt. So entstand ein Fragment des vollständigen ORFs von *xopG* mit der Punktmutation und CACC vor dem ATG das in pENTR/D kloniert und sequenziert wurde. XopG_{Ef174A} wurde im Verlauf dieser Arbeit in pGWB17, pK7FWG2, pk7WGF2, pDGW4M und pSPYNE rekombiniert und für weitere Experimente genutzt.

Um Punktmutationen in XopH einzufügen, wurde eine weitere Möglichkeit der zielgerichteten Mutagenese genutzt. Bei dieser Methode wird das gesamte Plasmid, auf dem sich das zu mutierende Gen befindet, mit phosphorylierten Oligonukleotiden und *Phusion hot start* Polymerase amplifiziert (Invitrogen, Karlsruhe). Diese Polymerase hat eine hohe Prozessivität, eine *proof reading* Funktion und, da sie erst bei einer Temperatur von mehr als 60 °C aktiviert wird, eine geringe Quote von Fehlpaarungen (Invitrogen, Karlsruhe). In die Primer XopH-H266A-C267A, XopH-C267A und XopH-C267S sind die jeweiligen Mutationen integriert worden. Jeweils mit dem Primer XopH-262rev wurde das Plasmid pENTR/D-xopH_{rev} amplifiziert. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

2.9 Isolierung von RNA aus Tomate und *N. benthamiana*

Für die Isolierung von RNA wurden zwei bzw. vier Blattscheiben (Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm) von *N. benthamiana* bzw. *S. lycopersicum* cv. Moneymaker in 2 ml Reaktionsgefäße (Typ *Safe-lock*; Eppendorf) geerntet und in Flüssigstickstoff überführt. Das Blattmaterial wurde fein gemörsert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini-Kits* der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll. DNA-Kontaminationen wurden durch eine DNase-Behandlung entfernt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.10 cDNA-Synthese und RT-PCR

Je 1 µg Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurde der *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis*-Kit der Firma Fermentas GmbH nach

Herstellerangaben verwendet. Die Amplifikation kodierender Sequenzen bzw. die RT (*reverse transcribed*)-PCR-Analysen erfolgten anschließend mittels genspezifischer Oligonukleotide (Tabelle A1). Für die RT-PCR-Analysen wurden für jede Oligonukleotidkombination verschiedene Zyklenzahlen getestet.

2.11 RACE (**rapid amplification of cDNA ends**)

Für die Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden wurde das BD SMARTTM (*switching mechanism at 5' end of RNA transcript*)-RACE Kit von Takara Bio Europe/Clontech nach Herstellerprotokoll verwendet. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde für die 5'- und 3'-cDNA-Synthese eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA-Enden erfolgte mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide (Tabelle A1) in Kombination mit Adapter-Oligonukleotiden, die spezifisch an den am 5'- bzw. 3'-cDNA-Ende fusionierten Adapter binden. Die RACE-PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Anschließend wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten, in pTOPO pCR 2.1 kloniert und sequenziert.

2.12 Sekretionsexperimente und Proteinanalysen

Für *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde *X. campestris* pv. *vesicatoria* wie zuvor beschrieben (Büttner *et al.*, 2002) in Sekretionsmedium (Minimalmedium A (Ausubel *et al.*, 1996), ergänzt mit 50 µg/ml BSA und 10 µg/ml Thiamin, pH 5,3) inkubiert. Die Trennung der Zellen vom Kulturüberstand erfolgte mittels Filtration durch einen proteindurchlässigen Filter (0,45 µm HT Tuffryn®-Membran; Acrodisc® 25 mm Syringe Filter, Pall GmbH, Dreieich). Gesamtzellextrakte wurden zehnfach konzentriert. Kulturüberstände wurden mittels Trichloressigsäurefällung einhundertfach konzentriert. Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western- Blot (Sambrook *et al.*, 1989) mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die folgenden primären Antikörper wurden genutzt: polyklonaler Anti-AvrBs3 Antikörper (Kaninchen; Knoop *et al.*, 1991), monoklonaler Anti-c-Myc Antikörper (Maus; Roche, Mannheim, Deutschland), polyklonaler Anti-GFP-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonaler Anti-HA-Antikörper (Ratte; Santa Cruz). Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-, Anti-Maus- bzw. Anti-Ratte Antikörper wurden als sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Antikörperreaktionen wurden durch Chemilumineszenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) visualisiert.

2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Blattproben wurden wie jeweils angegeben zwischen 20 und 48 hpi entnommen und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 505 - 530 nm Bandpass-Filter für GFP analysiert. Zur besseren Visualisierung von Zellkernen wurde 30-60 min vor der Analyse am LSM 0,01%ige DAPI-Lösung in die zu analysierenden Blattbereiche infiltriert. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel gestellt. DAPI wurde bei 364 nm angeregt und die DAPI-Fluoreszenz mit einem Bandpass-Filter 385 – 470 nm aufgenommen.

Für die Koloalierungsexperimente von XopB und HopD1 bzw. HopD1_m wurden ER- und Golgi-Markerproteine genutzt, die zur Unterscheidbarkeit der Effektor-GFP-Fusionen an das Rot fluoreszierende Protein mCherry gekoppelt waren. Die Golgi-Lokalisierung basiert auf der Verwendung des zytoplasmatischen Endes und der Transmembrandomäne (erste 49 AS) von GmMan1, (*soybean a-1,2-mannosidase I*) (Nelson *et al.*, 2007). Der ER-Marker besteht aus einer Kombination des Signalpeptids von AtWAK2 (*Arabidopsis thaliana wall-associated kinase 2*); am N-terminus des Fluoreszenzproteins und dem ER-Retentionssignal His-Asp-Glu-Leu an dessen C-Terminus (Nelson *et al.*, 2007).

2.14 Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation

Die BiFC basiert auf der getrennten Expression der Hälften des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP_N: AS 1-154, YFP_C: AS 155-239) fusioniert an jeweils eines der zu untersuchenden Proteine in der Pflanze. Binden beide Proteine in der Zelle aneinander, finden sich auch die Teile von YFP und nach Anregung durch Licht einer geeigneten Wellenlänge (514 nm) ist unter dem konfokalen LSM gelbe Fluoreszenz sichtbar. Die ORFs der zu untersuchenden Proteine wurden dazu jeweils in die Plasmide POPYNE und pOPYCE konjugiert und mit Hilfe von *Agrobacterium* in *N. benthamiana* mit einer OD₆₀₀=0,8 koinfiltriert (Walter *et al.*, 2004). Die Fluoreszenz wurde unter dem konfokalen LSM510 24 Stunden nach Inokulation visualisiert.

2.15 Koimmunopräzipitation

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Interaktion zweier Proteine in der Pflanze ist die Koimmunopräzipitation (KoIP). Sie basiert darauf, dass 2 potentiell interagierende Proteine mit verschiedenen Epitopen markiert und transient in der Pflanze exprimiert werden. Nach der Ernte von Blattmaterial und Zellaufschluss werden die Proteine mit Hilfe eines für ein Epitop spezifischen Antikörpers an Protein G-Sepharose immobilisiert. Nach einigen Waschschr

werden die Proteine eluiert. Haben beide Proteine aneinander gebunden, kann im Eluat mittels Westernblot-Analyse das epitopmarkierte 2. Protein nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden folgende Proteine *via Agrobacterium* in *N. benthamiana* transient koexprimiert: XopG-GFP mit SPRY-c-Myc, XopG-GFP mit RRM-c-Myc und als Kontrolle XopG-GFP ohne Interaktionspartner. Nach 2 Tagen wurde Blattmaterial (je 2 Blattscheiben $d = 9$ mm) geerntet, in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml KoIP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 μ l Protease-Inhibitor-Mischung (25 x konzentriert; *complete*, EDTA-free; Roche, Mannheim, Deutschland) sowie 1 Spatelspitze Polyvinylpyrrolidon aufgenommen. Der Proteinrohextrakt wurde zuerst durch 30 minütige Inkubation bei 4°C nach Zugabe von 25 μ l Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) und 2,1 μ l 15%igem Nonidet-P40 von unspezifisch bindenden Proteinen getrennt. Die Proteinkomplexe in dem entstandenen geklärten Proteinextrakt wurden anschließend mit Hilfe des Myc-Epitops und des c-Myc-spezifischen Antikörpers an 25 μ l Sepharose Nacht bei 4°C über Kopf rotierend immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4°C kaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 1 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot unter Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers analysiert.

2.16 Messung des Phytohormongehaltes in Blättern

Der Gehalt an Auxin (IAA), Jasmonsäure (JA), Salizylsäure (SA) und 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) wurde in *N. benthamiana*-Blättern nach *Agrobacterium* vermittelter transients Expression verschiedener Proteine gemessen. Dazu wurden zuerst XopB, XopJ und GFP allein oder in Kombination mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* transient exprimiert. In jedem Experiment wurden Blätter von jeweils drei verschiedenen *N. benthamiana* Pflanzen je Konstrukt großflächig mit *Agrobacterium* inokuliert. Blattmaterial aus den inokulierten Bereichen der drei Pflanzen wurde jeweils nach 18 und 24 Stunden entnommen und gepoolt, so dass insgesamt mindestens 500 mg Blattmaterial für die Messungen zur Verfügung stand und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

Das Pflanzenmaterial wurde mit 10 ml Methanol homogenisiert und mit den entsprechenden Standards (1ng/ 5mg Pflanzenmaterial) ($^{13}\text{C}_6$)IAA (Cambridge Isotope Laboratories), ($^2\text{H}_6$)JA (Miersch *et al.*, 1991), ($^2\text{H}_6$)SA (Campro Scientific, Veenendaal, The Niederlande) und ($^2\text{H}_4$)ACC (CDN Isotops, Quebec, Kanada) versetzt und anschließend filtriert. Für die Bestimmung von ACC, JA und IAA wurde das filtrierte Homogenat über eine 3 ml DEAE-Sephadex A25 Säule gegeben (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden) (Ac^- -Form,

Methanol). Die Säule wurde mit 3 ml Methanol und 3 ml 0.1 M Essigsäure in Methanol gewaschen und anschließend erst mit 3 ml 1 M Essigsäure in Methanol und dann mit 3 ml 1.5 M Essigsäure in Methanol eluiert. Die Eluate wurden vereint, eingedampft und in die HPLC eingesetzt (JA, IAA) bzw. durch eine 500 mg LiChrolutRP-18 Kartusche (ACC; Merck, Darmstadt, Deutschland) geschickt. Anschließend folgte die Derivatisierung. Der JA Gehalt wurde durch die Derivatisierung zu JA-Pentafluorobenzylester bestimmt, wie in (Miersch *et al.*, 2008) beschrieben gemessen. Die Messung des IAA Gehaltes erfolgte nach Methylierung mit Diazomethan wie bei (Meixner *et al.*, 2005) beschrieben. Der ACC Gehalt wurde durch die Freisetzung des Ethylen aus ACC mit Hilfe von NaOCl in Anwesenheit von Hg^{2+} bestimmt. Ethylen wurde durch Gaschromatographie quantifiziert (Lizada und Yang, 1979). SA wurde wie in (Verberne *et al.*, 2002) beschrieben isoliert. Die getrocknete organische Fraktion aus der Extraktion wurde vor der Analyse in 1 ml HPLC Eluent gelöst. Das HPLC System bestand aus einer Säule Typ Eurospher 100-C18, (5 μm , 250 x 4 mm) (Knauer, Deutschland). Das Eluent bestand aus 60% saurem Wasser (pH 2.8, mit Essigsäure) und 40% Methanol. Die Durchflussrate war 0.7 ml min^{-1} . Zwanzig Mikroliter des Extraktes wurden eingesetzt. Salizylsäure wurde mit einem Jasco FP-920 spektrofluorometrischen Detektor (<http://www.jascoinc.com/>) nachgewiesen, wobei eine Anregungswellenlänge von 300 nm und eine Emissionswellenlänge von 410 nm genutzt wurde. Zellaufschluss und Messungen wurden von Frau Birgit Orthel (IPB, Halle) durchgeführt.

2.17 Hefe-2-Hybrid-Sichtungen

Für die Suche nach pflanzlichen Zielproteinen wurden Hefe-Dihybrid-Sichtungen mit dem BD Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System von Clontech, Heidelberg durchgeführt. Dabei wurde im Wesentlichen nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Effektorproteine XopG, XopG_{E174A}, XopH, XopI und XopB wurden als Köder in voller Länge in Hefe exprimiert. Dazu wurde der Vektor pGBST7-attR (A. Strauß, T. Lahaye, O. Kirchner, unveröffentlicht) verwendet. Die mit dem Gateway-System erstellten Konstrukte wurden nach Herstellerangaben in *Saccharomyces cerevisiae* Y187 und AH109 transformiert. Die so entstandenen Hefestämmen Y187 (pGBST7-xopG), Y187 (pGBST7-xopG_{E174A}), Y187 (pGBST7-xopH), Y187 (pGBST7-xopI) und Y187 (pGBST7-xopB) wurden für die H2H-Sichtung verwendet. Zuvor wurde jeweils die Expression mittels Immunoblotting und c-myc Antikörper überprüft. Zusätzlich wurden die Köderproteine im Stamm AH109 auf die Fähigkeit der Autoaktivierung der Reportergene im Hefestamm durch Ausstreichen auf selektives Medium (SD/-A bzw. SD/-H) überprüft. Findet kein Wachstum statt, kann man

davon ausgehen, dass das jeweilige Protein die Expression der Reportergene nicht selbständig aktivieren kann und es somit als Köder geeignet ist.

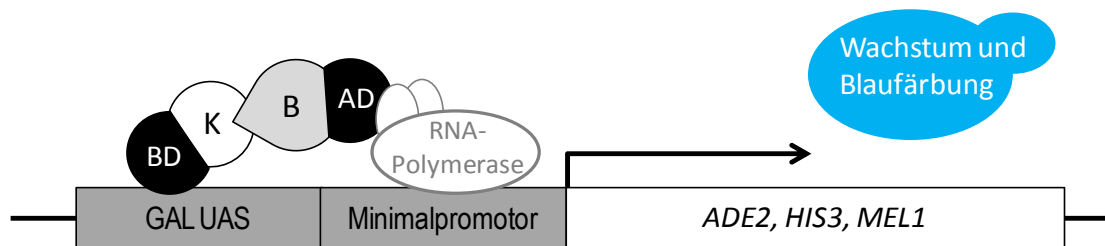


Abbildung 7: Das GAL4-Hefe-Dihybrid-System. Köder (K)- und Beuteprotein (B) sind an die DNA-Binde (BD)- bzw. Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert und werden in Hefe koexprimiert. Bei einer Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein kommt die GAL4-AD in räumliche Nähe zum Promotor, wodurch die Transkription der GAL4-regulierten Reporter *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* aktiviert wird. Die entsprechenden Hefen wachsen auf Minimalmedium ohne Zusatz von Adenin und Histidin (SD / -HA). Die Kolonien sind bei Zusatz von X- α -Gal durch die enzymatische Aktivität der von *MEL1* kodierten α -Galactosidase (Melibiase) blau gefärbt. UAS: *upstream activating sequences*.

2.17.1 Die c-DNA-Bibliothek

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine uninduzierte, normalisierte Tomaten-cDNA-Bibliothek im Vektor pDADT7-Rec erstellt (S. Masiero, H. Sommer, D. Gürlebeck und U. Bonas, MPIZ Köln und MLU Halle; (Gürlebeck, 2007). Hierfür wurde aus Blattmaterial von *Solanum lycopersicum* Kultivar Moneymaker Gesamt-RNA isoliert. Für die cDNA-Synthese wurden zufällige (*random*) Oligonukleotide verwendet. cDNA-Fragmentgrößen von 0,5-2 kb wurden für die Bibliothek ausgewählt (Gürlebeck, 2007). In Hefe erfolgt die Expression der Beutekonstrukte unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors. Die verwendete Bibliothek enthält etwa $1,5 \times 10^7$ Hefeklone/ml.

2.17.2 Die Sichtung der c-DNA-Bibliothek

Das Mating wurde wie im Clontech Manual beschreiben durchgeführt: 100 ml einer Übernachtskultur des Hefestamms Y178 (*MAT α*) mit dem Köderplasmid wurde durch Zentrifugation bei 1000 x g für 5 min pelletiert und mit einem 1 ml Aliquot der Tomaten c-DNA Bibliothek im Stamm AH109 (*MATa*) in 50 ml 2 x YPDA resuspendiert. Das Mating wurde in einem 2 l Erlenmeyerkolben bei 30 rpm und 30 °C für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 x g pelletiert und in ca. 20 ml H₂O resuspendiert und auf 20-30 große *Screening*-Platten mit SD/-THAL plattiert. Zusätzlich wurden, zur Bestimmung der Anzahl Diploide, je 100 ml verschiedener Verdünnungsstufen (10^{-3} bis 10^{-6}) des Mating-Ansatzes auf SD / -TL plattiert.

Die *Screening*-Platten wurden bis zu 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Ab dem 3. Tag wurden Einzelkolonien auf selektives Medium (SD/-THAL/+X- α -Gal) übergepickt. Bei den Hefestämmen, die auf dem selektiven Platten erneut gewachsen waren, wurde die Spezifität der Interaktion untersucht. Dazu wurden die Plasmide aus Hefe isoliert, in *E. coli* transformiert und wieder aus *E. coli* isoliert (um die Plasmide zu vereinzeln und zu vermehren). Anschließend wurden die Plasmide wieder in Hefe AH109 transformiert. Durch Paarung im kleinen Maßstab (ein Zellklumpen je Stamm in 500 μ l YPDA resuspendieren und in 24er Mikrotiterplatten auf einem Schüttler möglichst langsam, aber so dass die Zellen nicht absetzen für 6-12 Stunden bewegen) wurden die Beuteplasmide mit dem jeweiligen Köderplasmid bzw. pGBKT7-LamC in eine Hefezelle überführt und auf Interaktion mit Effektor einerseits und mit LaminC andererseits getestet. Dies geschah durch ausplattieren eines beim Mating entstandenen Zellklumpens auf für die Plasmide selektivem Medium (SD/-TL). Jeweils 5 unabhängige Kolonien wurden gepickt und durch Ausstreichen auf SD/-THAL/+X- α -Gal auf Interaktion getestet. Nur Beuteproteine, die spezifisch mit dem jeweiligen Effektorprotein, nicht aber mit LaminC interagierten wurden für weitere Experimente ausgewählt.

2.17.3 Plasmidisolierung aus Hefe

1. 2 ml YEB mit einer Hefekolonie inokulieren, Wachstum über Nacht bei 30 °C.
2. 1,5 ml der Übernachtskultur zur Sedimentation der Zellen kurz zentrifugieren, Überstand verwerfen und Zellen in 0,5 mal S-Puffer (10 mM K₂PO₄, 10 mM EDTA, 50 mM 2-Mercaptoethanol, 50 μ g/ml Zymolase) resuspendieren.
3. 30 min bei 37 °C inkubieren.
4. 0,1 ml Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM EDTA; 2,5 % SDS) zugeben und vortexen.
5. 30 min bei 65 °C inkubieren.
6. 0,166 ml 3 M KAc zugeben und mixen, auf Eis 10 min abkühlen.
7. 10 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren, Überstand in ein neues Tube gießen.
8. DNA Präzipitation: 0,8 ml Ethanol zugeben, 10 min auf Eis, 10 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren, Überstand verwerfen.
9. DNA mit 0,5 ml 70% Ethanol waschen, Pellet trocknen.
10. DNA in 40 μ l Wasser lösen.

2.18 Bioinformatische Annäherungen

Für die nähere Charakterisierung von Effektorproteinen und von im Hefe-2-Hybridsreen isolierten cDNA-Sequenzen wurden Sequenzhomologiesuchen auf Nukleotid- und Aminosäureebene mithilfe von Blast-Analysen gegen verschiedene Datenbanken durchgeführt:

- Gene index Datenbanken (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) Dana Farber Cancer Institute, 44 Binney St., Boston, MA 02115; gegen EST Sequenzen von *Solanum lycopersicum* und
- The SOL Genomics Network (<http://solgenomics.net/>; (Mueller *et al.*, 2005)
- NCBI Blast (Altschul *et al.*, 1997)

Motivsuchen wurden mittels Pfam, Interpro, SignalP und TargetP durchgeführt. Für Proteinstrukturvorhersagen wurde Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>) verwendet (Kelley und Sternberg, 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Typ III-Effektors XopI

3.1.1 Einfluss einer Deletion bzw. Überexpression von *xopI* auf Virulenz der Mutante

Um nach möglichen Effekten von XopI auf die Virulenz oder Avirulenz von *Xcv* zu suchen, wurde eine genomische *xopI*-Mutante hergestellt. Hierbei wurde das 1353 bp umfassende *xopI*-Gen in *Xcv* 85-10 vollständig deletiert. Die so erhaltenen Deletionsmutanten *Xcv* 85-10 Δ *xopI*, wurden auf eine mögliche Veränderung des Phänotyps im Vergleich mit dem WT-Stamm *Xcv* 85-10 untersucht. Es wurden drei unabhängige Deletionsmutanten in verschiedenen Verdünnungsstufen in Paprika ECW und ECW-10R inokuliert, um sowohl einen möglichen Einfluss auf die durch AvrBs1 ausgelöste HR, als auch auf Krankheitssymptome zu erkennen. In Abbildung 8 ist die Inokulation zweier unabhängiger *xopI* Deletionsmutanten in ECW und ECW-10R Paprikapflanzen dargestellt. Es konnte weder ein Einfluss von *xopI* auf die AvrBs1-HR noch auf die in Paprika ECW ausgelösten Krankheitssymptome beobachtet werden (Abbildung 8; Tabelle 4).

Darüber hinaus wurde XopI sowohl in *Xcv* 85-10 unter Kontrolle eines *triple lac*-Promotors als auch mittels *Agrobacterium* in der Pflanze unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert (siehe 2.7). Hier konnte ebenfalls weder in suszeptiblen oder resistenten Paprikapflanzen noch in einer Reihe weiterer untersuchter Solanaceen ein auf den Effektor zurückzuführender Phänotyp beobachtet werden (Tabelle 4 und Tabelle 11).

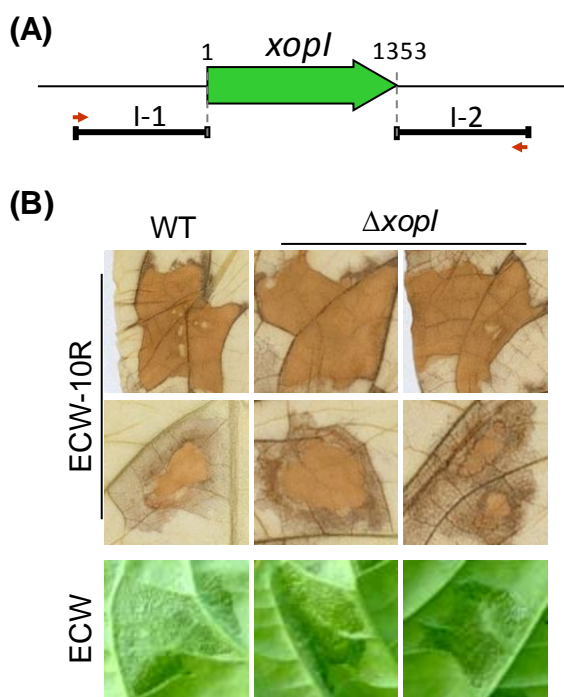


Abbildung 8: Deletion von *xopI* in *Xcv* 85-10 führt zu keiner veränderten Virulenz. (A) Schematische Darstellung der *xopI*-Deletion. I-1 und I-2 zeigen die ca. 1 kb großen flankierenden Bereiche, die in das Suizidplasmid pK18mob::sacB kloniert wurden. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien entspricht der gesamten Länge des Gens und wurde deletiert. Die Deletion wurde durch PCR mit flankierenden Oligonukleotiden (rote Pfeile) nachgewiesen. (B) *Xcv* 85-10 WT und zwei unabhängigen *Xcv* 85-10 *xopI*-Deletionsmutanten wurden in suszeptible ECW- ($OD_{600}=0,1$ (oben) und $0,01$) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen ($OD_{600}=0,04$) inokuliert. Zur Verdeutlichung der HR-Reaktionen wurden die Blätter 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Die Krankheitssymptome wurden 2 Tage nach Inokulation fotografiert. Die Inokulationen wurden mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Tabelle 4: Phänotypen der Effektoren XopG, XopH und XopI in verschiedenen Pflanzenspezies.

Spezies	XopI	$\Delta xopI$	XopH	$\Delta xopH$	XopG	$\Delta xopG$
<i>Capsicum annuum</i> ECW	–	–	–	–	HR	–
<i>Capsicum annuum</i> ECW-10R	–	–	–	verzögerte HR	HR	–
<i>Capsicum annuum</i> ECW-20R	–	–	–	–	hr	–
<i>Capsicum annuum</i> ECW-30R	–	–	–	–	–	–
<i>Nicandra physaloides</i>	–	–	–	–	HR	–
<i>Nicotiana benthamiana</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Nicotiana clevelandii</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Nicotiana tabacum</i>	–	–	–	–	HR	–
<i>Petunia spec.</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Physalis alkekengi</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Physalis peruviana</i>	–	–	–	–	hr	–
<i>Solanum americanum</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Solanum lycopersicum</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Solanum nigrum</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Solanum</i> <i>pseudocapsicum</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Solanum suaveolens</i>	–	–	–	–	–	–
<i>Solanum tuberosum</i>	–	–	–	–	–	–

XopI, XopH, XopG: Die Effektorproteine wurden in voller Länge mittels *Agrobacterium* transient in verschiedenen Pflanzen exprimiert HR: hypersensitive Reaktion, hr: schwache HR, –: keine HR.. $\Delta xopI$, $\Delta xopH$, $\Delta xopG$: Xcv 85-10 Deletionsmutanten der einzelnen Effektoren wurden in verschiedenen ODs zwischen 0,001 bis 0,4 inokuliert.–bedeutet keine Veränderung im Vergleich zum WT. Die Phänotypen wurden täglich bis 4dpi beobachtet und stets mit den WT-Stämmen verglichen. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Inokulationen der verschiedenen Solanaceen.

3.1.2 Mögliche Ziele von XopI in der Pflanze

3.1.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von XopI in der Pflanzenzelle

Um Aufschluss darüber zu erhalten, in welchem Zellkompartiment XopI nach der Translokation in der Pflanzenzelle eine Funktion ausübt, wurden N- und C-terminale *gfp*-Fusionen von *xopI* in einem Binärvektor unter Kontrolle eines 35S Promotors mittels

Agrobacterium transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach 2 Tagen wurden Blattscheiben mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) analysiert. Eine deutliche Fluoreszenz war im Zytoplasma und Zellkern sichtbar, ähnlich zu GFP allein (Abbildung 9). Da das Fusionsprotein mit 75 kDa relativ groß ist und in der Westernblotanalyse kein abgespaltenes GFP sichtbar ist (Abbildung 9b), kann davon ausgegangen werden, dass diese Lokalisierung nicht aus der Diffusion des Proteins oder von freiem GFP in den Zellkern resultiert.

Bei XopI wie bei allen in dieser Arbeit untersuchten Effektorproteinen verhielten sich C- und N-terminale GFP-Fusionen gleich, so dass hier nur die C-terminalen Fusionen dargestellt und auch für weiterführende Experimente genutzt wurden.

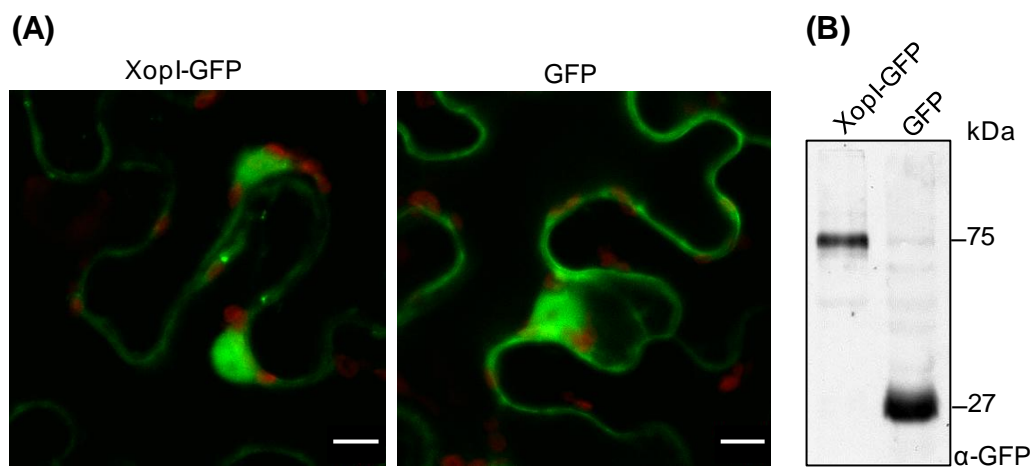


Abbildung 9: XopI ist im pflanzlichen Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. XopI wurde als C-terminale GFP-Fusion vom Vektor pK7FWG2 mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. (A) XopI ist, wie GFP im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. Die weißen Balken entsprechen 10 µm. (B) Westernblot-Analyse der Expression des XopI-GFP Fusionsproteins und GFP mit GFP-spezifischem Antikörper. Das Experiment wurde mindestens zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

3.1.2.2 An welche Proteine bindet XopI in der Pflanzenzelle?

Die F-Box von XopI legt eine Bindung an den SCF-Komplex in der Pflanzenzelle und eine Rolle bei der Virulenz durch Proteindegradation nahe (Lechner *et al.*, 2006). Allerdings sind auch vereinzelt andere Funktionen von F-Box-Proteinen, wie eine Helikasefunktion des menschlichen Fbh1, eine Funktion in der Regulation der Mitochondrienmorphologie von Mfd1 und Mdm30 oder eine Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress von Pof14 in Hefe, bekannt (Hermand, 2006; Ho *et al.*, 2008). Um pflanzliche Zielproteine von XopI zu identifizieren, wurde eine Hefe-2-Hybrid-Sichtung (*yeast two-hybrid*, Y2H) mit XopI als Köder durchgeführt. Hierzu wurde das Gal4 System verwendet. Als Beute wurde eine Y2H-

Bibliothek mit cDNA-Klonen aus Tomate (D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas, Kapitel 2.17.1) verwendet.

XopI wurde in voller Länge in dem Hefe-Expressionsvektor pGBST7 (Tabelle 3) an eine DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und im Hefestamm Y187 exprimiert. Die Expression des XopI-BD Fusionsproteins wurde mittels Immunoblotting nachgewiesen (Abbildung 10). Das Überprüfen auf Transkriptionsautoaktivierung wurde mit dem Derivat des Reporterstammes AH109 (pGBST7-*xopI*) durchgeführt. Dieser wurde dafür jeweils auf Minimalmedium ohne Adenin (SD-Ade) und auf Minimalmedium ohne Histidin (SD-His) ausplattiert. Im Falle der Autoaktivierung eines der Reportergene wäre Wachstum auf dem jeweiligen Medium zu beobachten. Der Hefestamm AH109 (pGBST7-*xopI*) konnte auf keinem der beiden Medien wachsen. Eine Autoaktivierung der Expression der Reportergene durch die BD-XopI-Fusion ist damit ausgeschlossen und das Fusionsprotein wurde als Köder für die Y2H-Sichtung verwendet.

Der Köderstamm Y187 (pGBST7-*xopI*) wurde mit der Y2H-Bibliothek im Stamm AH109 für 24 Stunden gepaart und anschließend wurden die diploiden Zellen auf Minimalmedium ohne Trp, His, Ade und Leu selektiert (SD/-THAL). Überraschenderweise war bereits nach drei Tagen nahezu ein „Rasen“ von Kolonien sichtbar, während bei einem geeigneten Köder nur vereinzelte Kolonien zu erwarten sind (siehe andere Y2H-Sichtungen in dieser Arbeit). Deshalb wurde die direkte Interaktion mit der Spezifitätskontrolle LaminC im Y2H-System untersucht, durch die üblicherweise unspezifisch interagierende Beuteproteine ausgeschlossen werden, da sie nur mit anderen Laminen spezifisch interagieren (Goldman *et al.*, 2002). Wie erwartet war eine starke Interaktion zwischen XopI und LaminC nachweisbar (Abbildung 10b). Aufgrund dieser „Klebrigkeit“ des Proteins wurde versucht, das Protein in zwei Abschnitte zu teilen und mit dem geeigneten dieser Teile Hefe-Interaktionsstudien durchzuführen. Die Teilung wurde so gewählt, dass der N-Terminale Teil des Proteins die F-Box, aber keinen Anteil der *Repeats* enthält. Der C-terminale Teil von XopI beginnt mit der ersten *Repeat*-Sequenz (Abbildung 10a). Auch für diese Teile von XopI wurde vor dem Einsatz als Köder in einem Y2H-Assay die Bindung an LaminC untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl der F-Box Bereich von XopI, als auch der C-terminale Teil mit den *Repeats* unspezifisch an LaminC binden (Abbildung 10b). XopI war daher als Köder für eine Y2H-Sichtung nicht geeignet. Aufgrund interessanter Entwicklungen bei parallel bearbeiteten Effektorproteinen wurde beschlossen, mit diesem Effektor vorerst nicht weiterzuarbeiten.

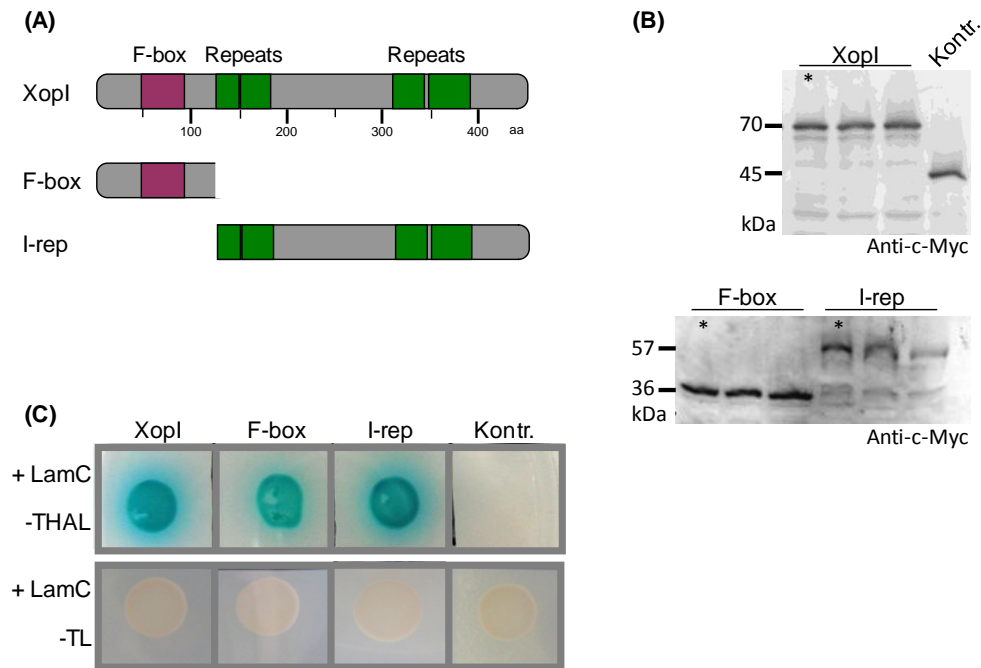


Abbildung 10: XopI und Teile von XopI binden unspezifisch im Hefe-2-Hybrid-System. (A) Das Modell zeigt schematisch die Teile von XopI, die für eine mögliche Y2H-Sichtung als Köder getestet worden sind. (B) Expression von XopI und Derivaten in Hefe AH109. XopI sowie die F-Box- und Repeat-Domäne wurden als N-terminale Fusionen an GAL4-BD und ein c-Myc-Epitop in dem Hefestamm Y187 exprimiert und mittels Immunoblotting unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Eine GAL4-BD-XopG-Fusion, die in dieser Arbeit ebenfalls als Köder genutzt wurde (3.3.11.), diente als Positivkontrolle (Kontr.). oben: Die Expression von XopI in voller Länge von 3 Transformanten. unten: Die Expression von jeweils 3 Transformanten der XopI-Fragmente F-Box und I-rep. (*) Die gekennzeichneten Stämme wurden als Köder ausgewählt. (C) Sowohl XopI, als auch der N-terminale Teil mit der F-Box und der C-terminale Teil mit den Repeat-Strukturen reagieren im Y2H-Assay unspezifisch mit LaminC (LamC). –THAL ist ein Minimalmedium ohne essentielle Aminosäuren auf dem Wachstum nur bei direkter Interaktion der getesteten Proteine möglich ist. Als Kontrolle (Kontr.) diente XopG, das nicht mit LaminC interagiert. Das Medium –TL (mit Histidin und Adenin) dient als Wachstumskontrolle.

3.2 Charakterisierung des Typ III-Effektors XopH

3.2.1 Deletion von *xopH* hat Effekt auf *AvrBs1*-HR

XopH ist auf dem großen Plasmid von *Xcv* direkt stromaufwärts vom Gen des Typ III-Effektors *avrBs1* kodiert. Die offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) beider Gene sind durch 90 nt voneinander getrennt. Bei der Erstellung der *xopH*-Deletionsmutante wurde darauf geachtet, den Promotor-Bereich vor *avrBs1* nicht zu entfernen, weshalb nur die erste Hälfte von *xopH* deletiert wurde (siehe 2.5; Abbildung 11a). Im Vergleich zum *Xcv* 85-10 WT-Stamm war die HR nach der Inokulation der Deletionsmutante *Xcv* 85-10 Δ *xopH* in Paprika ECW-10R nach 24 Stunden noch nicht sichtbar (Abbildung 11b) sondern trat mit einer Verzögerung von mehr als einem Tag auf. Um zu überprüfen, ob es sich um einen

XopH-spezifischen Phänotyp handelt, wurden XopH bzw. AvrBs1 in der *xopH*-Deletionsmutante von dem Plasmid pDGW4M in 85-10 Δ *xopH* exprimiert. Abbildung 11b zeigt, dass 85-10 Δ *xopH* (pDGW4M-*xopH*) nicht in der Lage ist den Phänotyp zu komplementieren, 85-10 Δ *xopH* (pDGW4M-*avrBs1*) jedoch stellte den Phänotyp des WT-Stammes wieder her. Der Effekt auf die HR resultiert folglich nicht aus der Abwesenheit des XopH Proteins, sondern es scheint vielmehr, dass die Deletion der ersten Hälfte von *xopH* Einfluss auf die AvrBs1-Expression hat.

Aus diesem Grund wurde eine neue Mutante von *xopH* erstellt, die die DNA-Sequenz des Gens nicht entfernt, um weiterhin die Expression von AvrBs1 zu ermöglichen. So wurde ein *frame shift* in das Genom eingeführt, der gleichzeitig zu einem frühen Stop führt (siehe 2.5).

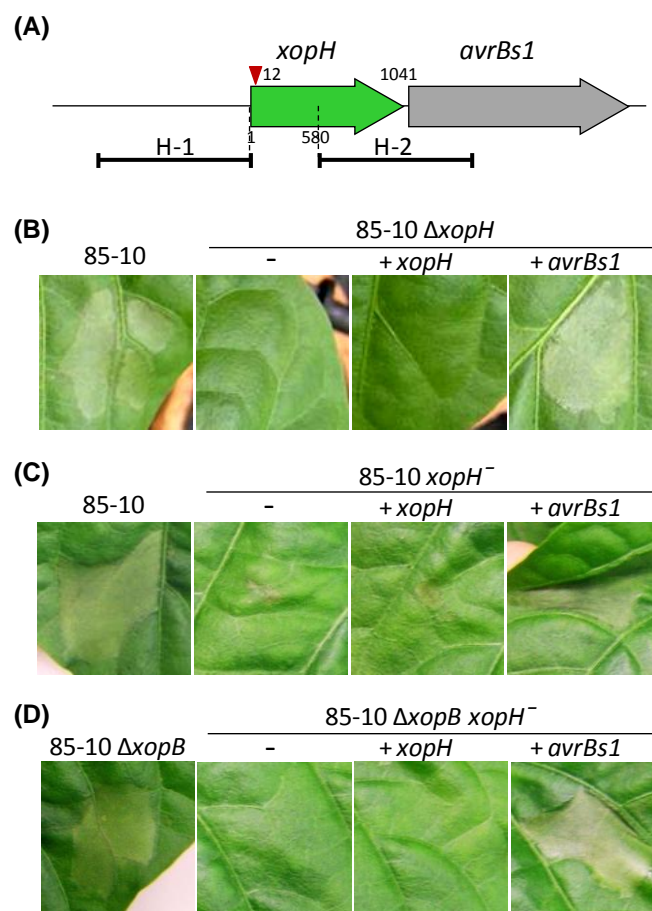


Abbildung 11: Deletion von XopH hat Einfluss auf die AvrBs1-HR im Stamm Xcv 85-10. (A) Schematische Darstellung der Lage der Gene *xopH* und *avrBs1* und die Position der Deletion. H-1 und H-2 zeigen die flankierenden Bereiche, die in pK18mob::sacB kloniert wurden. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien wurde deletiert. Der Integrationsort der *early stop*-Mutation (*xopH*⁻) ist durch ein rotes Dreieck gekennzeichnet. (B)-(D) Infiltriert wurden resistente ECW-10R-Pflanzen mit Xcv 85-10 und Derivaten mit einer OD = 0,2. XopH und AvrBs1 wurden vom Plasmid pDGW4M exprimiert. Fotos wurden einen Tag nach Inokulation erstellt. (B) Deletion des N-Terminus von XopH hat Einfluss auf die von AvrBs1 ausgelöste HR. Der Stamm 85-10 Δ *xopH* löst keine HR auf ECW-10R aus. Der Phänotyp lässt sich durch Expression von AvrBs1, nicht aber von XopH komplementieren. (C) Das Einführen einer *early stop*-Mutante (*xopH*⁻) führt ebenfalls zum Ausbleiben der HR nach einem Tag und kann ebenfalls nur durch *avrBs1* komplementiert werden. (D) Der Effekt einer *xopB/xopH*⁻ Doppelmutante kann ebenfalls durch AvrBs1 komplementiert werden. Alle Inokulationen wurden mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

Die erstellte *early-stop*-Mutante wurde als 85-10*xopH*⁻ bezeichnet und in ECW-10R-Pflanzen inokuliert. Wiederum zeigten die getesteten 85-10 *xopH*⁻-Stämme eine verzögerte AvrBs1-HR im Vergleich zum WT-Stamm. Dieser Phänotyp konnte durch zusätzliche Expression von AvrBs1, nicht aber durch Expression von XopH komplementiert werden (Abbildung 11b).

Es konnte somit keine genomische *xopH*-Mutante erstellt werden, die keinen Einfluss auf die AvrBs1-Reaktion hat. Ein Phänotyp, der allein auf die Deletion von *xopH* zurückzuführen ist, konnte nicht ermittelt werden. Bei allen anderen Pflanzen, in die die *Xcv85-10ΔxopH* oder die *Xcv85-10xopH*⁻-Stämme im Gewächshausexperiment inokuliert wurden, war kein phänotypischer Unterschied zum WT 85-10 sichtbar (Tabelle 4).

3.2.2 *XopH* unterdrückt die durch den Typ III-Effektor *XopJ* ausgelöste HR

Da die Unterdrückung von Zelltod in der Pflanze eine wichtige Funktion von Effektorproteinen ist, wurde überprüft, ob XopH in der Lage ist die durch ein Effektorprotein ausgelöste HR-Reaktion zu unterdrücken. Dazu wurden alle zu dieser Zeit in unserem Labor vorliegenden Effektorproteine, die eine Zelltodreaktion auslösen, *via Agrobacterium* in der jeweiligen resistenten Pflanze mit XopH koexprimiert. Getestet wurden AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3, AvrBsT, XopJ, XopB, XopG und AvrRxv, deren Gene, wie auch *xopH* kloniert in Binärvektoren unter Kontrolle eines 35S-Promotors vorlagen (Tabelle 3). Der Einfluss auf die HR-Reaktionen von AvrBsT, XopJ, XopB und AvrRxv wurden in *N. benthamiana* analysiert, auf die Reaktion von XopG, AvrBs1, AvrBs2 und AvrBs3 entsprechend in Paprika ECW, ECW-10R, ECW-20R und ECW-30R. Mit einer Ausnahme waren alle Zelltodreaktionen von XopH unbeeinflusst, die XopJ-HR wurde jedoch durch gleichzeitige XopH-Expression im Vergleich zu Kontrolle nahezu vollständig unterdrückt (Abbildung 12).

3.2.3 *Cystein267* im aktiven Zentrum von *XopH* ist essentiell für Unterdrückung der *XopJ*-HR

Ein aktives Zentrum ist essentiell für die enzymatische Aktivität von Tyrosinphosphatasen (Hallé *et al.*, 2007). Hier sollte nun überprüft werden, ob die Aminosäuren im putativen aktiven Zentrum von XopH, die HR-Suppression beeinflussen. Hierzu wurden durch gerichtete Mutagenese die beiden Aminosäuren Histidin266 und Cystein267 (*XopH*_{H266A,C267A}) oder nur Cystein267 (*XopH*_{C267A}) gegen Alanine ausgetauscht, außerdem wurde in einer weiteren Mutante Cystein267 durch Serin (*XopH*_{C267A}) ersetzt, eine weniger drastische Veränderung des Proteins. Alle 3 Gene werden, nach Übertragung mittels *Agrobacterium*, in der Pflanze in ähnlichen Mengen wie das WT-Gen exprimiert (Abbildung

12). Keines der Proteine ist jedoch noch in der Lage, die XopJ-HR zu unterdrücken (Abbildung 12). Das putative aktive Zentrum ist also essentiell für die Funktion von XopH.

XopH	219	SEEEELVRAAGAKYVRLTVTDHLSPRADDIDAFIAMERE-MAHDERLHVHC	GMGLGRTTIF	277
		SE E+V AGA Y R+ +TDH P + D + + R + +E L VHC	G GRIT	
HopAO1	329	SEREVVTEAGATYRRVAITDHNRPSEATDELVDIMRHCLQANESLVVHC	NGGRGRTTTA	388
XopH	278	IVMHDILRNAAMLSFDDIIERQRKFNPGRSLDNNKDVSDKGRSEFRNERSEFLPLFYEYA		337
		+M D+L+NA S + +I R K + + + +S R F +R +FL F++YA		
HopAO1	389	MIMVDMLKNARNHSAETLITRMAKLSYDYNMTDLGSISALKRP-FLEDRLKFLQAFHDYA		447

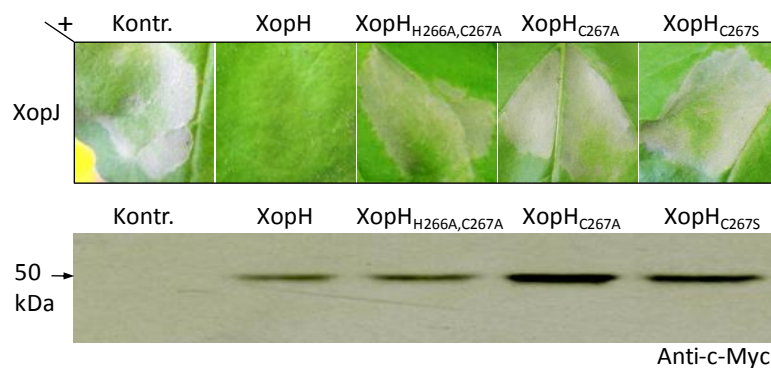


Abbildung 12: XopH unterdrückt, abhängig von Cystein 267, die durch XopJ ausgelöste Zelltodreaktion. Die obere Box zeigt einen Sequenzvergleich von XopH und HopAO1 (*P. syringae* pv. *tomato*) im Bereich um das putative aktive Zentrum. Die Proteine sind über die gesamte Länge 30 % identisch und 49 % ähnlich. Die konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums sind rot dargestellt. XopH und seine Derivate wurden zusammen mit XopJ mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. Dazu wurde die Stämme GV3101(pGWB5-*xopJ*) mit GV3101(pGBB17-*xopH*) bzw. Derivate im Verhältnis 2:3 gemischt und mit einer $OD_{600\text{gesamt}}=1$ in Blätter inokuliert. Die Expression aller XopH-Derivate wurde durch Immunoblotting unter Verwendung eines c-Myc spezifischen Antikörpers dokumentiert. Als Kontrolle diente Koinfiltration mit GV3101 ohne zusätzliches Plasmid. Die Phänotypen wurden 3 Tage nach Inokulation dokumentiert. Die Experimente wurden mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.2.4 XopH ist in der Pflanzenzelle im Zellkern und Zytoplasma nachweisbar

Um die subzelluläre Lokalisierung von XopH zu bestimmen, wurde analog wie unter 3.1.2.1 beschrieben vorgegangen. Die Fluoreszenz des XopH-GFP-Fusionsproteins war im Zytoplasma und im Zellkern sichtbar (Abbildung 13a). Die Verteilung unterschied sich nicht von GFP allein. Die stabile Expression des XopH-GFP Fusionsproteins wurde durch Immunoblotting unter Nutzung eines GFP-Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 13c).

3.2.5 Kernlokalisierung ist nicht notwendig für Funktion von XopH

Um herauszufinden, in welchem Zellkompartiment XopH in der Pflanze agiert, bzw. ob die Kernlokalisierung für die Funktion von XopH notwendig ist, wurde XopH, zusätzlich zum GFP, sowohl N-terminal als auch C-terminal an ein NES (*nuclear exclusion signal*)-Signal fusioniert. Proteine mit einem solchen Signal werden aus dem Kern heraus transportiert. In

den Pflanzenzellen, in denen die NES-XopH-Fusion exprimiert wurde, war 1,5 Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression grüne Fluoreszenz im Kern und Zytoplasma zu erkennen, ein Protein jedoch im Immunoblot nicht nachweisbar. Anscheinend findet ein Abbau dieses Fusionsproteins statt (Abbildung 13c). Dennoch war eine partielle Unterdrückung der XopJ-HR sichtbar (Abbildung 13b), vermutlich hervorgerufen durch freies XopH. Die GFP-Fluoreszenz von XopH-NES zeigt einen Kernausschluss (Abbildung 13a), ist im Vergleich zu XopH ohne NES-Signal jedoch schwächer exprimiert (Abbildung 13c). Auch dieses kernaussgeschlossene Protein führt zur Unterdrückung der XopJ-HR (Abbildung 13b), jedoch nicht vollständig. Dies ist möglicherweise auf die geringere Proteinmenge zurückzuführen. Man kann daher vermuten, dass XopH im Zytoplasma und nicht im Zellkern agiert.

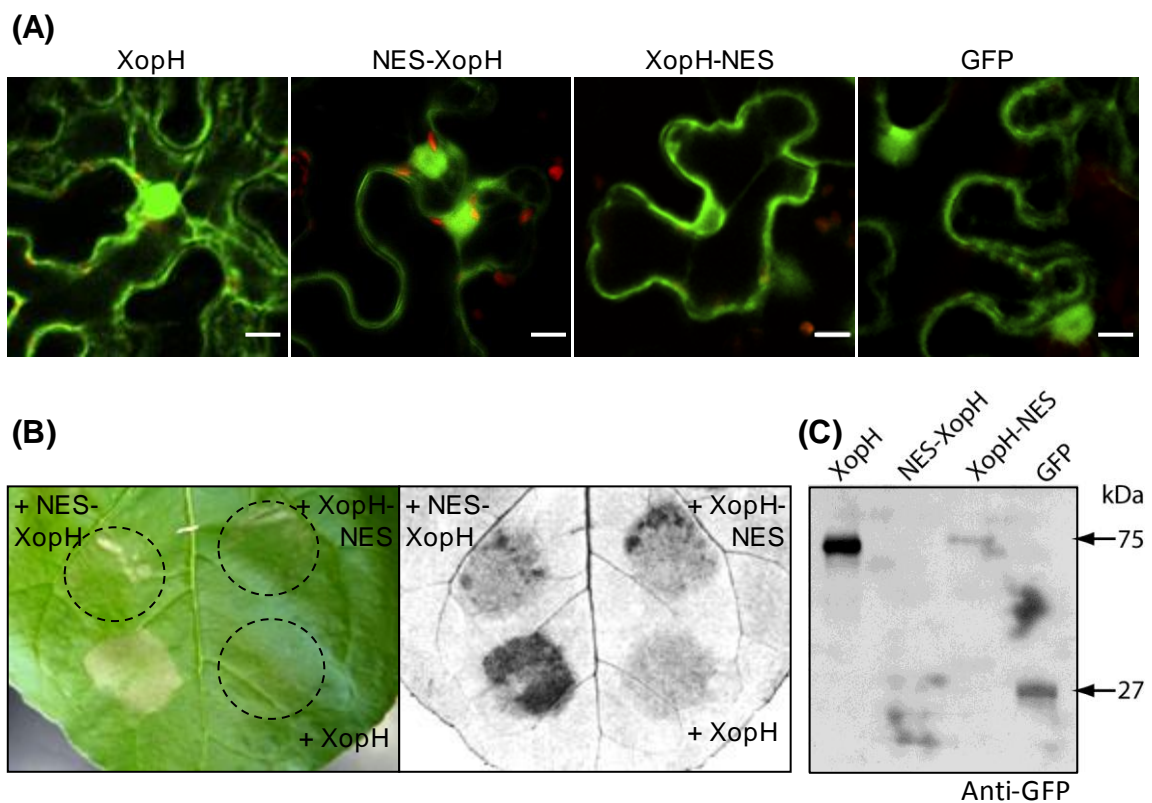


Abbildung 13: Kernlokalisierung ist für die Virulenzfunktion von XopH nicht notwendig. (A) Lokalisierungsstudien. XopH-GFP lokalisiert im pflanzlichen Zytoplasma und Zellkern. NES-XopH-GFP hat keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung aber XopH-NES-GFP ist nicht mehr im Zellkern lokalisiert. Die verschiedenen Konstrukte wurden unter Kontrolle eines 35S-Promotors mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach 1,5 Tagen wurden Blattscheiben ausgestanzt und mit dem konfokalen LSM analysiert. Rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten. Die weißen Balken entsprechen 10 μm . (B) Kernausschluss von XopH hat keinen Einfluss auf die Unterdrückung der durch XopJ ausgelösten HR. Es wurde jeweils *Agrobacterium* GV3101(pGWB5-xopJ) im Verhältnis 1:2 mit GV3101 (GFP), (XopH-GFP), (NES-XopH-GFP) bzw. (XopH-NES-GFP) gemischt und mit einer $\text{OD}_{\text{gesamt}}=1$ inokuliert. Die Phänotypen wurden 3 Tage nach Inokulation dokumentiert. (C) XopH-GFP und XopH-NES-GFP werden in der Pflanze stabil exprimiert. NES-XopH-GFP war mittels Immunoblotting nicht nachweisbar. Es wird möglicherweise abgebaut, wodurch die Fluoreszenz im Kern erklärbar wäre. Die schwächere Expression der beiden NES-Konstrukte ist ein wahrscheinlicher Grund für die unvollständige Unterdrückung der XopJ-HR. Proteinextrakte von Blattscheiben,

(Fortsetzung Beschriftung Abbildung 13) in denen *xopH-gfp*, *NES-xopH-gfp*, *xopH-NES-gfp* und *gfp* exprimiert werden, wurden mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers durch Immunoblotting analysiert. Es wurden jeweils 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

3.2.6 Identifizierung möglicher pflanzlicher Zielproteine von XopH

Die vorliegenden Ergebnisse legen eine Rolle von XopH bei der pflanzlichen Immunabwehr in Abhängigkeit des aktiven Zentrums von Tyrosinphosphatasen nahe. Um pflanzliche Zielproteine von XopH zu identifizieren, wurde eine Hefe-2-Hybrid-Sichtung einer Tomaten-cDNA Bibliothek, wie unter 3.1.3.2. beschrieben, durchgeführt. Als Köder diente XopH in voller Länge. Die durch Auszählen bestimmte Anzahl von insgesamt gesichteten diploiden Hefezellen betrug in diesem Experiment $1 \cdot 10^7$. Nach 6-8 Tagen wuchsen 34 Hefekolonien, die auch nach überstreichen auf SD/-THAL/+X- α -Gal stabil wuchsen und alle fünf Reportergene und Auxotrophiemarker aktivierten. Die Plasmide der 34 Kandidaten wurden isoliert und über einen Zwischenschritt in *E. coli* in den Stamm AH109 transformiert. Durch gezielte Paarung mit jeweils den Hefestämmen Y187 (pGBST7-*xopH*) und Y187 (pGBKT7-*lamC*) konnte in den entstandenen diploiden Zellen die Spezifität der Interaktion bestimmt werden. Drei der 34 von den cDNA-Fragmenten exprimierten Proteine interagierten spezifisch mit XopH und nicht mit der Spezifitätskontrolle LaminC, was durch Wachstum und Blaufärbung der entsprechenden Stämme auf SD/-THAL/+X- α -Gal beobachtet werden konnte (Abbildung 14).

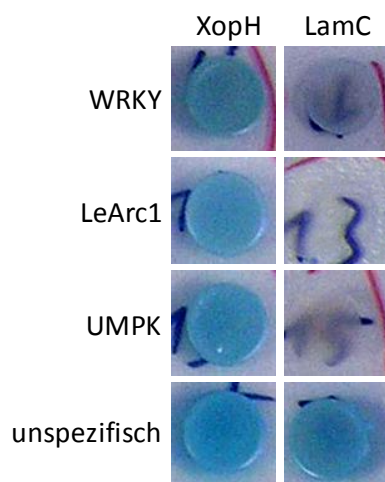


Abbildung 14: Spezifische Interaktion isolierter Beuteprotein-Fragmente mit XopH. Suspensionen der diploiden Hefezellen mit jeweils dem aus der Y2H-Bibliothek isoliertem Plasmid-Derivat und (pGBST7-*xopH*) bzw. (pGBKT7-*lamC*) wurden mit einer $OD_{600}=0,1$ auf die auf selektives Minimalmedium SD/-THAL/+ X- α -Gal getropft. Die Abbildung zeigt das Wachstum nach 2 Tagen bei 30°C. Die mit XopH isolierten Beuteproteine interagierten mit XopH - und aktivierten damit die Expression der Reportergene – nicht aber mit LaminC.

Durch Sequenzierung der entsprechenden cDNA-Fragmente wurden ein Transkriptionsfaktor der WRKY-Familie, das Protein WRKY1 aus *Solanum lycopersicum* (Akzessionsnummer: FJ654265.1), *LeArcA1* und ein Protein, das als UMPK-ähnlich (*uridin-monophosphate-kinase-like*) annotiert wurde, identifiziert (*The Gene Index Database*; Sequenzen siehe

Anhang). LeArcA1 gehört zur WD40-Superfamilie und besitzt WD40 Sequenzwiederholungen, das UMPK-ähnliche Protein enthält eine vorhergesagte Kinasedomäne (Marchler-Bauer *et al.*, 2011). Zu allen drei DNA-Sequenzen konnten passende ESTs (*expressed sequence tags*) in einer Datenbank (*Solanum lycopersicum*; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) identifiziert werden, die einen vollständigen offenen Leserahmen enthielten (siehe Anhang).

3.2.7 Subzelluläre Lokalisierung von WRKY, LeArcA1 und UMPK

Um zu überprüfen, ob eine Bindung von WRKY1, LeArcA1 und UMPK-*like* an XopH in der Pflanzenzelle wahrscheinlich ist, wurde die subzelluläre Lokalisierung der Interaktoren, wie zuvor beschrieben, bestimmt. Die vollständigen Sequenzen der 3 Interaktoren wurden in pENTR/D kloniert und anschließend in pK7FWG2 rekombiniert. Die Fusionsproteine WRKY1-GFP, LeArcA1-GFP und UMPK-GFP wurden mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach zwei Tagen wurde die GFP-Fluoreszenz beobachtet. WRKY1 ist, wie von WRKY-Proteinen bekannt, im pflanzlichen Zellkern zu finden; LeArcA1 lokalisiert genau wie XopH im Zytoplasma und im Zellkern (Abbildung 15). Diese beiden Proteine sind potentielle Interaktionspartner von XopH. Das Uridin-Monophosphat-Kinase-ähnliche Protein lokalisiert in den Chloroplasten (Abbildung 15). Auch eine Koexpression mit XopH ändert die chloroplastidäre Lokalisierung von UMPK nicht (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion zwischen XopH und UMPK in der lebenden Zelle ist somit unwahrscheinlich. Dies führte zu der Annahme, dass es sich um einen falsch-positiven Interaktor handeln könnte, was im späteren Verlauf dieser Arbeit zusätzlich durch den Umstand bestätigt wurde, dass UMPK auch in einer anderen Y2H-Sichtung gefunden wurde und der dort exprimierte Abschnitt schwach mit LaminC interagierte.

Die in Hefezellen identifizierte Bindung der putativen Interaktoren an XopH wurde in der Pflanze mit Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) untersucht. Eine Interaktion eines der Proteine mit XopH konnte unter diesen Bedingungen jedoch nicht beobachtet werden (siehe Anhang).

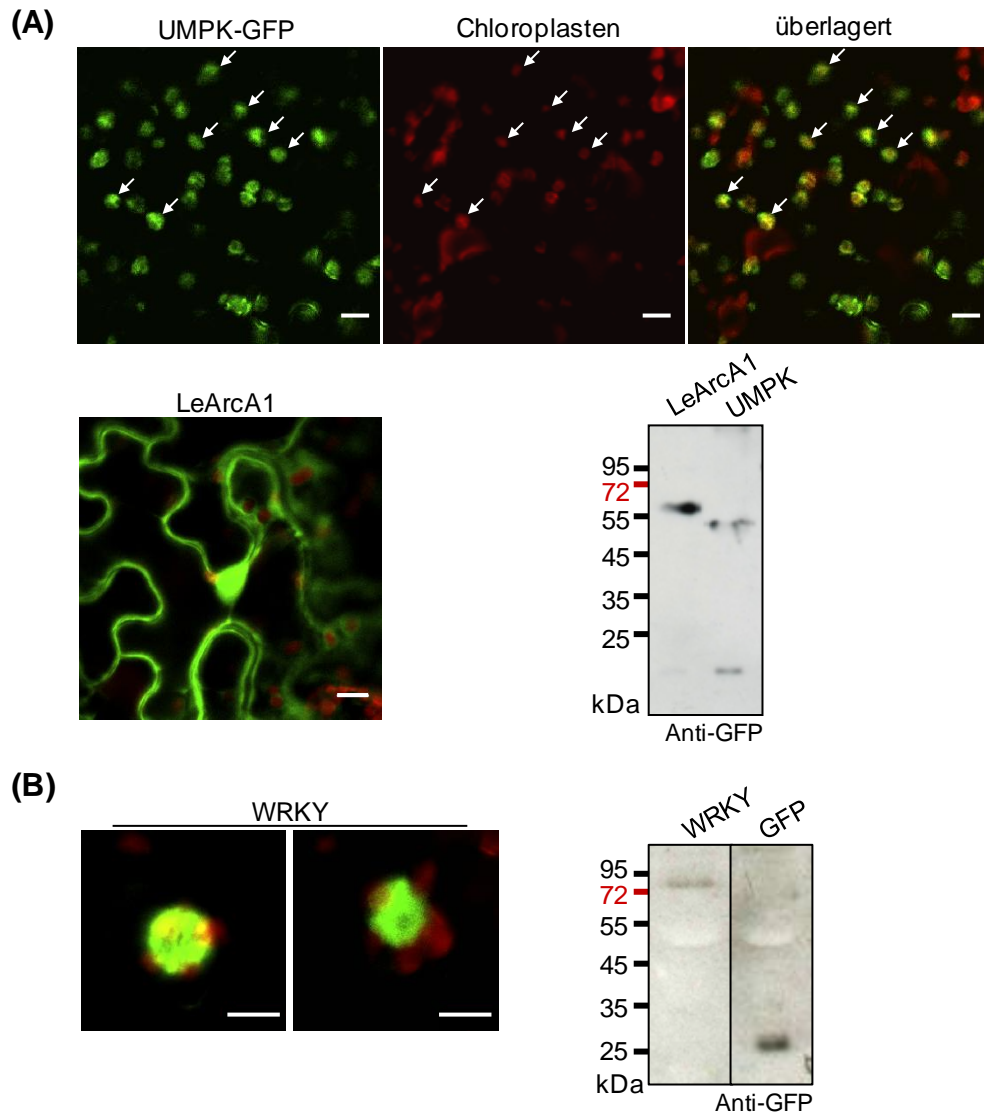


Abbildung 15: Subzelluläre Lokalisierung der XopH-Interaktoren. Alle Proteine wurden als C-terminale GFP-Fusionen mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen LSM zwei Tage nach der Inokulation aufgenommen. (A) Das UMPK ähnliche Protein kolokalisiert mit den Chloroplasten der Zelle. Rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten. LeArcA1 lokalisiert im pflanzlichen Zytoplasma und Zellkern. (B) WRKY1 ist ausschließlich im pflanzlichen Zellkern nachweisbar. Die Expression der GFP-Fusionsproteine wurde durch Immunoblotting und Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers überprüft. Die Experimente wurden mind. zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Um einen Hinweis auf die biologische Relevanz eines Interaktors zu erhalten, ist eine etablierte Methode das Virus-induzierte Gen-Silencing (VIGS, *virus induced gene silencing*) eines Interaktor-Gens in der Pflanze. Anschließend kann man an diesen Pflanzen Veränderungen des durch den Effektor hervorgerufenen Phänotyps untersuchen. Voruntersuchungen ergaben, dass die XopJ-HR in Virus-infizierten Pflanzen nicht reproduzierbar ist. Daher war eine Analyse des Einflusses der Interaktoren auf die HR-Suppression durch XopH nicht möglich.

3.3 Charakterisierung des Typ III-Effektors XopG

3.3.1 XopG hemmt das Wachstum von Xcv

Um den Einfluss von XopG auf die Pathogenität von *Xcv* zu untersuchen, wurde eine genomische *xopG*-Mutante erstellt, bei der ein 201 bp *XhoI*-Fragment einschließlich der ersten 56 nt von *xopG* deletiert wurde (MM). Der entstandene Stamm *Xcv* 85-10 Δ *xopG*, verhielt sich nach Inokulation in hoher Zelldichte in ECW und ECW-10R phänotypisch nicht unterscheidbar zum WT *Xcv* 85-10 (Tabellen 5 und 13). Um kleinere Wachstumsunterschiede in suszeptiblen Pflanzen aufzuspüren, wurden Wachstumskurven durchgeführt. *Xcv* 85-10 Δ *xopG* zeigte ein stärkeres Wachstum im Vergleich zum WT, welches nach einem Tag am größten war, dann abnahm, bis sich beide Stämme wieder angleichen. Abbildung 16 zeigt den Wachstumsunterschied der beiden Stämme nach einem Tag. Das Experiment wurde fünfmal durchgeführt, ein Wachstumsvorsprung der Deletionsmutante war in jedem Fall zu beobachten, schwankte jedoch zwischen den einzelnen Experimenten zwischen zweifach und zehnfach besserem Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT. Abbildung 16 zeigt einen mittleren Wachstumsunterschied.

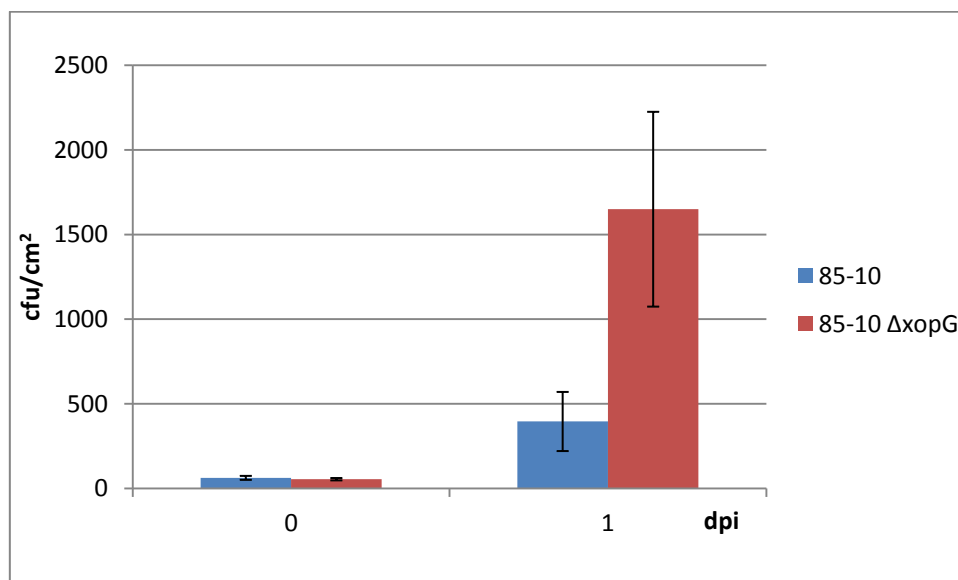


Abbildung 16: Stärkeres Wachstum der XopG-Deletionsmutante im Vergleich zu 85-10 WT. Jeweils 3 Paprikapflanzen wurden großflächig mit einem der *Xanthomonas*-Stämme 85-10 [WT] und 85-10 Δ *xopG* mit einer OD von $0,4 \times 10^4$ cfu/ml inokuliert. Nach 0 und 24 Stunden wurden Blattscheiben ausgestanzt, in der Kugelmühle zerkleinert und anschließend verschiedene Verdünnungsstufen auf NYG-Medium plattiert. Nach 3 Tagen wurden die Kolonien gezählt. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt, die stets einen Wachstumsvorteil für die *xopG*-Deletionsmutante zeigten.

3.3.2 XopG verursacht Zelltod in Paprika ECW

Um XopG phänotypisch zu charakterisieren, wurde XopG N- und C-terminal jeweils mit einem kleineren (4 x c-Myc) oder einem größeren (GFP) Epitop fusioniert und mittels *Agrobacterium* in verschiedenen Pflanzen exprimiert. Dabei zeigte sich, dass XopG in Paprika ECW nach 2-3 Tagen einen HR-ähnlichen Zelltod auslöst, wobei es unerheblich war, ob XopG am N- oder C-Terminus bzw. mit einem größeren oder kleineren Epitop fusioniert war (Abbildung 17). Interessanterweise konnte eine XopG-HR nur auf ECW und ECW-10R Pflanzen beobachtet werden, während auf ECW-30R keine Symptome erkennbar waren (Abbildung 17). Dieser Umstand war unerwartet, da angenommen wird, dass ECW und ECW-30R nahezu isogene Paprikaliniens sind. Die Linien sind durch wiederholte Rückkreuzungen entstanden sind, bei denen nur auf AvrBs3-Resistenz selektiert wurde (Minsavage *et al.*, 1990).

Darüber hinaus löste die Expression von XopG auch in einigen anderen Pflanzen Zelltod aus: in *Nicotiana tabacum* (aber nicht in *N. benthamiana*), in *Nicandra physaloides* und partiellen Zelltod in *Physalis peruviana* (Abbildung 28, Tabelle 4).

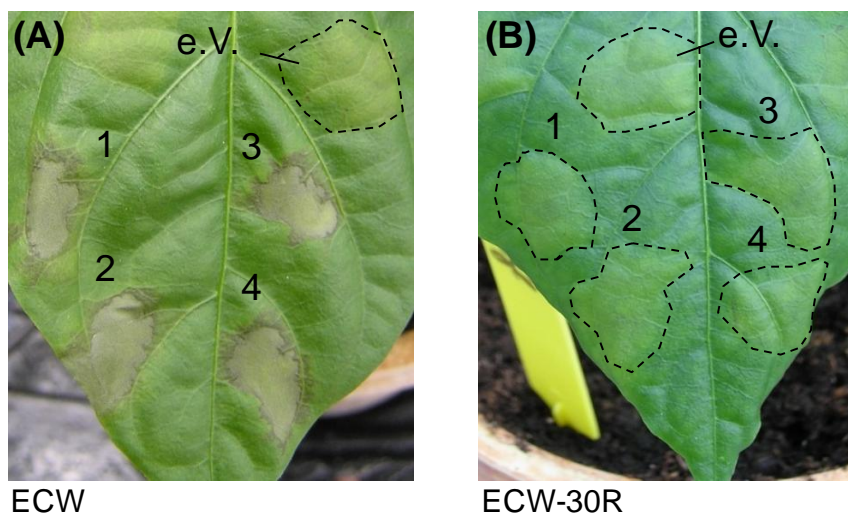


Abbildung 17: Xop G verursacht Zelltod auf Paprika ECW (A), nicht aber auf ECW-30R (B). XopG wurde mit GFP N-terminal (1) und C-terminal (2) sowie mit 4-fach c-Myc N-terminal (3) und C-terminal (4) fusioniert und mittels *Agrobacterium* in Paprika ECW und ECW-30R exprimiert. Als Kontrolle diente das leere Plasmid (e.V.). Nach 2-3 Tagen ist die durch XopG ausgelöste HR sichtbar. 4 dpi wurden die Inokulationsstellen dokumentiert. Die gestrichelten Linien umranden die inokulierten Flächen. Weder N-terminale noch ein C-terminale Fusionen beeinflussen den durch XopG ausgelösten Zelltod.

3.3.3 Der XopG vermittelte Zelltod wird polygenisch verursacht

Der Unterschied zwischen den Paprikaliniens ECW und ECW-30R sollte in erster Linie im Bs3-Lokus liegen. Um herauszufinden, ob Bs3 der Grund dafür ist, dass die XopG in ECW-30R Pflanzen keine HR auslöst, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Erstens wurden der direkte Einfluss des Bs3-Gens und des Bs3-Proteins (Römer *et al.*, 2007b) untersucht: *xopG* und *Bs3* unter Kontrolle des nativen Promotors bzw. *xopG* und *Bs3* unter Kontrolle des 35S-Promotors (Tabelle 3) wurden jeweils parallel mittels *Agrobacterium* in ECW-Pflanzen übertragen, um zu untersuchen, ob auch in diesem Fall die XopG-HR ausbleibt. Jedoch war in beiden Fällen eine deutliche XopG-HR sichtbar. Eine mögliche direkte Suppression der XopG-HR durch das Bs3-Protein oder ein Einfluss durch die Anwesenheit des Bs3-Gens konnte somit ausgeschlossen werden.

Als Zweites war interessant, ob die Abwesenheit des *Bs3*-Gens für die XopG-HR verantwortlich ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die F2-Generation einer Kreuzung zwischen ECW und ECW-30R analysiert (U. Bonas unveröffentlicht). In 2 unabhängigen Experimenten wurden jeweils ca. 40 F2-Pflanzen mit Agrobakterien, welche XopG in die Pflanze übertragen und einem Stamm, der AvrBs3 in die Pflanze überträgt, inokuliert. Als Kontrollpflanzen dienten ECW und ECW-30R, die wie erwartet auf die Expression der entsprechenden Gene reagierten (Tabelle 5). Von den 87 getesteten F2-Pflanzen zeigten 64 eine AvrBs3-spezifische HR. Weitere 22 Pflanzen reagierten weder auf AvrBs3 noch auf XopG (Tabelle 5). Keine der Pflanzen reagierte spezifisch auf XopG. Das zeigt, dass obwohl in einigen Pflanzen kein funktionelles *Bs3* vorliegt, trotzdem keine XopG-HR ausgelöst wurde. Eine Pflanze verhielt sich jedoch verschieden von den anderen. Sie reagierte auf beide Agrobakterienstämme stark und warf kurze Zeit später, anders als alle anderen Pflanzen, alle Blätter mit Inokulationsstellen ab. So wirkte dies eher wie eine Überreaktion der Pflanze, nicht wie eine spezifische Reaktion, die aber hier dennoch nicht unerwähnt bleiben soll.

Die Reaktion der F2-Population auf AvrBs3 entsprach der erwarteten 3:1 Aufspaltung für einen einfachen dominanten Erbgang. Jedoch spaltete sich die XopG-HR nicht in der F2-Generation auf, sondern keine der Pflanzen (mit der erwähnten Ausnahme) reagierte auf XopG. Das lässt vermuten, dass es sich bei der Reaktion auf XopG um keine Gen für Gen Antwort handelt, sondern vermutlich mehrere Gene daran beteiligt sind.

Tabelle 5: Keine Aufspaltung der XopG-HR in der F2-Generation einer Kreuzung aus ECW- und ECW-30R-Paprikapflanzen.

Pflanzen	Pflanzenanzahl	AvrBs3	XopG
ECW		---	HR
ECW-30R		HR	---
F2-Generation	64 x	HR	---
	22 x	---	---
	1 x	(HR)	(HR)

Die Paprikaliniien ECW und ECW-30R wurden sowohl mit Agrobakterien inokuliert, die XopG exprimieren, als auch mit Agrobakterien, die AvrBs3 exprimieren. Die Phänotypen wurden 4 dpi protokolliert. --- bedeutet keine Reaktion an der Inokulationsstelle. Die Zahlen umfassen zwei unabhängige Experimente mit insgesamt 87 F2-Pflanzen.

3.3.4 XopG lokalisiert im pflanzlichen Zellkern und Nukleolus

Wie zuvor beschrieben (3.1.2.1), wurde die subzelluläre Lokalisierung von XopG mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht. Teile der infiltrierten Blattbereiche wurden nach 1 bzw. 2 Tagen mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM) untersucht. Es zeigte sich für beide Fusionsproteine nach einem Tag eine deutliche Fluoreszenz im Kernbereich und dort besonders sichtbar im Nukleolus (Abbildung 18b). Nach längerer Überexpression (>24 Stunden) waren Teile des Proteins auch im Zytoplasma sichtbar. Dies ist möglicherweise eine Folge von Proteinabbau (Abbildung 18c).

3.3.5 Zinkbindemotiv ist essentiell für die Auslösung einer HR, beeinflusst aber nicht die Lokalisierung von XopG

XopG besitzt, genau wie die homologen Proteasedomänen der Tetanus- und Clostridium-Neurotoxine, ein Zinkbindemotiv, welches durch bestimmte konservierte Reste (Abbildung 5) repräsentiert wird (M27 Familie, MEROPS Akzession MER01174). Wird nun das Glutamat an Position 174 gegen Alanin ausgetauscht, so ist aus Studien an Botulinum-Neurotoxin A bekannt, dass die Proteaseaktivität vollständig zerstört wird, jedoch die Faltung des Proteins wird, anders als bei Punktmutationen an anderen Positionen, kaum beeinflusst (Rigoni *et al.*, 2001). Diese Punktmutation wurde nun auch in XopG durch zielgerichtete Mutagenese eingeführt und das entstandene mutagenisierte Protein XopG_{E174A} auf seine Funktion in der Pflanze getestet. Dazu wurden XopG und XopG_{E174A} mittels *Agrobacterium* in ECW-Pflanzen exprimiert. Es zeigte sich, dass die Zelltodreaktion durch diesen Aminosäureaustausch vollständig ausbleibt (Abbildung 18a). Die subzelluläre Lokalisierung im Zellkern und Nukleolus blieb davon allerdings unberührt. Beide Proteine wurden mit GFP fusioniert mittels

Agrobacterium in ECW-Pflanzen exprimiert und 1,5 dpi mit dem LSM analysiert. XopG_{E174A} lokalisiert im Zellkern und Nukleolus, genau wie das WT-Protein (Abbildung 18b).

Da angenommen wird, dass die 3-D Struktur von XopG relativ unverändert blieb und der einzige Unterschied im aktiven Zentrum der putativen Protease liegt, ist nicht unwahrscheinlich, dass auch XopG eine Proteaseaktivität besitzt, die für die Funktion in der Pflanze essentiell ist. Diese Schlussfolgerung stützt sich jedoch nur auf Vermutungen, da eine enzymatische Aktivität für XopG bisher nicht nachgewiesen werden konnte (R. Szczeny, unveröffentlicht).

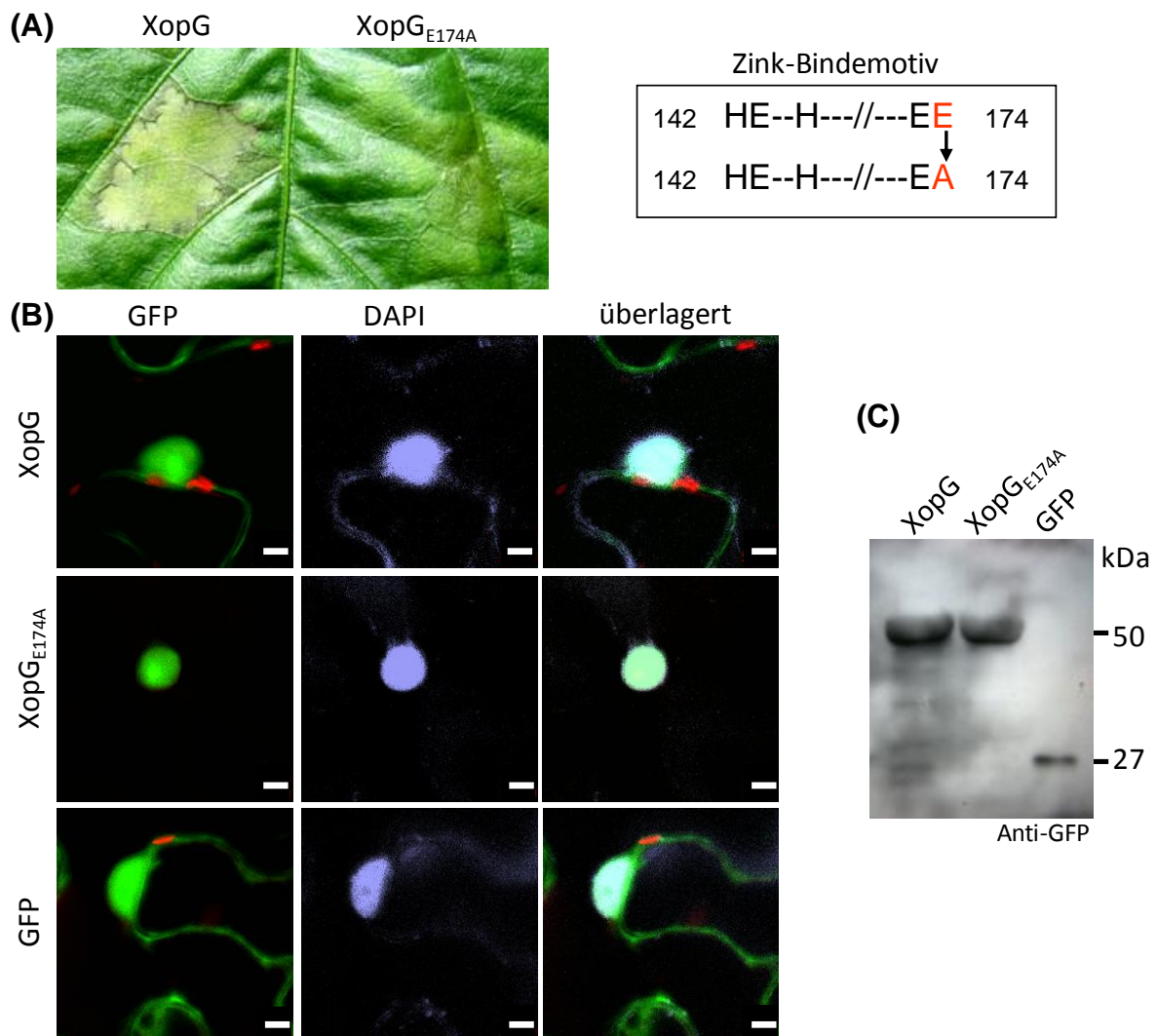


Abbildung 18: Punktmutation E174A im Zinkbindemotiv verhindert die XopG-HR, Lokalisierung von XopG im pflanzlichen Zellkern und Nukleolus, wird durch diese Mutation nicht beeinflusst. XopG und XopG_{E174A} wurden im Vektor pK7FWG2 mit N-terminalem GFP-tag mittels *Agrobacterium* in der Pflanze exprimiert. (A) Expression in Paprika ECW, 3dpi; Das Kasten zeigt die konservierten Reste des Zink-Bindemotives von XopG, mit der Glutaminsäure (E) an Position 174, die gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, um eine inaktive Variante von XopG zu erhalten. (B) Expression in *N. benthamiana*, 1,5 dpi. Um Zellkerne zu visualisieren, erfolgte 36 h nach Infektion eine Infiltration mit DAPI-Lösung. Eine Stunde später wurde Blattmaterial geerntet und mikroskopisch mit Hilfe des konfokalen LSM unter Verwendung spezifischer Filter für EGFP und DAPI ausgewertet. Rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. (C) Nachweis der GFP-Fusionen mittels Immunoblotting. Blattscheiben wurden nach 1,5 Tagen geerntet, die Zellen aufgeschossen und die Proteinextrakte mittels Immunoblotting unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers analysiert.

3.3.6 Kernlokalisierung ist notwendig für die Funktion von XopG

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Lokalisierung im Zellkern und Nukleolus notwendig für die Funktion von XopG ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde XopG an ein NES-Motiv (*nuclear export signal*) N- bzw. C-terminal fusioniert. Die XopG Fusionsproteine wurden mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zur Visualisierung sind sie zusätzlich mit GFP gekoppelt. Beide Fusionsproteine waren schwach exprimiert, so dass sie in der Immunoblotanalyse kaum sichtbar waren (Abbildung 19e). Nach 2 Tagen war jedoch unter dem konfokalen LSM die Fluoreszenz einiger Zellen zu erkennen. Die N-terminale Fusion NES-XopG ist unverändert zu XopG allein im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 19). Die Gründe dafür sind nicht bekannt, es könnte eine Abspaltung des Proteins vom NES-Signal vorliegen. Trotz der deutlich schwächeren Protein-Expression, ist dieses Fusionsprotein in einigen Experimenten in der Lage eine HR zu induzieren (Abbildung 19d). Diese HR war jedoch nur auf jüngeren Paprikablättern reproduzierbar, was anscheinend mit dem niedrigen Expressionslevel zusammenhängt. XopG-NES ist hingegen, wie erwartet, zum größten Teil im Zytoplasma und nicht mehr im Kern oder im Nukleolus zu finden (Abbildung 19c). Dieses kernausschlossene Fusionsprotein war in keinem der Experimente mehr in der Lage, eine HR in Paprika ECW auszulösen (Abbildung 19d). Es ist nicht wahrscheinlich, dass die Lage des Epitops zum Verlust der HR führt, da bereits zuvor gezeigt wurde, dass es keinen Einfluss hat, ob XopG als N- oder C-terminale Fusion exprimiert wird (Abbildung 17). Somit kann davon ausgegangen werden, dass XopG, um eine Zelltodreaktion hervorzurufen, im Zellkern und/oder Nukleolus lokalisiert sein muss.

3.3.7 Wird die XopG-HR in Xcv von einem anderen Effektor unterdrückt?

Wie oben beschrieben, löst XopG, wenn es mittels *Agrobacterium* exprimiert wird, eine HR in ECW Pflanzen aus. Die Paprikalinie ECW ist jedoch suszeptibel bei Infektion mit *Xcv* 85-10; in dessen Genom XopG konstitutiv exprimiert wird (Thieme, 2006). Deshalb lag nahe zu überprüfen, ob die XopG-Erkennung in ECW Pflanzen unter natürlichen Bedingungen von einem anderen *Xcv*-Effektor unterdrückt wird. Um sich dieser Möglichkeit zu nähern, wurde XopG mit allen Typ III-Effektoren in Paprika ECW koexprimiert, die in unserem Labor vorlagen: XopB, XopC, XopD, XopE1, XopE2, XopF, XopH, XopI, XopJ, XopL, XopM, XopK, XopR, XopS (Kapitel 3.5), AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3, AvrBs4, AvrRxv, HpaA. Für jedes dieser Effektorgene lag ein einzelnes Binärvektor-Expressionskonstrukt unter Kontrolle

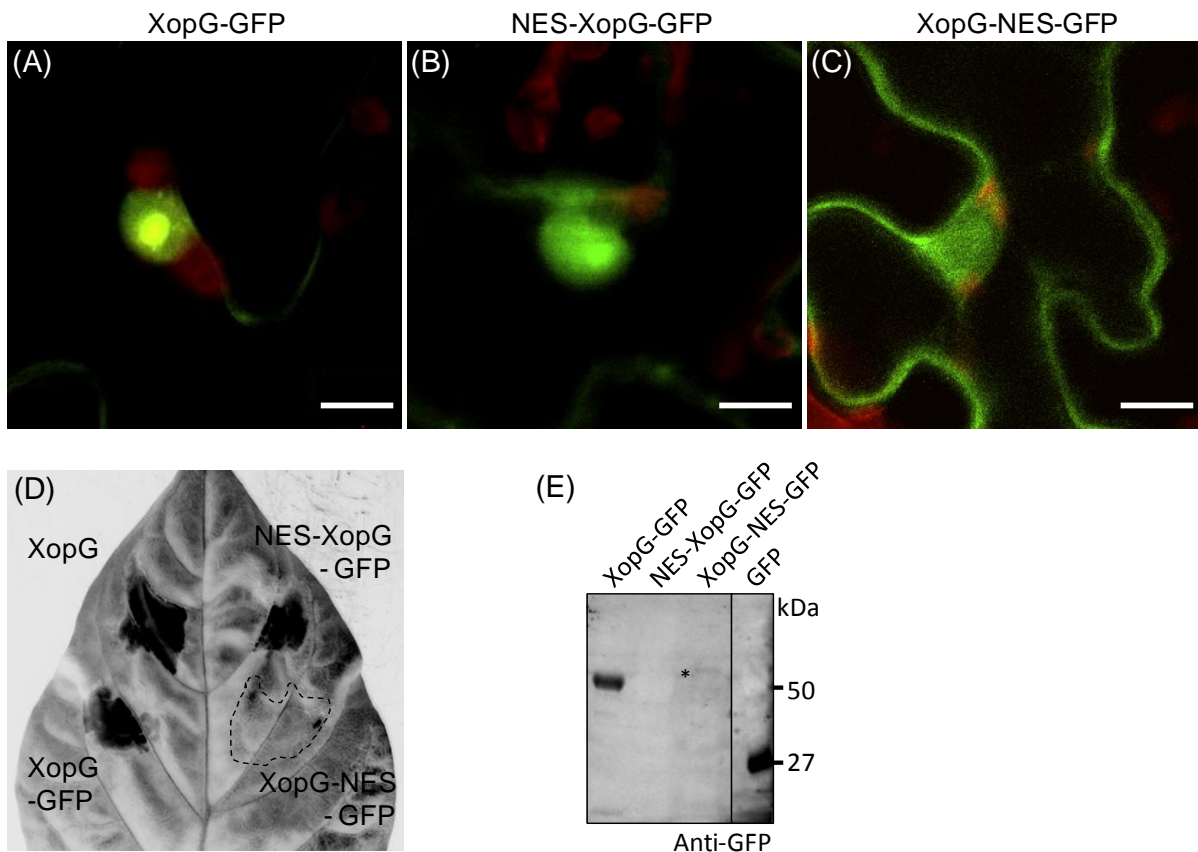


Abbildung 19: Lokalisierung von XopG im Nucleus/Nukleolus scheint wichtig für die Funktion in der Pflanze. Ein NES-Signal wurde N- bzw. C-terminal an *xopG-gfp* fusioniert. Die Fusionsproteine wurden mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. (A)-(C) Aufnahmen mit dem konfokalen LSM. Grün: GFP-Fluoreszenz, rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. Die weißen Balken entsprechen 10 μ m. (A) Die Lokalisierung von XopG wurde wegen der stärkeren Expression 1 dpi aufgenommen. (B)+(C) Die Fluoreszenz der NES-Fusionen wurde 2 dpi dokumentiert. (D) Infiltration der Agrobakterienstäme in Paprika ECW. XopG-GFP und NES-XopG-GFP lösen eine HR aus. XopG-NES-GFP löst keine HR aus. XopG ohne GFP diente als zusätzliche phänotypische Kontrolle. Die Phänotypen wurden 4 Tage nach Inokulation dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter unter UV-Licht fotografiert. (E) Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Immunoblotting unter Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers analysiert. Das Fusionsprotein NES-XopG-GFP war nicht und XopG-NES-GFP sehr schwach nachweisbar (*). Die Analysen wurden mind. zweimal durchgeführt.

eines 35S-Promotors in *Agrobacterium* vor oder wurde während dieser Arbeit erstellt (Referenzen Tabelle 3). Die Agrobakterienstäme wurden auf eine OD von 0,8 eingestellt und jeweils im Verhältnis 1:1 mit *Agrobacterium* (pGWB17-*xopG*) gemischt und anschließend in Paprika ECW inokuliert. Nur XopB hat einen Effekt auf die XopG-HR, es reduzierte die Zelltodreaktion deutlich, die Expression der anderen Effektoren beeinflusste die XopG-Reaktion nicht (Abbildung 20).

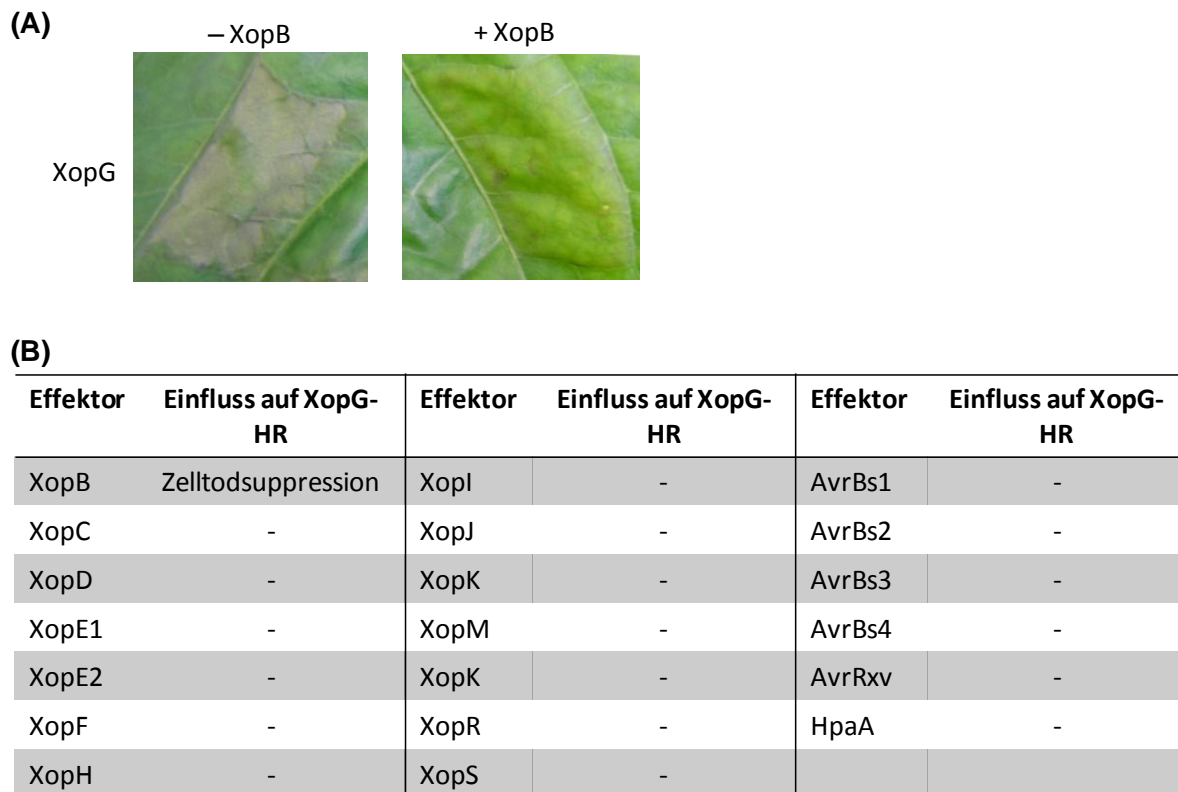


Abbildung 20: XopB unterdrückt die XopG-HR. Der Stamm GV3101 (pGWB17-*xopG*) wurde im Verhältnis 1:1 mit Agrobakterienstämmen gemischt, die jeweils einen unter (B) aufgeführten Effektor unter Kontrolle eines 35S Promotors exprimieren oder als Kontrolle mit *Agrobacterium* ohne zusätzliches Effektorprotein und in Paprika ECW inokuliert. Zuvor wurde die OD₆₀₀ aller Agrobakterienstämmen auf 0,8 eingestellt. Die gemischte Inokulation von *xopG* mit *xopB* zeigte als einzige eine reduzierte XopG-HR. (A) Die XopG-HR wird vollständig unterdrückt, wenn man die beiden Stämme im Verhältnis 2:3 (XopG : XopB) mischt. Zuvor wurde die OD₆₀₀ der Agrobakterienstämmen auf 1,0 eingestellt. Als Kontrolle wurde der XopG-exprimierende Stamm mit einem *Agrobacterium*-Stamm gemischt, der GFP in die Pflanze überträgt (– XopB). Nach 3 Tagen ist eine deutliche durch XopG ausgelöste Zelltodreaktion erkennbar. Die Bilder wurden 4 Tage nach Infiltration aufgenommen.

3.3.8 Keine direkte Interaktion zwischen XopG und XopB

Um die Frage zu beantworten, ob XopB die XopG-HR durch direkte Bindung an XopG unterdrückt, wurden Interaktionsstudien im Hefe-2-Hybrid-System durchgeführt. Dazu wurden XopG und XopB jeweils als Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne oder der Aktivierungsdomäne in Hefe exprimiert. Als Spezifitätskontrollen dienten XopG_{E174A} und LaminC. Die Hefestämme wurden nach erfolgreicher Kotransformation auf selektives Medium getropft. Wachstum auf SD/-TL wird durch die Anwesenheit beider Plasmide pGBST7 und pGADT7 ermöglicht. Wachstum auf SD /-THAL erfolgt nur bei Bindung beider Proteine. Es ist keine Interaktion von XopG und XopB nachweisbar (Abbildung 21). Weiterhin kann man beobachten, dass weder XopG noch XopB dimerisieren. LaminC interagiert, wie bekannt, mit sich selbst und eine Interaktion mit XopG_{E174A} war zu beobachten. Diese Interaktion erschien jedoch schwächer, da im Fall der Interaktion von BD-

LamC mit AD-XopG_{E174A} erst nach 2 Tagen einige Einzelkolonien sichtbar waren, im Vergleich zum flächendeckenden Wachstum bei direkter Interaktion von LaminC mit sich selbst. Bei der umgekehrten Fusion der Domänen, war keine Blaufärbung zu beobachten.

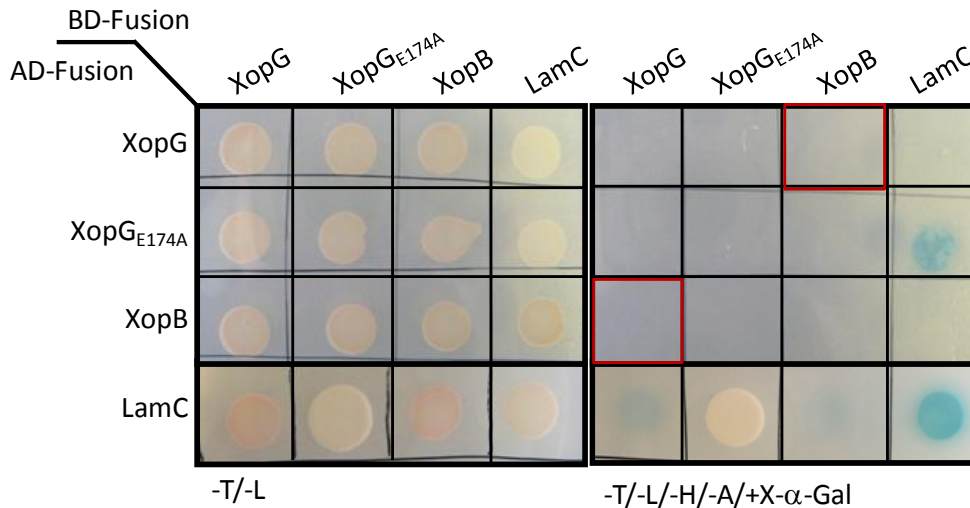


Abbildung 21: XopB und XopG binden im Gal4 Hefe-2-Hybrid-System nicht aneinander. Alle Proteine wurden als BD-Fusionen bzw. AD-Fusionen wie angegeben gemeinsam mit dem jeweiligen potentiellen Interaktionspartner in Hefe AH109 exprimiert. Hefezellsuspensionen wurden auf selektives Medium getropft. Das Wachstum wurde nach 2 Tagen dokumentiert. Die Anwesenheit beider Expressionsplasmide wurde durch Wachstum auf SD-Medium $-T/-L$ überprüft. Wachstum und Blaufärbung auf SD $-T/-L/-H/-A/+X-\alpha$ -Gal bedeutet Interaktion beider Proteine. Zwischen XopB und XopG findet keine Interaktion statt.

3.3.9 Deletion des Zelltods Suppressors XopB führt zu keiner Veränderung des Phänotyps von Xcv 85-10 auf Paprika ECW

Da XopB die XopG-HR unterdrückt, stellte sich nun die Frage, ob ein *Xanthomonas*-Stamm ohne XopB eine HR in Paprika ECW auslöst. Es war jedoch bereits bekannt, dass eine *Xcv* 85-10 Δ *xopB* Mutante keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum WT-Stamm hat (Noël *et al.*, 2001). Um mögliche kleinere Unterschiede festzustellen, wurde eine Wachstumskurve von einem *xopB*-Deletionsstamm, in dem zusätzlich XopG von dem Plasmid pDGW4M unter Kontrolle eines starken Promotors (*triple lac*) exprimiert wird, erstellt. Als Kontrollen dienten ein 85-10 WT-Stamm, in dem XopG überexprimiert wurde und die XopG_{E174A} Mutante die ebenfalls im 85-10 Δ *xopB* Hintergrund überexprimiert wurde, um zu sehen, welchen Einfluss das Zink-Bindemotiv von XopG hat.

Wie erwartet wuchs die XopB Deletionsmutante unverändert zum 85-10 WT (Noël *et al.*, 2001). Wird XopG in der Deletionsmutante überexprimiert, erreichen die *Xanthomonas* nur noch ca. ein Fünftel der Zelldichte. Dasselbe trifft jedoch auch für die Expression von XopG

im 85-10 WT-Hintergrund und für die Expression der XopG_{E174A} Mutante zu. Ein spezifischer Effekt der Überexpression von XopG in *Xcv* 85-10 Δ xopB ist nicht festzustellen.

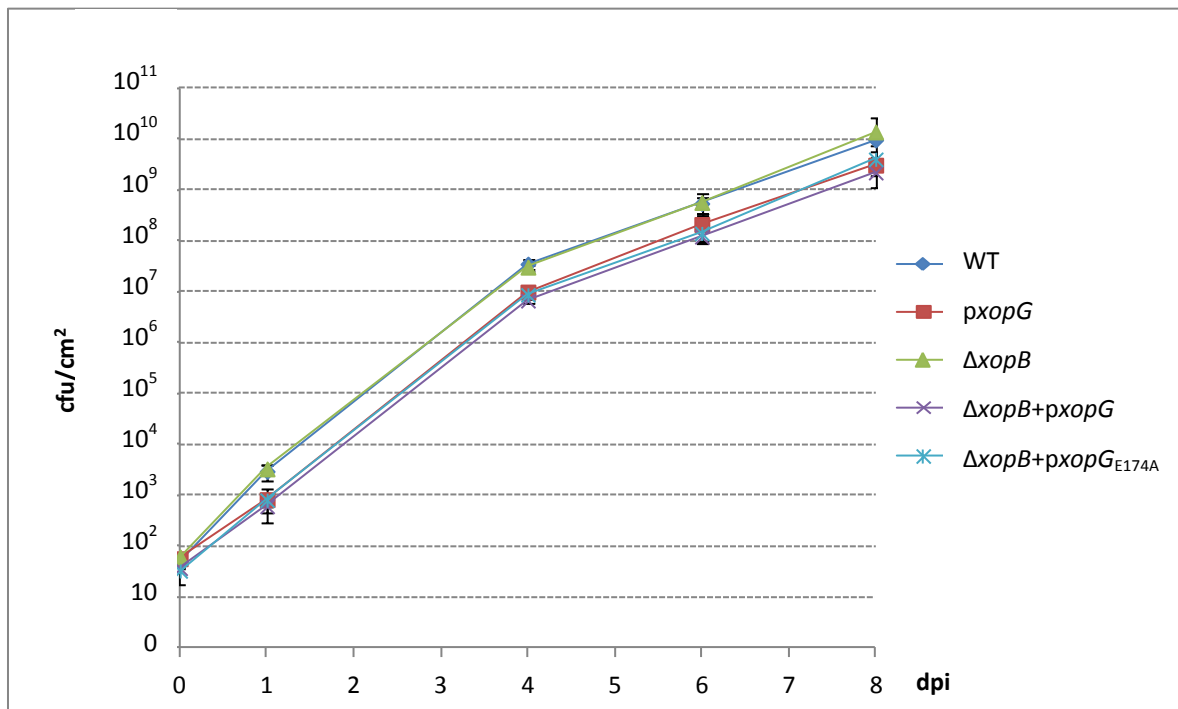


Abbildung 22: Deletion des Suppressors XopB hat auch bei Überexpression von XopG keinen Einfluss auf das Wachstum von *Xcv* 85-10 in Paprika ECW. Jeweils 3 Paprikapflanzen wurden großflächig mit einem der *Xanthomonas*-Stämme 85-10 [WT], 85-10 Δ xopB, 85-10(pGWB4M-xopG) [pxopG], 85-10 Δ xopB(pGWB4M-xopG) und 85-10 Δ xopB(pGWB4M-xopG_{E174A}) mit einer OD von $0,4 \times 10^4$ cfu/ml inokuliert. Nach entsprechender Anzahl von Tagen wurden Blattscheiben ausgestanzt, in der Kugelmühle zerkleinert und anschließend verschiedene Verdünnungsstufen auf NYG-Medium plattiert. Jeweils nach 3 Tagen wurden die Kolonien gezählt und in einer Wachstumskurve zusammengefasst. Die Ergebnisse sind von einem repräsentativen Experiment.

3.3.10 Das Signal für die Kernlokalisierung von XopG liegt in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Für die Lokalisierung im Nukleolus ist zusätzlich der N-Terminus wichtig.

In silico-Analysen der XopG-Aminosäuresequenz ergaben als wahrscheinlichste subzelluläre Lokalisierung den Zellkern (www.WoLFPSORT.org), jedoch wurde kein spezifisches Kernlokalisierungssignal vorausgesagt (PredictNLS, www.predictprotein.org). Darüber hinaus gibt es in der Literatur bereits Vorhersagen für mögliche Nukleolus-Lokalisierungssequenzen, die jedoch so divers sind, dass bisher keine *in silico* Vorhersage möglich ist (Emmott und Hiscox, 2009). Es wird beschrieben, dass ein (R/K)(R/K)X(R/K)-Motiv einzeln oder mehrmals in einer Reihe bei nukleolar lokalisierten Proteinen vorkommt (Horke *et al.*, 2004; Emmott und Hiscox, 2009). Ein ähnliches Motiv konnte in XopG an den Aminosäurepositionen 54-58 identifiziert werden und umfasst die Aminosäuren RKNRK (Abbildung 23). Ein weiteres ähnliches Signal ist am C-terminalen Ende von XopG lokalisiert

mit der Sequenz RKKYK. Um zu untersuchen welcher Bereich von XopG für die Kernlokalisierung notwendig ist und ob diese Kernlokalisierung in jedem Fall mit der Fähigkeit eine HR auszulösen korreliert, wurde XopG in 2 Hälften mit je einer putativen Kernlokalisierungssequenz geteilt. Außerdem wurde ein N-terminal um 51 Aminosäuren verkürztes Derivat von XopG erstellt, welches beide putativen Kernlokalisierungssequenzen enthält. Zur Visualisierung in der Pflanzenzelle wurden alle XopG-Derivate mit GFP fusioniert, resultierend in den Konstrukten *gfp-xopG_{ΔN51}*, *xopG_{N107}-gfp*, *gfp-xopG_{N107}* und *gfp-xopG_{C106}*. Alle XopG-Derivate wurden gemeinsam mit *gfp-xopG*, *xopG-gfp* und *gfp* mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert.

Das GFP-XopG_{ΔN51}-Fusionsprotein lokalisiert in LSM-Analysen wie das WT-Protein im Zellkern und in einigen, aber nicht allen Zellkernen im Nukleolus (Abbildung 23d), jedoch war dieses Fusionsprotein mittels Immunoblotting unter Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers nicht nachweisbar (Abbildung 23c). Dieses Protein war auch nicht mehr in der Lage, eine Zelltodreaktion in ECW hervorzurufen (Abbildung 23). Es ist unklar, ob die geringe Expression der Grund für das Fehlen der Zelltodreaktion ist, jedoch wurde während dieser Arbeit beobachtet, dass auch die *Agrobacterium*-vermittelte Expression von *xopG* unter Kontrolle eines schwächeren Promotors eine HR auslöst. Die ersten 51 Aminosäuren von XopG sind also möglicherweise essentiell für das Auslösen einer HR.

Der N-Terminus von XopG scheint notwendig aber nicht hinreichend zum Auslösen einer Zelltodreaktion zu sein, denn weder XopG_{N107} noch XopG_{C106} riefen in Paprika ECW eine sichtbare Reaktion hervor (Abbildung 23). Demzufolge sind der N-Terminus wie auch der C-Terminus notwendig, aber nicht hinreichend für die HR in Paprika ECW. XopG_{C106} ist im Zellkern lokalisiert, während XopG_{N107} im Kern und Zytoplasma verteilt und von der GFP Kontrolle nicht unterscheidbar ist (Abbildung 23). Es kann daher angenommen werden, dass das Signal für die Kernlokalisierung in der C-terminalen Hälfte des Proteins liegt, hier ist auch eines der putativen Kernlokalisierungssignale zwischen den Aminosäurepositionen 205 und 209 beheimatet. Für die Lokalisierung im Nukleolus ist jedoch zusätzlich der Bereich zwischen den Aminosäuren 51 bis 106 wichtig, in diesem Bereich ist das zweite putative Kernlokalisierungssignal, oder möglicherweise Nukleoluslokalisierungssignal, lokalisiert.

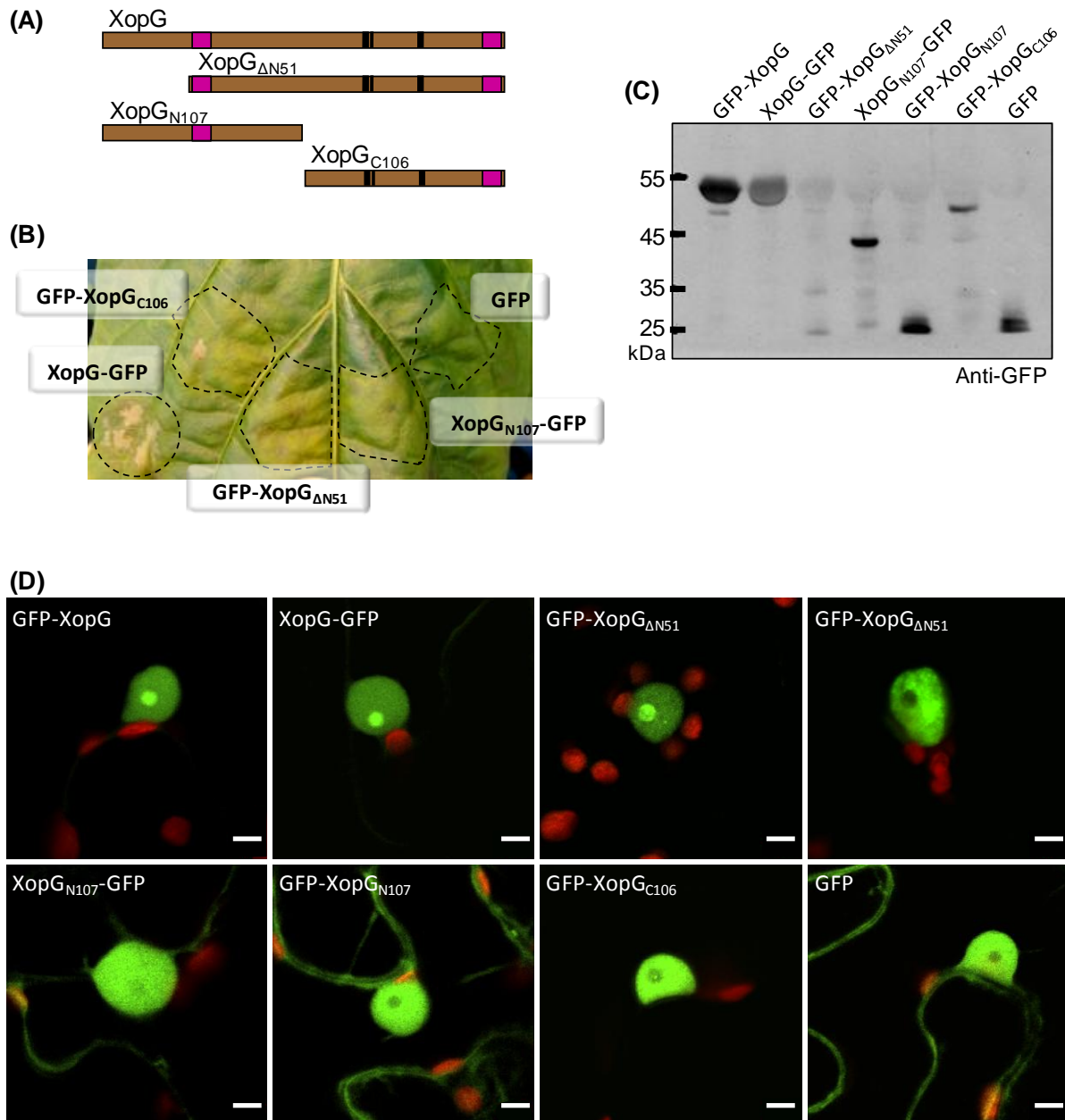


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisierung und Expression von XopG-Deletionsderivaten *in planta*. Agrobakterienstämme die T-DNA Transfer von *gfp-xopG*, *xopG-gfp* (1), *gfp-xopG Δ N51* (2), *xopG Δ N107-gfp* (3), *gfp-xopG Δ N107*, *gfp-xopG Δ C106* (4), *gfp* (GFP) vermitteln, wurden in Paprika und *N. benthamiana* inokuliert. (A) Schematische Darstellung der XopG-Derivate. Die schwarzen Balken in der C-terminalen Hälfte symbolisieren das Zink-Bindemotiv, die violetten Bereiche sind Motive, die Kernlokalisierungssignale (RKNRK) und (RKKYK). (B) Phänotypen nach Inokulation der oben mit Zahlen markierten Agrobakterienstämme in Paprika ECW, die Bilder wurden 3 dpi aufgenommen. (C) Expression der XopG-Derivate in der Pflanze. 2 Tage nach Inokulation wurden Blattscheiben aus *N. benthamiana* entnommen und nach erfolgreichem Zellaufschluss mittels Immunoblotting mit einem GFP-spezifischen Antikörper analysiert. Das GFP-XopG Δ N51 Fusionsprotein war im Immunoblot nicht sichtbar, von GFP-XopG Δ N107 wurde anscheinend GFP abgespalten. Es wurde für die phänotypischen Analysen nicht verwendet. (D) Konfokale Laserscanning Mikroskopie von *N. benthamiana*-Blättern zeigt die GFP-Fusionen 24 h nach Infiltration. Das Signal für die Kernlokalisierung liegt in der C-terminalen Hälfte des Proteins, für die Lokalisierung im Nukleolus ist außerdem der N-Terminus notwendig. Für GFP-XopG Δ N51 wurden sowohl Zellkerne mit als auch ohne fluoreszierenden Nukleolus detektiert, weshalb 2 repräsentative Zellkerne dargestellt sind. Rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. Die weißen Balken entsprechen 5 μ m. Die Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

3.3.11 Identifizierung pflanzlicher Zielproteine von XopG mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung

Um Aufschluss über die Funktion von XopG zu erhalten, wurde mit Hilfe von Y2H-Sichtungen nach pflanzlichen Zielproteinen gesucht (vergl. 3.1.2.2 und 3.2.6). XopG in voller Länge diente dabei als Köder. Die alleinige Expression XopG-BD in Hefe führte nicht zur Autoaktivierung der Reportergene, so dass das Fusionsprotein als Köder genutzt wurde. Nach erfolgter Paarung des Köderstammes mit der zuvor genutzten Y2H-Bibliothek mit cDNA-Klonen aus Tomate (*Solanum lycopersicum* Kultivar Moneymaker; D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas) wurde die Anzahl der Diploiden durch Plattieren verschiedener Verdünnungsstufen des Paarungs-Ansatzes auf $3,4 \cdot 10^7$ bestimmt. Insgesamt wurden ca. 200 Kolonien von dem auf Proteinbindung selektierenden Agarplatten isoliert, von denen anschließend 160 näher untersucht wurden. Beim Spezifitätstest reagierten 37 der 160 Kandidaten spezifisch mit XopG aber nicht mit LaminC. Bei der Sequenzierung der cDNA-Fragmente dieser 37 Kandidaten wurde eine Sequenz, die für ein Protein mit einer SPRY (*SP1A* and *ryanodine receptor*) -Domäne kodiert, insgesamt 5-mal isoliert, wobei es sich um Fragmente von unterschiedlicher Länge handelte. Proteine mit SPRY-Domänen haben Funktionen in der Signaltransduktion, z.B. der Calcium-Signaltransduktion, die genaue Funktion der SPRY-Domäne ist jedoch nicht bekannt. Weiterhin wurde ein Porin identifiziert, dessen Lokalisierung in der äußeren mitochondrialen Membran vorhergesagt ist, und ein Serin/Arginin-reiches Protein, welches eine RNA-Bindestelle, ein sogenanntes RNA recognition motif (RRM), besitzt. Auffällig war, dass sich unter den isolierten cDNA-Fragmenten oft sehr kurze Fragmente mit polyA-Sequenzen befanden und sogar Fragmente, die ausschließlich aus Adenin bestanden. Somit ist es auch möglich, dass XopG bevorzugt an poly-Lysin bindet. Eine vollständige Aufstellung der Kandidaten ist in Tabelle 6 zu finden, die 3 genannten Kandidaten wurden für *in planta* Analysen ausgewählt.

Tabelle 6: Auflistung der XopG-Interaktoren.

Homologie des Interaktors	EST-Nummer	Wie oft gefunden?	Bemerkungen
Protein mit SPRY-Domäne	TC236577	5 x	SPRY (SP1A und Ryanodin Rezeptor), cDNA-Fragmente ca. 880-930 bp
Porin „outer mitochondrial protein“	TC218696	1 x	PolyA am 3'-Bereich des cDNA-Fragments, Gesamtlänge cDNA 760 bp
Ser / Arg reiches Protein	TC242020	1 x	RNA recognition motif (RRM),

Homologie des Interaktors	EST-Nummer	Wie oft gefunden?	Bemerkungen
(RRM)			cDNA 885 bp
V-ATP Synthase (16 kDa <i>proteolipid subunit</i>)	TC218282, TC217887	1 x	nicht <i>in frame</i> , cDNA 500 bp
60 S ribosomales Protein	TC220216	1 x	nur 72% Identität zum EST aus Tomate, 760 bp
UMPK-like, Phosphoribulokinase-like	TC 197135	2 x	
Chlorophyll a-b bindendes Protein	LOC543976	7 x	
kurze Fragmente mit polyA am N- oder C- Terminus	-	4 x	wahrscheinlich falsch Positive
poly A	-	14 x	

3.3.12.1. Isolierung der vollständigen DNA-Sequenzen der Interaktoren

Für die Interaktoren SPRY und Porin wurden RACE-PCRs durchgeführt, um die vollständigen Sequenzen der Gene zu erhalten. Es wurde für das Porin ein ORF mit einer Länge von 831 bp mit Sequenzinformation stromaufwärts und stromabwärts des kodierenden Bereiches isoliert (siehe Anhang). Für das SPRY-Protein wurden ebenfalls 5'-und 3'-Fragmente isoliert, aus diesen resultiert einen ORF von 1341 bp Länge (siehe Anhang). Für das Serin/Arginin-reiche Protein RRM waren aufgrund des zum cDNA-Fragment identischen EST TC242020 aus Tomate ausreichend Sequenzinformationen stromaufwärts des ersten ATG vorhanden, so dass keine RACE-PCR notwendig war. Der ORF dieses RNA-Bindeproteins umfasst 1251 bp (siehe Anhang).

3.3.12 SPRY und RRM sind im pflanzlichen Zellkern lokalisiert

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die im Y2H-System identifizierte Bindung von XopG an SPRY und RRM auf die Pflanze übertragbar ist. Zuvor wurde jedoch untersucht, ob die Interaktoren wie XopG im Zellkern lokalisiert sind. Dazu wurden GFP-Fusionen im Plasmid pK7FWG2 erstellt. Nach Expression der Fusionsproteine mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* war nach 36 Stunden GFP-Fluoreszenz von SPRY-GFP und RRM-GFP im pflanzlichen Zellkern zu sehen (Abbildung 25b). Sie kommen also als Interaktoren von XopG

in Frage. Porin ist zytoplasmidär lokalisiert und Kernausgeschlossen (Abbildung 25aI). Diese Lokalisierung ändert sich auch nicht, wenn XopG-myc mit Porin koexprimiert wird (Abbildung 25aII). Die Expression der GFP-Fusionsproteine wurde durch Immunoblotting mit GFP-spezifischem Antikörper analysiert, wobei als einziges die Expression von RRM-GFP wiederholt nicht nachweisbar war (Abbildung 25). Aufgrund der Kernlokalisierung wurde sich in weiteren *in planta* Experimenten auf SPRY und RRM konzentriert.

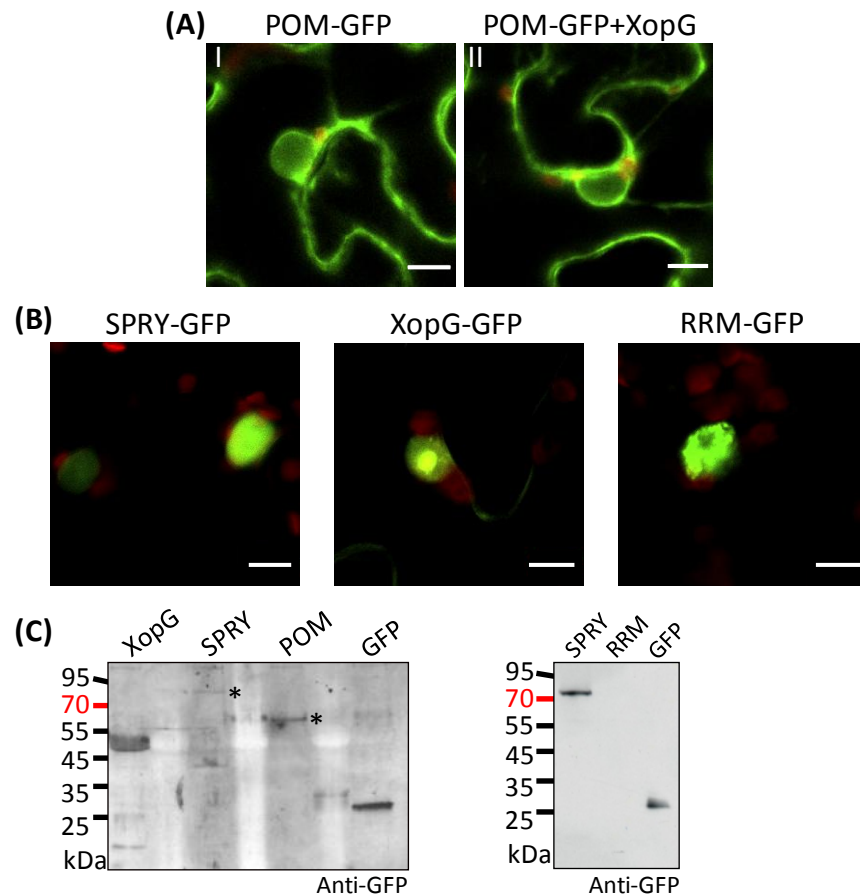


Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisierung der XopG-Interaktoren SPRY, POM und RRM. (A)-(B) Lokalisierungsstudien: POM, SPRY, RRM und XopG wurden als GFP-Fusionen mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. 1,5 dpi wurden Blattscheiben analysiert. (A) POM ist im Zytoplasma lokalisiert und Kernausgeschlossen (I). Diese Lokalisierung ändert sich auch nicht bei Koexpression mit XopG-cMyc (II). (B) Die Interaktoren SPRY und RRM sind wie XopG im Kern lokalisiert. Es wurde jedoch keine Lokalisierung im Nukleolus beobachtet. Die weißen Balken entsprechen 10 µm. (C) Die Expression von XopG, SPRY und POM, nicht aber von RRM konnte durch Immunoblotting der Blattextrakte und GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Alle Experimente wurden mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

3.3.13 SPRY und RRM interagieren mit XopG in der Pflanze

Um die Bindung der beiden Proteine an XopG in der Pflanze zu untersuchen, wurden sowohl BiFC als auch Koimmunopräzipitation (KoIP) angewendet. Ein *Agrobacterium*-stamm der XopG fusioniert an die N-terminale Hälfte von YFP in die Pflanze überträgt und ein Stamm, der jeweils SPRY oder RRM fusioniert an die C-terminalen Hälfte von YFP in die Pflanze

überträgt, wurden in *N. benthamiana* koinfiltriert. In beiden Fällen zeigte sich nach 2 Tagen eine deutlich sichtbare gelbe Fluoreszenz im Zellkern (Abbildung 25c). Als Kontrolle wurde in gleicher Weise die Bindung von SPRY und RRM an XopG_{E174A} untersucht. In diesen Fällen konnte keine Fluoreszenz in den Kernen oder den Zellen beobachtet werden (Abbildung 25). SPRY und RRM binden in diesem Experiment an XopG, nicht aber an XopG_{E174A}. Die Expression ähnlicher Mengen der YN-Fusionen von XopG und XopG_{E174A} konnte mittels Immunoblotting unter Nutzung eines Myc-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 25). Der Nachweis der YC-Fusionen war jedoch in mehreren Experimenten aufgrund schwacher Expression unter Nutzung eines HA-spezifischen Antikörpers nicht möglich. Einzig in einem Experiment, in dem diese Interaktionen als Positivkontrolle genutzt wurden, war eine schwache Bande von SPRY-YC nachweisbar (siehe Anhang). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde die Bindung an LaminC untersucht. Auch hier war keine Fluoreszenz nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

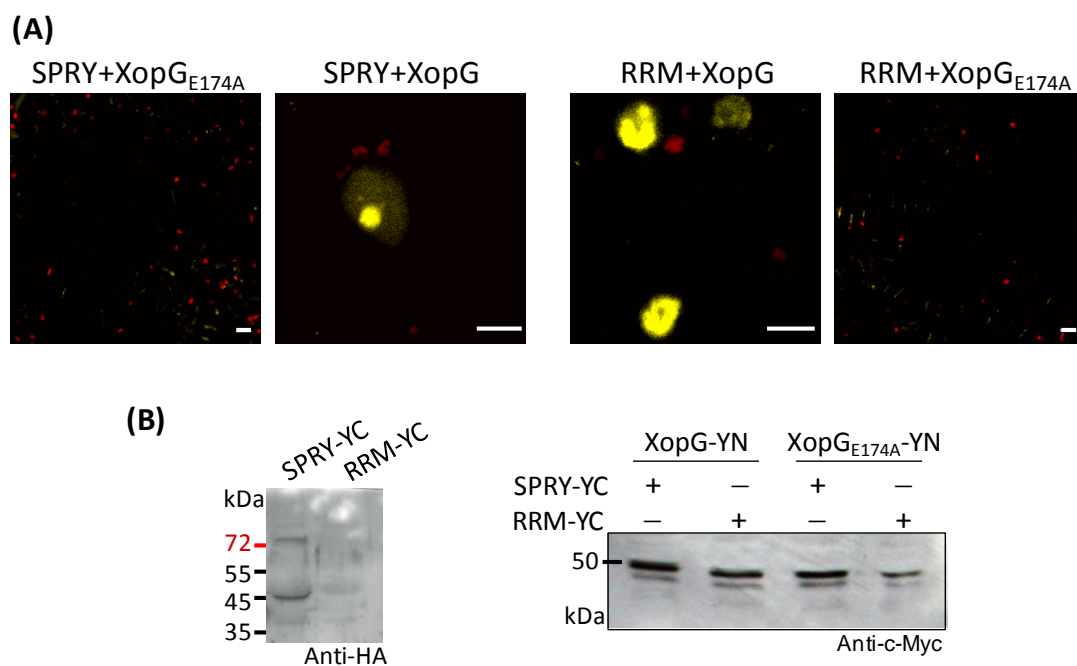


Abbildung 25: Bindung von XopG an SPRY und PPM in planta. (A) Nachweis der Interaktion von XopG mit SPRY und RRM in der Pflanze durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). XopG wurde als Fusionsprotein mit der N-terminalen Hälfte von YFP exprimiert und SPRY und RRM jeweils mit der C-terminalen Hälfte von YFP. Jeweils 2 Fusionsproteine wurden mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* koexprimiert. Gelbe Fluoreszenz bedeutet Interaktion der beiden Proteine. Als Spezifitätskontrolle diente XopG_{E174A}, das hier an keines der beiden Proteine bindet. Die weißen Balken entsprechen 10 μ m. (B) Die Expression von XopG und XopG_{E174A} in ähnlichen Mengen wurde durch Immunoblotting mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Expression des YC-Fusionsproteins SPRY-YN, nicht aber RRM-YN war in mehreren Experimenten mit HA-spezifischem Antikörper nachweisbar. Alle Experimente wurden mindestens zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Um die Interaktionen zu bestätigen, wurde eine KoIP durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Interaktionspartner mit verschiedenen Epitopmarkierungen gemeinsam wie folgt *via Agrobacterium* in *N. benthamiana* koexprimiert: XopG-GFP mit SPRY-c-Myc, XopG-GFP mit RRM-c-Myc und als Kontrolle XopG-GFP ohne Interaktionspartner. Nach 2 Tagen wurde Blattmaterial geerntet und die Proteinkomplexe mit Hilfe des Myc-Epitops und des c-Myc-spezifischen Antikörpers an Protein G-Sepharose immobilisiert. Die Proteine wurden gewaschen, von der Matrix eluiert und mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Eine Bindung von XopG an RRM konnte beobachtet werden, nicht aber an SPRY (Abbildung 26). Bei letzterem ist zwar ebenfalls eine schwache Bande sichtbar, die aber in ihrer Stärke der Negativkontrolle entspricht, bei der die Bindung von XopG-GFP allein an die Protein G-Sepharose untersucht wurde. Somit konnte die Bindung von XopG an das RNA-bindende Protein RRM bestätigt werden.

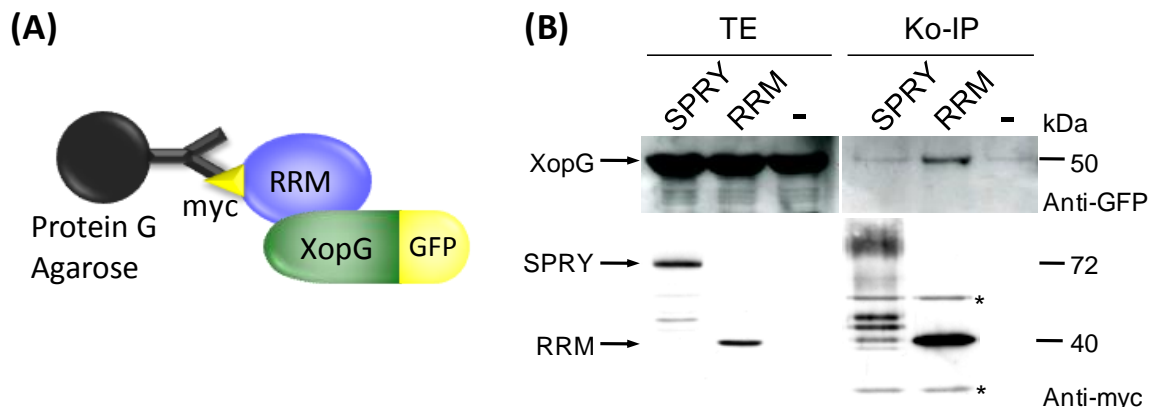


Abbildung 26: Koimmunopräzipitation von XopG und RRM. (A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. (B) Bindung von XopG an RRM, nicht aber an SPRY. Die Interaktionspartner wurden jeweils mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* koexprimiert. Nach 2 Tagen wurde Blattmaterial geerntet, die Zellen durch Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, die Proteine an Protein G-Agarose immobilisiert und gewaschen. Die eluierten Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und die epitopmarkierten Proteine wurden durch Immunoblotting unter Nutzung der entsprechenden Antikörper sichtbar gemacht. – stellt die Negativkontrolle dar. XopG-GFP wurde ohne zusätzliches Protein mit der Protein G-Agarose inkubiert. Im Übrigen wurden alle Schritte parallel ausgeführt. (*) markiert die schwere und leichte Kette des Antikörpers. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

3.3.14 Virus-induziertes Gen-Silencing der Interaktoren SPRY und RRM

Ob die *in planta*-Interaktion von XopG mit den isolierten Beuteproteinen SPRY und RRM biologisch relevant ist, kann durch *Silencing* der entsprechenden Gene in Paprika adressiert werden. Dabei kann untersucht werden, ob das Fehlen eines bestimmten Beuteproteins zur Veränderung der durch XopG ausgelösten Abwehrreaktion in Paprika ECW führt. Zur Stilllegung der Gene der Interaktoren SPRY und RRM wurde Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) verwendet. In vorangegangenen Arbeiten wurde das auf dem Tabakrattle-

Virus basierende *Silencing* optimiert und erfolgreich auch in Paprika angewendet (Szczesny, 2009). Das Genom des Virus befindet sich auf zwei getrennten Vektoren in zwei Agrobakterienstämmen. Erst in der Pflanze entsteht ein infektiöser Virus. Auf dem Vektor pTRV1 befinden sich die meisten der Virusgene, auf pTRV2a befindet sich eine *attR*-Kassette, in die das jeweilige DNA-Fragment des zu untersuchenden Gens kloniert wird. Für das RRM und SPRY-Gen wurden jeweils Fragmente von ca. 500 bp Länge gewählt, die von cDNA amplifiziert, in pENTR/D gerichtet kloniert und in pTRV2a rekombiniert wurden. Für SPRY wurden 2 verschiedene Fragmente verwendet, eines im konservierten Bereich mit der SPRY-Domäne und eines im nicht konservierten N-terminalen Bereich (Abbildung 27a).

Jeweils 2 *Agrobakterien*stämme wurden gemischt und in ca. 6 Wochen alte Paprika ECW inokuliert. Als generelle Kontrolle für das *Silencing* diente ein Fragment der Phytoendesaturase (PDS). Wird dieses Gen in Paprika erfolgreich stillgelegt, werden die Blätter nach 2-3 Wochen weiß, was auf den Kontrollpflanzen stets beobachtet werden konnte. Dies ist auch der Zeitpunkt an dem die Pflanzen für die phänotypische Analyse inokuliert werden. In 2 unabhängigen Experimenten wurden jeweils 3 Pflanzen mit Agrobakterien mit *Silencing*-Konstrukten für RRM, SPRY1, SPRY2 und leerem Vektor als Kontrolle inokuliert. Es zeigte sich, dass bereits die Kontrolle mit dem leeren Vektor dazu führte, dass die HR-Reaktion der Paprikapflanzen auf die Expression von XopG im Vergleich zu nicht mit dem Virus infizierten Pflanzen beeinträchtigt war. Dennoch war bei 5 von 6 Pflanzen eine HR zu erkennen, jedoch schwächer als bei nicht behandelten Kontrollpflanzen (Abbildung 27b). Aufgrund der Beeinträchtigung der XopG-HR durch das *Silencing* an sich, war es schwierig, eindeutige Aussagen über den Einfluss von SPRY oder RRM auf die HR zu machen. Daher wurden die einzelnen Reaktionen gezählt. In Abbildung 27 sind Reaktionen auf allen Pflanzen gezeigt. Auf den RRM *Silencing*-Pflanzen war bei 4 von 6 Pflanzen eine HR zu beobachten (Abbildung 27). Dies unterscheidet sich nur geringfügig von den Kontrollpflanzen, weshalb sich vermuten lässt, dass RRM keinen Einfluss auf die durch XopG ausgelöste HR hat. In den Pflanzen, in denen das SPRY-Protein stillgelegt worden war, scheint die pflanzliche Abwehrreaktion jedoch eingeschränkt. Nur in einem von 6 (SPRY1) oder in drei von 6 (SPRY2) Fällen war eine HR-ähnliche Reaktion nach der Expression von XopG zu beobachten (Abbildung 27b). Diese Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass SPRY eine Rolle bei der Erkennung von XopG in der Pflanze spielen könnte, sie sind jedoch nicht endgültig. Aufgrund der unklaren Phänotypen wäre es wichtig, diese Ergebnisse zu reproduzieren und in RT-PCR-Experimenten die Reduzierung der jeweiligen Transkripte zu zeigen.

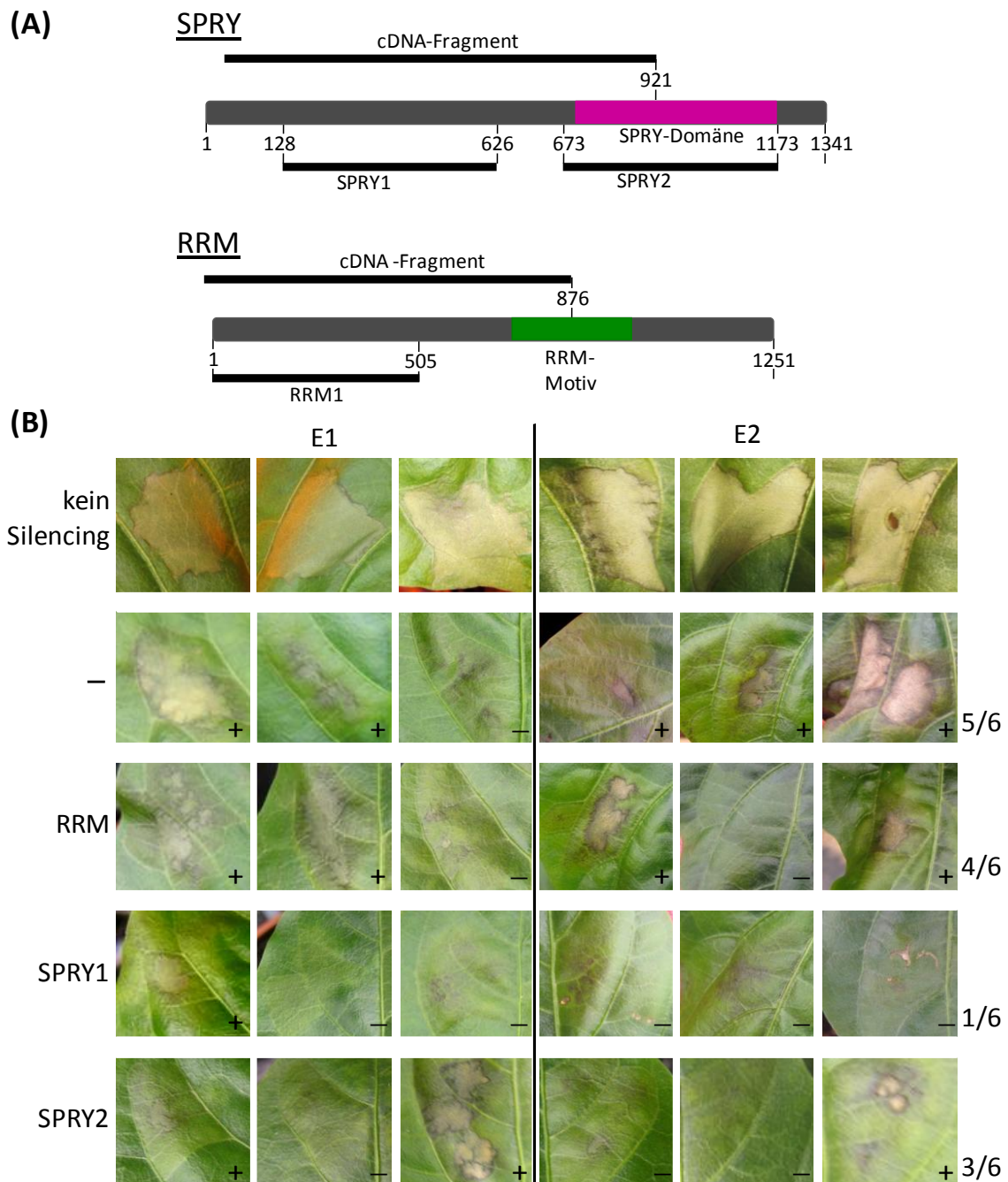


Abbildung 27: Silencing von SPRY reduziert die XopG-HR in ECW. (A) Darstellung der Lage der für das Silencing der beiden Interaktoren ausgewählten Fragmente. Für das Protein mit der SPRY-Domäne wurden 2 verschiedene Fragmente gewählt, eines mit der konservierten SPRY-Domäne und eines im weniger konservierten N-terminalen Bereich. (B) Inokulation von *Agrobacterium* (pGWB17-xopG) in ECW-Pflanzen 3 Wochen nach Virus-induziertem Gen-Silencing mit den XopG-Interaktoren RRM und SPRY. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die mit *Agrobacterium* mit leerem Vektor pTRV2a (-) infiltriert wurden und Pflanzen, die nicht gesilencet wurden. Die Abbildung zeigt 2 unabhängige Experimente (E1 und E2) mit jeweils 3 verschiedenen Pflanzen. Auf 5 von 6 der Kontrollpflanzen war die XopG-HR zu erkennen, nach Silencing von RRM auf 4 von 6 Pflanzen, bei SPRY1 auf einer von 6 und bei SPRY2 auf 3 von 6 Pflanzen. + und - markieren, welche Phänotypen gezählt wurden. +: Nekrose zu erkennen, -: keine Reaktion sichtbar.

3.3.15 Suche nach Interaktoren der putativ inaktiven Mutante von XopG

Da davon ausgegangen werden musste, dass das native XopG seine Virulenzziele durch eine mögliche Proteaseaktivität schneidet, wurde zusätzlich eine Hefe-2-Hybrid-Sichtung mit der bereits zuvor genutzten, inaktiven Punktmutante XopG_{E174A} in voller Länge durchgeführt. Das experimentelle Vorgehen war analog zu dem zuvor beschriebenen (3.1.2.2 und 3.2.6). Nach Durchführung der 24-stündigen Paarung des Köderstammes mit der Y2H-Bibliothek mit c-DNA- Klonen aus Tomate (*Solanum lycopersicum* Kultivar MoneyMaker; D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas) sind nach 8 Tagen 143 Hefe-Kolonien auf selektivem Medium (SD/-THAL) gewachsen. Eine Spezifitätskontrolle wurde wie unter 2.17.2 und 3.3.11 beschrieben durchgeführt. 13 der Beuteproteine interagierten spezifisch mit XopG_{E174A} aber nicht mit LaminC (Tabelle 7). Hierbei handelte es sich um eine GTP Pyrophosphokinase, eine Thioredoxin-Peroxidase, eine Aspartat Kinase-Homoserin-Dehydrogenase, ein Protein mit einer C2-Domäne, ein Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein, ein Protein mit Homologie zu einer Calcium/Calmodulin Protein Kinase und ein unbekanntes Protein ohne Homologie. Die Interaktoren JAB und GAPDH interagierten in den Versuchen schwach mit LaminC. Alle Interaktoren wurden auch auf Bindung an das WT-Protein XopG in einem Y2H-Assay untersucht. Keines der Proteine interagierte sowohl mit XopG_{E174A} als auch mit dem XopG Wildtypprotein.

Tabelle 7: Liste der identifizierten Interaktoren von XopG_{E174A}.

Homologie des Interaktors	EST Nummer	Wie oft gefunden?	Bemerkungen
GTP Pyrophosphokinase	TC209135	3 x	auch ATP:GTP-Pyrophosphotransferase oder ppGpp Synthetase
Thioredoxin-Peroxidase	TC196482	2 x	Zellschutz durch Reduktion von Hydrogenperoxid, Peroxynitrit und organischem Hydroperoxid
Aspartat Kinase-Homoserin-Dehydrogenase	TC212071	1 x	Biosynthese von Aminosäuren
Unbekanntes Protein	TC200435	1 x	---
Protein mit C2-Domäne	SGN-E553316	1 x	C2-Domäne: Ca ²⁺ abhängiges Membrane-targeting durch Bindung an Membran-Phospholipide
Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein	SGN-E275637	1 x	SGN E275637 (C-Terminus), DB 721440 (N-Terminus, 72% ident.)

Homologie des Interaktors	EST Nummer	Wie oft gefunden?	Bemerkungen
Calcium/Calmodulin Protein Kinase	TC201488	1 x	Homolog zu Calcium/Calmodulin Proteinkinase 1 aus <i>N. tabacum</i> put. <i>JUN kinase activation domain</i>
JAB	TC191610	2 x	<i>binding protein</i> ; schwache Bindung auch an LaminC
GAPDH	TC207985	1 x	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, schwache Bindung auch an LaminC

3.4 Der Typ III-Effektor XopB

Der Typ III-Effektor XopB wurde aufgrund seiner Typ III-abhängigen Induktion identifiziert (Noël *et al.*, 2001). Mit seiner Länge von 613 Aminosäuren zählt XopB zu den größeren Effektorproteinen. XopB hat keine vorhergesagte Funktion, es gibt jedoch homologe Proteine in Pseudomonaden und in *Pantoea*: HopD1 (früher AvrPphD). In dieser Arbeit wurde bereits beschrieben, dass XopB in der Lage ist, die XopG-HR zu unterdrücken, wenn beide Effektoren mittels *Agrobacterium* in Paprikapflanzen exprimiert werden (Abbildung 20). Dies warf die Frage auf, ob es sich bei XopB um einen für XopG spezifischen oder einen generellen Zelltodsuppressor handelt.

3.4.1 XopB unterdrückt ein breites Spektrum von Zelltodreaktionen auf verschiedenen Pflanzen

Um herauszufinden, ob es sich bei XopB um einen generellen Zelltodsuppressor handelt, wurde der Einfluss von XopB auf diverse Zelltodreaktionen untersucht. Dazu wurden alle HR-auslösender Effektoren getestet, die in unserem Labor bereits vorlagen oder im Zuge dieser Arbeit kloniert wurden (Tabelle 3). Die Effektoren wurden jeweils mittels *Agrobacterium* exprimiert und mit einem XopB exprimierenden Agrobakterienstamm gemischt. Die Reaktionen wurden jeweils in den Pflanzen getestet, in denen die entsprechenden Effektoren eine HR auslösen (Tabelle 8). Es zeigt sich, dass XopB in der Lage ist, die HR von AvrBsT, AvrRxv und XopJ in *N. benthamiana* zu unterdrücken, wenn beide Proteine transient in der Pflanze koexprimiert werden, wobei die Reaktionen auf XopJ und AvrRxv vollständig unterdrückt wurden und von AvrBsT partiell. Weiterhin ist XopB in

der Lage, die Reaktionen von AvrB (*P. syringae* pv. *tomato*) und XopG in *N. tabacum* zu unterdrücken, die AvrBs3-HR in Paprika ECW-30R (Abbildung 28a), die AvrBs2-HR in Bs2-transgenen *N. benthamiana* sowie die N-Resistenz ausgelöst durch TMV p50 in N-transgenen *N. benthamiana* (Abbildung 28c). Ein direkter Einfluss von XopB auf die Proteinmengen der HR-Elicitoren ist nicht anzunehmen, da exemplarisch für AvrRxv gezeigt wurde, dass die Proteinmenge bei Koexpression von XopB unverändert bleibt (Abbildung 30). Von XopB in den untersuchten Pflanzen unbeeinflusst sind die Zelltodreaktionen ausgelöst durch AvrBs1, XopM, XopL, AvrBs3 oder die Rx-Resistenz (Tabelle 8). Somit ist eine Virulenzfunktion von XopB die Unterdrückung bestimmter Zelltodreaktionen.

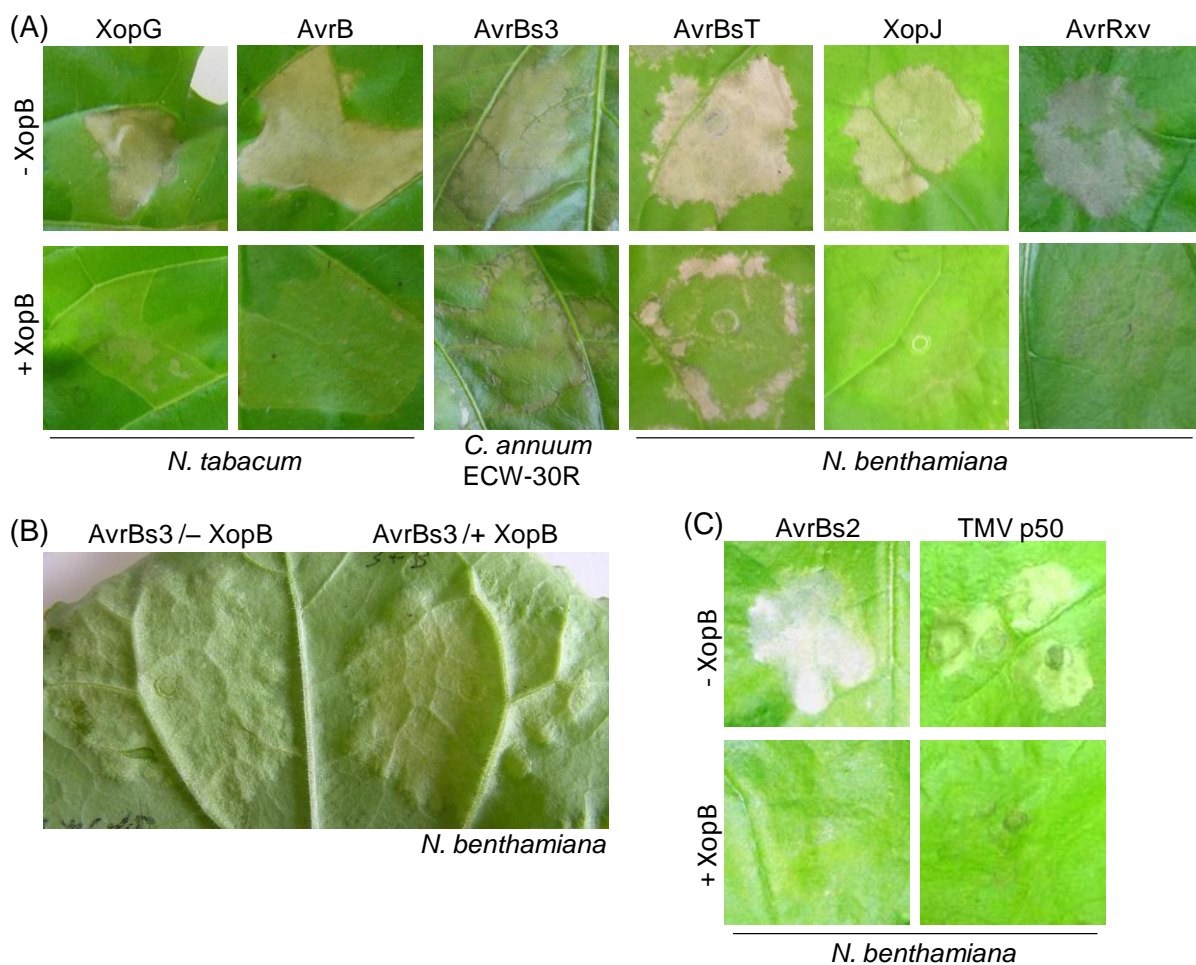


Abbildung 28: XopB unterdrückt ein breites Spektrum an Zelltodreaktionen in verschiedenen Pflanzen. (A)-(B) Die HR-auslösenden Effektorproteine wurden *Agrobacterium* vermittelt zusammen mit XopB in den entsprechenden Pflanzen koexprimiert. Als Kontrolle (-XopB) diente *Agrobacterium* GV3101. Die Bakterienstämme wurden auf eine $OD_{600\text{gesamt}}=1,0$ eingestellt, im Verhältnis 2:3 (EffektorX:XopB) gemischt und in die entsprechenden Pflanzen inokuliert. (A) XopB unterdrückt die HR von XopG und AvrB in *N. tabacum*, die HR von AvrBs3 auf Paprika ECW-30R partiell und die HR-Reaktionen von AvrBsT (partiell), XopJ und AvrRxv. (B) XopB hat keinen Einfluss auf die durch AvrBs3 hervorgerufene Hypertrophie in *N. benthamiana*. (C) N-transgene oder Bs2-transgene *N. benthamiana* wurden entsprechend mit 35S-TMV p50 oder 35S-avrBs2 infiziert. Als Kontrolle (-XopB) diente *Agrobacterium*, das 35S-gfp in die Pflanze überträgt. Alle Inokulationen wurden mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Die Expression von XopB hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die durch AvrBs3 ausgelöste Hypertrophie in *N. benthamiana* (Abbildung 28b). Auch hier wurden zwei Agrobakterienstämme im Verhältnis 2:3 miteinander gemischt, die *avrBs3* bzw. *xopB* in die Pflanze übertragen und in *N. benthamiana* infiltriert. Die Hypertrophie wurde nach drei Tagen sichtbar. Eine minimale Verstärkung der Hypertrophie durch XopB war in einigen Experimenten zu beobachten (Abbildung 28b). Der Effekt war jedoch sehr schwach und nicht immer beobachtbar.

Tabelle 8: Einfluss von XopB-Expression auf verschiedene Zelltodreaktionen.

Supprimiert durch XopB	Nicht supprimiert durch XopB
XopG ⁽¹⁾⁽²⁾	AvrBs1 ⁽⁵⁾
AvrBsT ⁽³⁾	XopM ⁽³⁾
AvrRxv ⁽³⁾	XopL ⁽³⁾
AvrB ⁽²⁾	Rx-Resistenz ⁽³⁾
XopJ ⁽³⁾	AvrBs4 ⁽⁶⁾
AvrBs3 ⁽⁴⁾	
AvrBs2 ⁽³⁾	
N-Resistenz ⁽³⁾	

(1) ECW, (2) *N. tabacum*, (3) *N. benthamiana*, (4) ECW-30R, (5) ECW-10R, (6) *Solanum lycopersicum*

3.4.2 HopD1_{Pag} hat eine ähnliche Virulenzaktivität wie XopB

Wie oben erwähnt, existieren zu XopB homologe Proteine in verschiedenen Pseudomonaden und in *Pantoea agglomerans* (früher *Erwinia herbicola*). HopD1 (früher AvrPphD) aus *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* ist der einzige homologe Effektor, von dem eine Virulenzfunktion bekannt ist. So vergrößert HopD1_{Pag} die Gallen in von *P. agglomerans* befallenen Schleierkraut (*Gypsophila paniculata* L.; Guo *et al.*, 2002). HopD1_{Pag} ist mit Ausnahme der N-terminalen 78 Aminosäuren zu 75% identisch und 85% ähnlich zu XopB.

Um zu untersuchen, ob der Effektor in den verschiedenen Pathogenen eine konservierte Aktivität hat, wurden phänotypische Analysen analog zu XopB mit HopD1_{Pag} in *N. benthamiana* durchgeführt. Ein Cosmid, von dem HopD1_{Pag} amplifiziert werden konnte, wurde von Isaac Barash (Tel Aviv University, Israel) zur Verfügung gestellt. HopD1_{Pag} wurde in einem Binärvektor unter Kontrolle eines 35S-Promotors mit einem C-terminalen *gfp*- bzw. 4xmyc-Epitop versehen. Anschließend wurde HopD1_{Pag} via *Agrobacterium* mit solchen zelltdauslösenden Effektorproteinen koexprimiert, deren HR-Reaktionen durch XopB

unterdrückt werden, um den Einfluss von HopD1_{Pag} auf diese Zelltodreaktionen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass HopD1_{Pag} keinen Einfluss auf durch XopG, AvrRxx oder AvrBsT ausgelöste Zelltodreaktionen hat (Abbildung 29 und Daten nicht gezeigt). Jedoch war HopD1_{Pag} in der Lage, die relativ schwache und langsame XopJ-HR vollständig zu unterdrücken (Abbildung 29). Das zeigt, dass HopD1_{Pag} die Virulenzfunktion von XopB teilweise übernehmen kann.

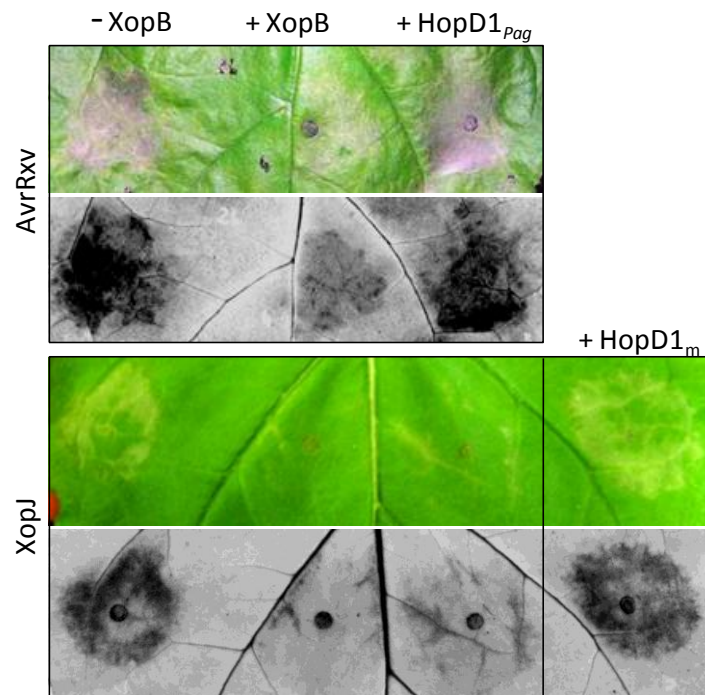


Abbildung 29: HopD1_{Pag} hat eine mit XopB überlappende Virulenzfunktion. HopD1_{Pag} unterdrückt im Gegensatz zu XopB nicht die durch AvrRxx ausgelöste Zelltodreaktion, kann jedoch die durch XopJ ausgelöste Zelltodreaktion unterdrücken. Die doppelte Punktmutante HopD1_m ist jedoch nicht mehr in der Lage, die XopJ-HR zu unterdrücken. Agrobakterienstämme, die pGWB17-avrRxx bzw. pGWB5-xopJ in die Pflanze übertragen, wurden jeweils mit Agrobakterienstämmen gemischt, die XopB, HopD1_{Pag} bzw. HopD1_m von Plasmiden der pGWB-Serie, bzw. GFP als Kontrolle in die Pflanze übertragen. Nach 3 Tagen wurden die Phänotypen dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter zusätzlich unter UV-Licht fotografiert. Die Inokulationen wurden mindestens dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Eine durch PCR-Fehler zufällig entstandene Punktmutante von HopD1_{Pag} , bezeichnet als HopD1_m , die zu den veränderten Aminosäuren A408V und K550R führt, wurde ebenfalls auf die Fähigkeit zur HR-Suppression untersucht. Im Gegensatz zu HopD1_{Pag} ohne Mutationen war HopD1_m nicht in der Lage die XopJ-HR zu unterdrücken (Abbildung 29). Der unterschiedliche Phänotyp von HopD1_{Pag} ist nicht auf eine geringere oder fehlende Expression des Proteins zurückzuführen, da HopD1_{Pag} und HopD1_m in vergleichbaren Mengen in *N. benthamiana* exprimiert werden (Abbildung 30). Bei HopD1_m handelt sich also

um eine inaktive Mutante von HopD1_{Pag}, deren Mutation nun in Folge auch auf XopB übertragen werden kann.

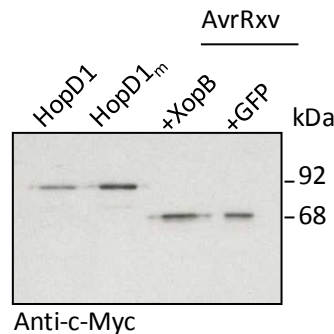


Abbildung 30: Expression von HopD1, HopD1_m und AvrRxv. Nach *Agrobacterium*-vermitteltem DNA-Transfer wurden HopD1-myc, HopD1_m-myc, AvrRxv-myc (koexprimiert mit XopB) und AvrRxv-myc (koexprimiert mit GFP) transient in *N. benthamiana* exprimiert. Die *Agrobacterien* wurden mit einer OD₆₀₀ von 1,0 in die Blätter inokuliert. Die Koexpression erfolgte durch Mischen der entsprechenden *Agrobacterien*stämme im Verhältnis 2:3 (AvrRxv:XopB bzw. GFP). Blattscheiben wurden 1 dpi (zeitlich vor den HR-Reaktionen) geerntet, die Zellen durch Mörsern aufgeschlossen und anschließend die Extrakte elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Immunoblotting mit myc-spezifischem Antikörper nachgewiesen. HopD1_{Pag} und HopD1_m werden in *N. benthamiana* in ähnlichen Mengen exprimiert. Die Koexpression von XopB hat keinen Einfluss auf die Expression von AvrRxv. Der Nachweis der Proteine wurde zweimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

3.4.3 XopB induziert eine Zelltodreaktion in *Nicotiana benthamiana*

XopB ist nicht nur in der Lage Zelltodreaktionen zu unterdrücken, sondern löst nach einigen Tagen selbst Zelltod in *N. benthamiana* aus. Wird XopB mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert, so ist nach 5 Tagen eine Zelltodreaktion im inokulierten Bereich sichtbar. Wird hingegen die XopB-GFP-Fusion vom Plasmid pK7FWG2-xopB (Tabelle 3) in *N. benthamiana* exprimiert kann eine Zelltodreaktion nach 3 Tagen beobachtet werden (Abbildung 31).

Weiterhin löst HopD1_{Pag} eine Zelltodreaktion in *N. benthamiana* aus, wenn es mittels *Agrobacterium* transient in Blättern exprimiert wird, jedoch 2 Tage später als XopB (Abbildung 31). Somit reagiert die Pflanze auf HopD1_{Pag} im Gegensatz zu XopB verzögert. Das mutierte Protein HopD1_m löst keine Zelltodreaktion in *N. benthamiana* aus. Dass dieser Unterschied nicht auf eine fehlende oder schwächere Expression von HopD1_m zurückzuführen ist, konnte durch Immunoblotting unter Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers gezeigt werden (Abbildung 31b).

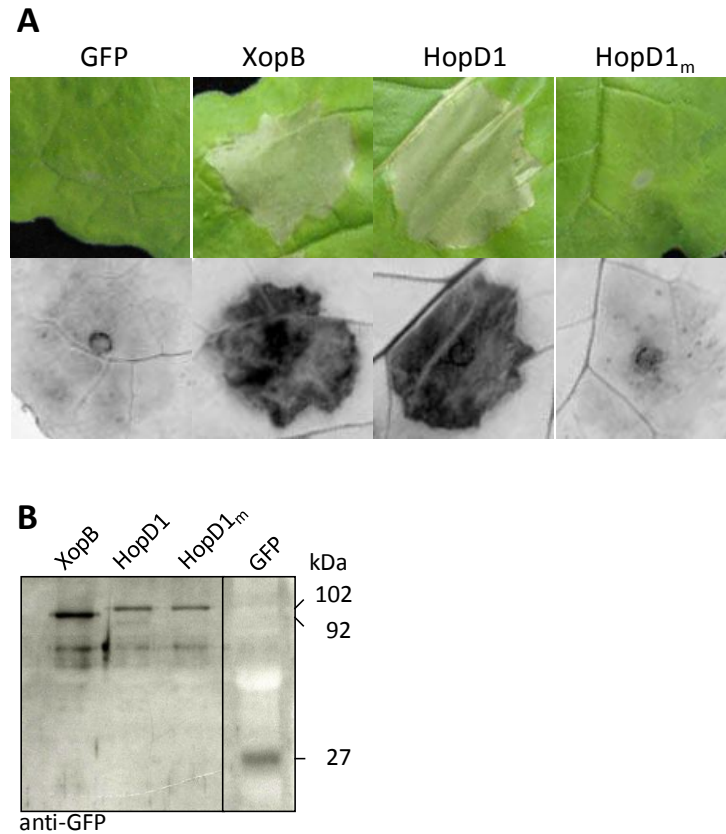
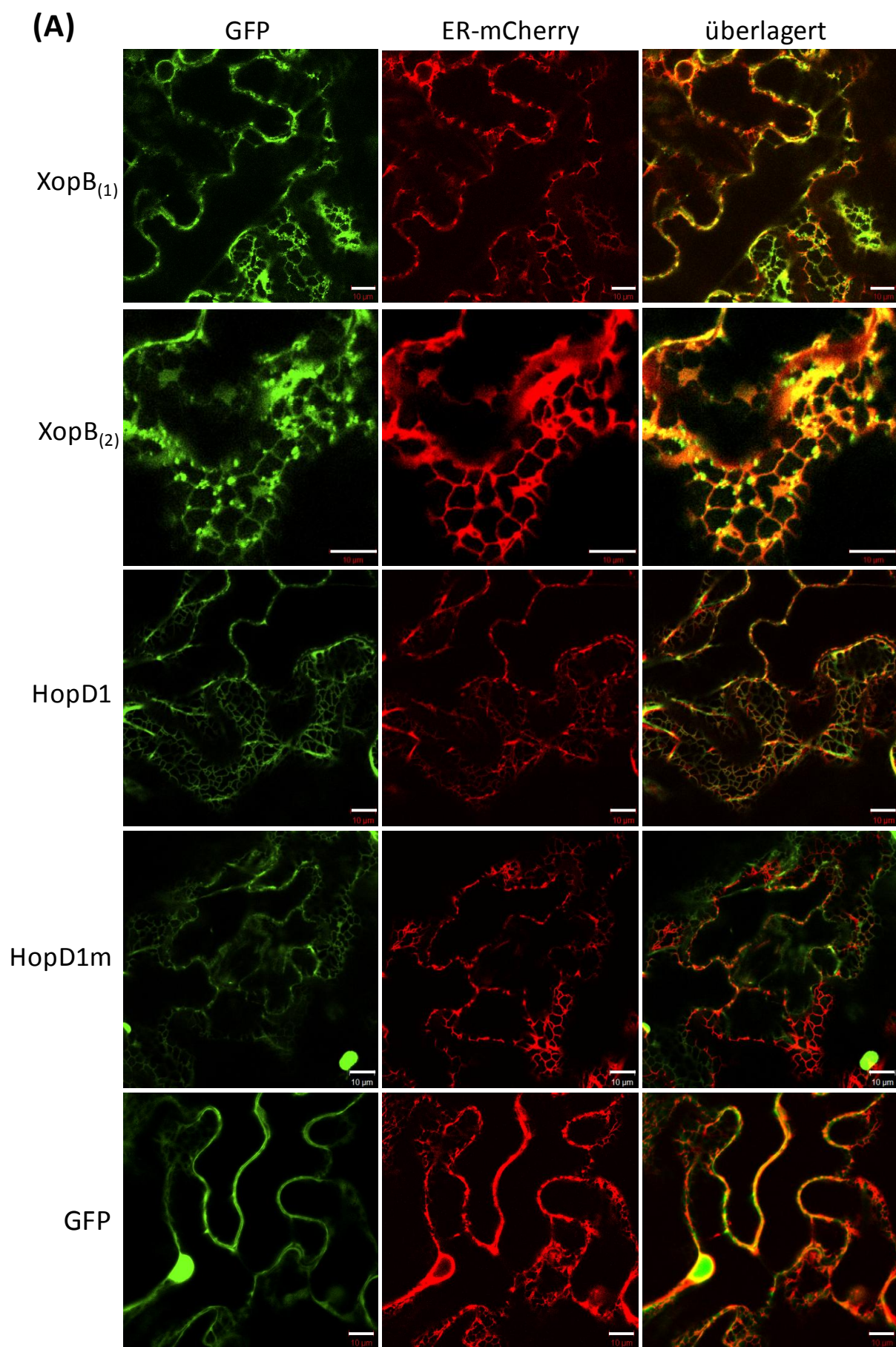


Abbildung 31: XopB und das homologe Protein HopD1_{Pag} lösen eine Zelltodreaktion in *N. benthamiana* aus, die durch die Punktmutationen A408V und K550R verhindert wird. (A) XopG, HopD1_{Pag}, und eine Mutante von HopD1_{Pag}, HopD1_m (A408V und K550R) wurden mittels *Agrobacterium* als C-terminale GFP-Fusionen in *N. benthamiana* exprimiert. Dazu wurden die entsprechenden Stämme mit einer OD_{600=0,4} in die Pflanzen inokuliert. Nach 5 Tagen wurden die Reaktionen dokumentiert. Als Kontrolle diente GFP allein. (B) Die Expression von XopB-GFP, HopD1_{Pag}-GFP, HopD1_m-GFP ist vergleichbaren Mengen nachweisbar. Blattscheiben wurden 1,5 dpi geerntet, die Zellen durch Mörsern aufgeschlossen und anschließend die Extrakte auf einem SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die GFP-Fusionsproteine wurden durch Immunoblotting und Nutzung eines GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

3.4.4 XopB ist im ER und Golgivesikeln lokalisiert

Um erste Anhaltspunkte darüber zu erhalten, in welchem Zellkompartiment XopB möglicherweise wirkt und so eventuell ein Modell zum Mechanismus der CDS-Aktivität von XopB zu entwickeln, wurde eine *xopB-gfp*-Fusion via *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. Nach 22 Stunden wurden Blattscheiben entnommen und mit Hilfe des konfokalen LSM analysiert. Es zeigte sich netzartige grüne Fluoreszenz, die zusätzlich grüne Punkte aufwies und nicht im Kern zu finden war (Abbildung 32). Zum Vergleich wurde auch das homologe Protein HopD1_{Pag} ebenfalls als GFP-Fusion in *N. benthamiana* exprimiert. Es zeigte sich das gleiche netzartige Muster, jedoch keine zusätzlichen hellen Punkte, wie bei XopB (Abbildung 32). Um genauen Aufschluss über die Lokalisierung von XopB zu erhalten,



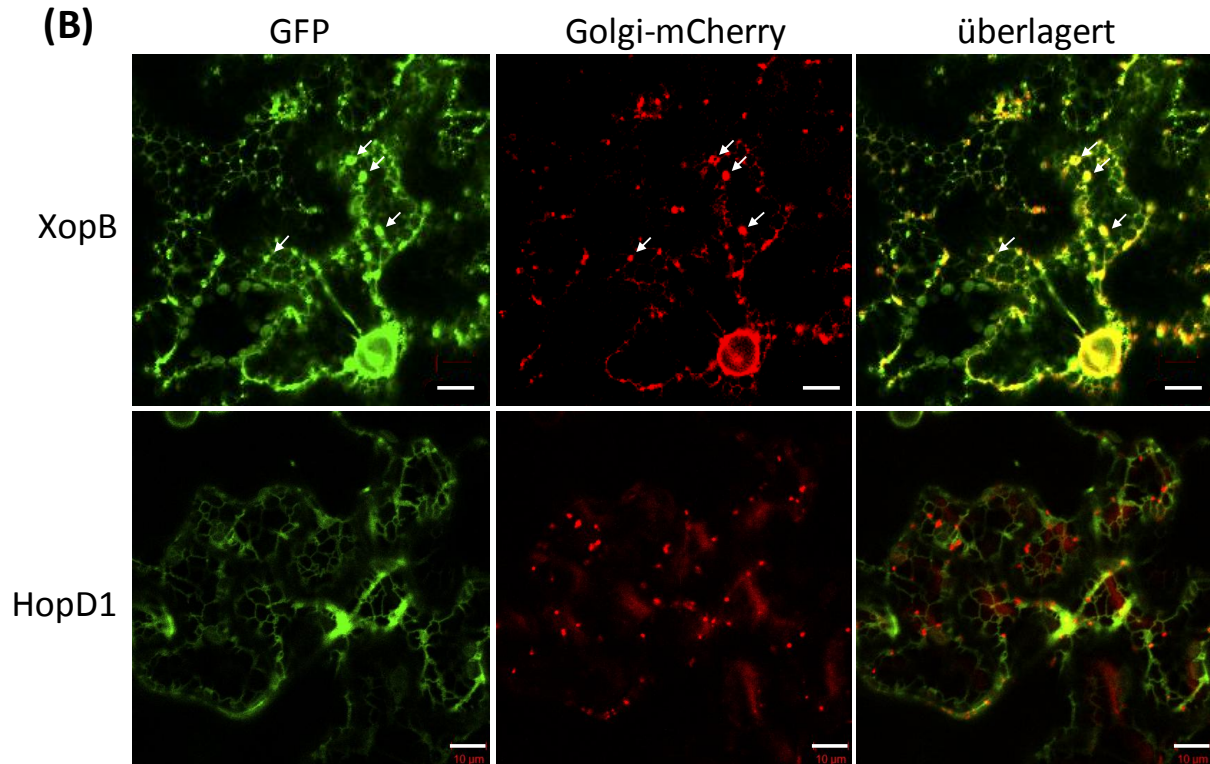


Abbildung 32: XopB ist im ER und in Golgi-Vesikeln lokalisiert. Agrobakterienstämme mit den entsprechenden Fusionsproteinen XopB-GFP, HopD1_{Pag}-GFP, HopD1_m-GFP oder GFP allein wurden mit Agrobakterienstämmen im Verhältnis 1:1 gemischt, die entweder (A) ein ER- oder (B) ein Golgi-Markerprotein gekoppelt an das rot fluoreszierende Protein mCherry in die Pflanze übertragen. Die OD_{600(gesamt)} betrug 0,8. XopB-GFP kolokalisiert mit ER-mCherry und Golgi-mCherry und ist kernaussgeschlossen. XopB(1) und XopB(2) stellen zur besseren Visualisierung der ER-Struktur zwei verschiedene Ausschnitte und Vergrößerungsstufen dar. HopD1_{Pag} und HopD1_m kolokalisieren hingegen nur mit ER-mCherry, nicht aber mit Golgi-mCherry. Das als Kontrolle verwendete GFP lokalisiert im Zellkern und Zytoplasma. Die mikroskopischen Aufnahmen mit dem konfokalen LSM wurden 22 hpi angefertigt. Die weißen Balken entsprechen 10 µm. Die Inokulationen wurden mindestens dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

wurde eine Koexpression mit Markerproteinen für das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat (Golgi), die an das rot fluoreszierende Protein mCherry gekoppelt sind (Nelson *et al.*, 2007), durchgeführt. Agrobakterienstämme die entweder *xopB-gfp*, *hopD1_{Pag}-gfp*, *hopD1_m-gfp* oder *gfp* allein enthielten wurden jeweils mit Stämmen im Verhältnis 1:1 gemischt, die die an mCherry gekoppelten ER-Marker bzw. Golgi-Marker enthielten. Diese Gemische wurden mit einer jeweiligen OD_{600(gesamt)} von 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert. Nach 22 Stunden war bei Analyse mit dem konfokalen LSM eine deutliche Kolokalisierung von XopB mit beiden Fluoreszenzmarkern ER-mCherry und Golgi-mCherry sichtbar, HopD1_{Pag} und HopD1_m kolokalisieren hingegen nur mit ER-mCherry (Abbildung 32). Folglich konnte gezeigt werden, dass XopB im oder am ER und in oder an Golgivesikeln lokalisiert ist, HopD1 und HopD1_m jedoch ausschließlich im oder am ER.

3.4.5 Einfluss von XopB auf Phytohormone

Wie bereits erwähnt, trägt HopD1_{Pag} zur Vergrößerung der durch *P. agglomerans* verursachten Gallen in Schleierkraut bei (Guo *et al.*, 2002). Da bekannt ist, dass Auxin eine Rolle bei der Gallenentwicklung spielt und spekuliert wird, dass Effektoren möglicherweise die Auxinproduktion induzieren oder die Zellen sensitiver für Auxin machen (Chen *et al.*, 2007), wurde der Einfluss von XopB auf den Auxingehalt (IAA) in der Pflanzenzelle untersucht (Kooperation mit Dr. Otto Miersch, IPB Halle). Um auch mögliche andere Einflüsse von XopB auf den Phytohormongehalt der Pflanze zu identifizieren, wurden gleichzeitig die Gehalte von Jasmonsäure (JA), Salizylsäure (SA) und 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC), einem Zwischenprodukt des Ethylensyntheseweges, untersucht.

Dabei wurde einerseits der Einfluss von XopB allein untersucht, und andererseits die Änderung der Hormongehalte während der HR-Suppression durch XopB. Für letzteres wurde der Einfluss auf die durch XopJ ausgelöste Reaktion betrachtet, da gezeigt wurde, dass XopB die XopJ- HR unterdrückt (Abbildung 28a). Dazu wurden XopB, XopJ und GFP als Kontrolle nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression in *N. benthamiana* einzeln oder gemeinsam exprimiert (Abbildung 33). In jedem Experiment wurden Blätter von drei verschiedenen Pflanzen großflächig inokuliert. Blattmaterial der drei Pflanzen wurde jeweils nach 18 und 24 Stunden entnommen und gepoolt. 24 h nach Inokulation aber noch nicht nach 18 Stunden waren Konzentrationsänderungen verschiedener Hormone messbar. Der Gehalt von JA lag bei allen Proben unterhalb der Nachweisgrenze und konnte somit nicht bestimmt werden. Die Menge von IAA blieb, anders als vermutet in allen Fällen unbeeinflusst zwischen 30 und 40 pmol/g (Abbildung 33). Jedoch reduziert XopB die durch Agrobakterieninfiltration angestiegenen Gehalte von SA und ACC deutlich (Abbildung 33). Durch die Expression von XopJ erhöht sich der Gehalt von ACC zusätzlich stark, auch hier reduziert XopB den ACC-Gehalt um das Zehnfache. Der SA-Gehalt hingegen blieb durch zusätzliche Expression von XopJ unverändert. Es wurden drei vollständig unabhängige Experimente durchgeführt, die jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielten.

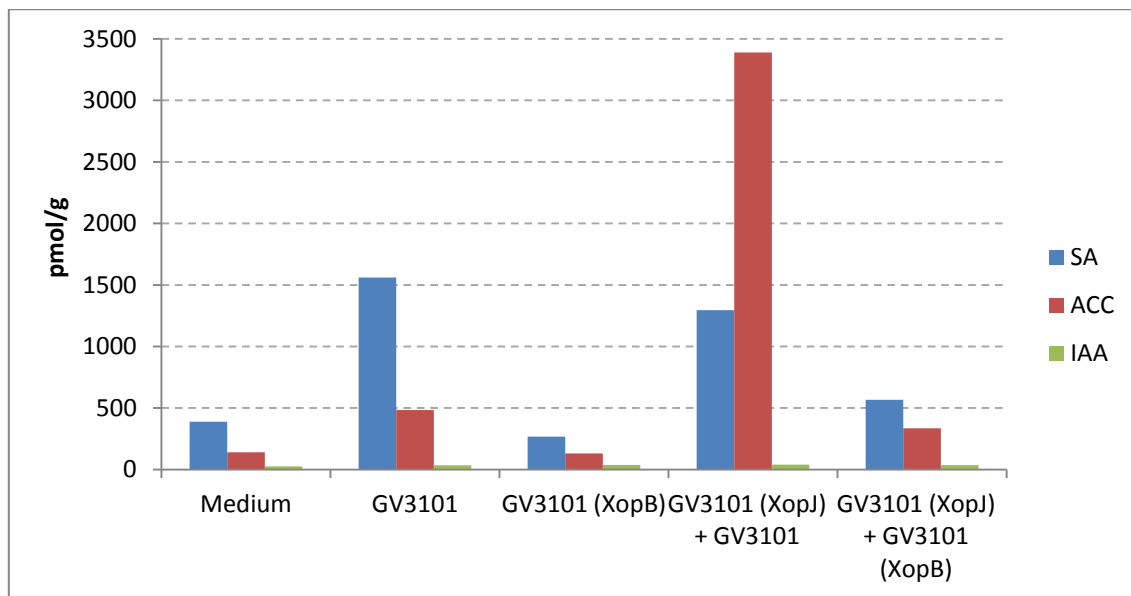


Abbildung 33: XopB reduziert den Gehalt von Salizylsäure (SA) und ACC in der Pflanzenzelle. Agrobakterien, welche die Gene der entsprechenden Effektorproteine in die Pflanze übertragen, wurden großflächig in *N. benthamiana* inokuliert. Nach 24 Stunden wurde Blattmaterial von jeweils drei Pflanzen geerntet, gepoolt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Zellaufschluss und Analyse des Hormongehaltes geschah in Kooperation mit Otto Miersch (IPB, Halle). Der Gehalt von SA und ACC in der Pflanze wird durch XopB deutlich reduziert, auch der durch die Expression von XopJ hervorgerufene starke Anstieg des ACC-Gehaltes. Die Menge von IAA in den Pflanzen blieb von XopB unbeeinflusst. Es wurden 3 vollständig unabhängige Experimente durchgeführt, die jeweils vergleichbare Ergebnisse zeigten. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Messwerte eines Experiments.

3.4.6 Suche nach Pflanzlichen Zielproteinen von XopB

Um einen Einblick in die Funktionsweise von XopB zu erhalten, wurde zur Bestimmung pflanzlicher Interaktoren von XopB eine Hefe-2-Hybrid-Sichtung durchgeführt, wobei XopB in voller Länge als Köder verwendet wurde (Tabelle 3). Nach der Paarung des Köderstammes mit der Y2H-Bibliothek mit c-DNA- Klonen aus Tomate (*Solanum lycopersicum* Kultivar Moneymaker; D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas) wurden die diploiden Hefezellen mit den an XopB bindenden Beuteproteinen auf Minimalmedium ohne Ade, His, Trp und Leu selektiert. Nach 7 Tagen waren 36 Kolonien gewachsen. Die Anzahl von gesichteten diploiden Hefezellen betrug bei dieser Y2H-Sichtung $9 \cdot 10^6$. Von den 36 potentiellen Interaktoren konnten 6 durch einen Spezifitätstest bestätigt werden. Sie reagierten nach Isolierung der Plasmide aus den jeweiligen Hefestämmen, einem Zwischenschritt über *E. coli* und erneuter Transformation in Hefe in einem Y2H-Assay spezifisch mit XopB, aber nicht mit LaminC (Abbildung 34): Zwei unterschiedlich lange cDNA-Fragmente kodieren für ein identisches Protein aus der TPX2 (*targeting protein for Xk1p2*) -Familie. Als weitere Beuteproteine wurden ein putatives Typ 1 Transmembranprotein (PMP1), das bereits als XopG-Interaktor gefundene Protein JAB, ein hypothetisches Protein BIP30 (*XopB interacting*

protein 30) und Ribophorin II (RPN2) identifiziert (Tabelle 9). RPN2 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der Oligosaccharyltransferase (OST; Pfam05817), besitzt 4 Transmembrandomänen und ist in der ER-Membran lokalisiert. Dort spielt es eine Rolle bei der kotranslationalen N-Glykosylierung von Proteinen (Wilson und High, 2007).

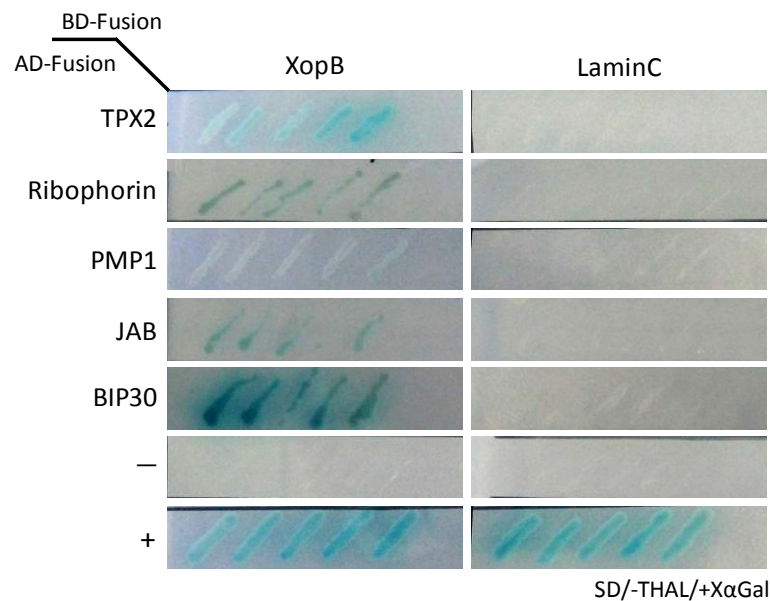


Abbildung 34: Bestätigung der spezifischen Bindung von Beuteproteinen an XopB in Hefe. XopB und LaminC wurden als GAL4-BD-Köderproteine im Hefestamm AH109 (MAT α) und die identifizierten XopB-AD-Beuteproteine im Hefestamm Y187 (MAT α) exprimiert. Die Hefestämme wurden gepaart und die diploiden Hefezellen selektiert. Drei Tage nach dem Überstreichen von je 5 unabhängigen Kolonien auf SD -THAL/X - α -Gal-Medium wurde das Wachstum der Hefezellen dokumentiert. Die putativen Interaktoren TPX2, Ribophorin II, PMP1, JAB1 und BIP30 binden spezifisch an XopB, aber nicht an LaminC. – und + sind ein nicht bindendes Beuteprotein als Negativkontrolle und ein unspezifisch an LaminC bindendes Beuteprotein als Positivkontrolle.

Da die Anzahl der isolierten spezifischen Interaktoren verhältnismäßig gering war und bis auf eine Ausnahme alle Beuteproteine nur einmal gefunden worden waren, wurde eine weitere Hefe-2-Hybrid-Sichtung durchgeführt; um Interaktoren eventuell zu bestätigen bzw. neue zu entdecken. In diesem Experiment war die Anzahl der Diploiden und damit die *Mating*-Effizienz höher als bei der ersten Hefe-2-Hybrid-Sichtung, so dass 59 Hefekolonien wuchsen, die im Hinblick auf ihre Spezifität untersucht wurden. 24 der Beuteproteine interagierten spezifisch mit XopB aber nicht mit LaminC (Daten nicht gezeigt). Unter den spezifischen Interaktoren war das bereits im ersten Screen gefundene TPX2 15-mal vorhanden. 5-mal wurde das Protein Fasciclin aus Tomate isoliert, 2-mal ein 14-3-3 Protein (GenBank: CAA72383.1), einmal ein Protein mit Homologie zur Calcium/Calmodulin Protein Kinase 1 (CCPK) aus *N. tabacum*, das außerdem als Beuteprotein von XopG_{E174A} isoliert worden war und ein Interaktor ohne Homologie und ohne erkennbaren ORF. Alle Interaktoren aus beiden Hefe-2-Hybrid-Sichtungen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung aller identifizierter XopB Beuteproteine.

Homologie des Interaktors	EST Nummer	Wie oft gefunden?	Bemerkungen
TPX2 (targeting protein for Xklp2)	TC209394	17 x	bindet an Mikrotubuli, Regulator des Spindelapparataufbaus während der Mitose
Fasciclin	TC199817	5 x	Zelladhäsionsprotein
14-3-3 Protein	TC218719 TC193978	2 x	Transkriptionsfaktor, GenBank: CAA72383.1
Ribophorin II (RPN2)	TC206381	1 x	Signalpeptid, lokalisiert in ER-Membran, beeinflusst kotranslationale N-Glykosylierung
PMP, putatives Typ I Transmembranprotein	TC218459; TC232269	1 x	Signalpeptid, 1 Transmembrandomäne
hypothetisches Protein (BIP30)	TC220265	1 x	BIP 30, homologe hypothetische Proteine in <i>Ricinus</i> , <i>Populus</i> , <i>Oryza sativa</i>
JAB	TC191610	1 x	put. <i>JUN kinase activation domain binding protein (eukaryotic translation initiation factor 3 related)</i> , auch Interaktor von XopG _{E174A}
CCPK (Calcium/Calmodulin Proteinkinase 1)	TC201488	1 x	auch als XopG _{E174A} -Interaktor gefunden
keine Homologie	TC231551	1 x	Interaktor 18, Sequenz findet sich im Anhang

3.4.7 Silencing von 5 putativen XopB-Interaktoren






Bevor Interaktionsstudien durchgeführt werden, sollte zuerst die biologische Relevanz der Beuteproteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Gene der 5 zuerst isolierten Beuteproteine mit Hilfe von VIGS stillgelegt. Von der Sequenzinformation, die in den isolierten cDNA-Fragmenten enthalten war, wurde jeweils ein zwischen 400 und 500 bp großes Fragment amplifiziert und in den *Silencing*-Vektor pTRV2a kloniert (siehe Anhang). Um das *Silencing* durchzuführen wurden 5 Wochen alte *N. benthamiana* Pflanzen mit einem Gemisch aus Agrobakterien infiziert, die unter anderem jeweils ein *Silencing*-Konstrukt von

TPX2, RPN2, JAB, PMP und dem BIP30 und den Kontrollen leerer Vektor und PDS enthielt. Ziel war es, sowohl eine Veränderung in der AvrBsT-Suppression durch XopB, als auch eine Veränderung der XopB-HR, in Abwesenheit jeweils eines Interaktors zu untersuchen.

Nach 2 Wochen zeigten sich erste weiße Bereiche an den PDS-*Silencing*-Pflanzen. Als einzige zeigten die Pflanzen, in denen JAB stillgelegt wurde, phänotypische Veränderungen. Die Pflanzen waren deutlich kleiner und Blätter und Stängel zeigten morphologische Veränderungen. Die Inokulation für die phänotypische Analyse der *Silencing*-Pflanzen erfolgte drei Wochen nach der VIGS-Infiltration, da sich während verschiedener *Silencing*-Experimente herausgestellt hatte, dass zu diesem Zeitpunkt die Ausprägung der Phänotypen deutlicher ist als nach 2 Wochen. Auf allen *Silencing*-Pflanzen, einschließlich der Kontrollpflanzen, war die Ausprägung der Suppression der AvrBsT durch XopB vergleichbar (Tabelle 10). Für keinen der Interaktoren konnte in diesen Experimenten ein Einfluss auf die Suppression der AvrBsT-HR durch XopB identifiziert werden.

Jedoch war in den Pflanzen bei denen PMP1 oder der BIP30 (hypothetisches Protein) stillgelegt wurden, die XopB-HR stark beeinträchtigt (Tabelle 10). Nur in wenigen Fällen war dort eine sehr schwache Zelltodreaktion zu beobachten. Da auf denselben Pflanzen eine AvrBsT-HR deutlich sichtbar war, kann ausgeschlossen werden, dass die generelle Fähigkeit zur HR durch das *Silencing* verloren gegangen ist. Somit kann man mutmaßen, dass die Beuteproteine PMP1 oder BIP30 an der Erkennung von XopB in der Pflanze beteiligt sein könnten.

Tabelle 10: Einfluss des *Silencing* von 4 XopB-Interaktoren auf die XopB-HR und die Suppression der AvrBsT-HR durch XopB.

Zielgen	XopB-HR				AvrBsT-Suppression				
	durchschnittlicher Phänotyp	ja	schwach /partiell	nein	gesamt	ja	nicht eindeutig	nein	gesamt
leerer Vektor		10	-	-	100 %	7	2	1	90 %
TPX2		4	3	2	78 %	5	-	1	83 %
Ribophorin II		4	1	-	100 %	6	-	-	100 %
PMP1		-	2	6	25 %	5	-	1	83 %
BIP30		-	2	8	20 %	6	-	2	75 %

Die Gene der 4 XopB-Interaktoren wurden durch Virus-induziertes Gen-*Silencing* (VIGS) in *N. benthamiana* stillgelegt, wofür Sequenzbereiche aus den isolierten cDNA-Fragmenten der Beuteproteine als *Silencing*-Fragmente verwendet wurden. 3 Wochen nach dem *Silencing* erfolgte die Inokulation für die phänotypische Analyse der Pflanzen. Mit Hilfe von *Agrobacterium* vermittelter Expression der entsprechenden Effektorproteine wurden sowohl die XopB-HR allein als auch die Unterdrückung der AvrBsT-HR durch XopB untersucht. 3 dpi wurden die Phänotypen dokumentiert. Die Bilder zeigen für die jeweiligen *Silencing*-Pflanzen typische Ausprägungen der XopB-HR. Es wurden zwei unabhängige *Silencing*-Experimente durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Transkripte der Interaktoren reduziert waren, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Von allen *Silencing*-Pflanzen wurde zum Zeitpunkt der Inokulation für die phänotypische Analyse Blattmaterial geerntet. Daraus wurde RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert. Zuvor waren Oligonukleotide abgeleitet worden, die ein ca. 300 bp Fragment des jeweiligen Interaktorgens amplifizieren, welches verschieden vom eingesetzten *Silencing*-Fragment ist (verwendete Oligonukleotide siehe Anhang). Von parallel isolierter Kontroll-cDNA aus nicht inokulierten *N. benthamiana*-

Pflanzen ließen sich Fragmente für TPX2 und PMP1 isolieren, nicht aber für RPN2 und Interaktor30. Für die beiden erstgenannten Interaktoren wurde dann eine RT-PCR durchgeführt. Als Matrizen dienten die cDNAs der jeweiligen *Silencing*-Pflanzen und die cDNAs der Kontrollpflanzen zum Vergleich. In beiden Fällen ist das Transkript in den *Silencing*-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen deutlich reduziert (Abbildung 35).

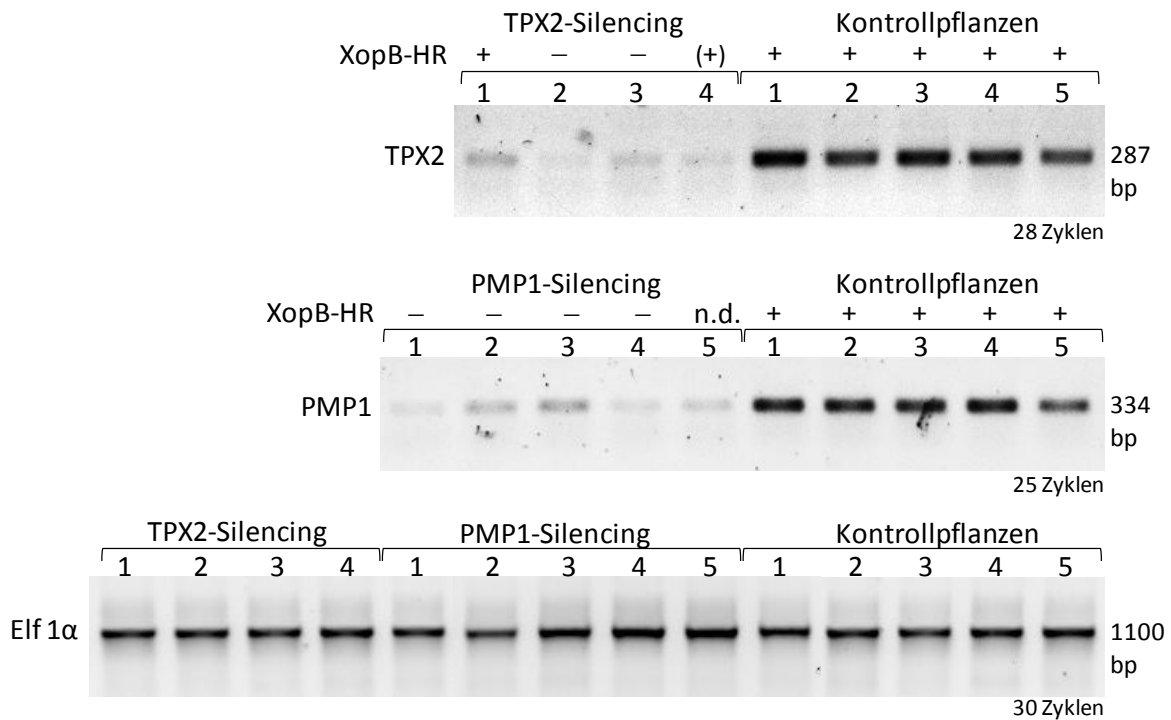


Abbildung 35: Die Transkriptmengen von *TPX2* und *PMP1* wurden durch das Gen-Silencing deutlich reduziert. Analyse der RNA-Mengen von TPX2 und PMP1 durch RT-PCR. 3 Wochen nach Beginn des *Silencing*-Experiments wurde von allen *Silencing*-Pflanzen Blattmaterial geerntet, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend die Mengen der Gene TPX2 und PMP1 durch eine PCR-Reaktion mit einer entsprechenden Zyklenzahl analysiert. Die Zahlen symbolisieren verschiedene Pflanzen. XopB-HR: +, (+) und – zeigen an, ob auf den entsprechenden Pflanzen eine HR, eine schwache HR oder keine Reaktion stattgefunden haben. n.d.: für diese Pflanze liegen keine Daten vor. Als Kontrolle wurde eine PCR mit dem konstitutiv exprimierten Gen aus *N. benthamiana* *Elf1α* durchgeführt. Die Transkriptmenge von TPX2 und PMP1 ist jeweils in den entsprechenden *Silencing*-Pflanzen deutlich reduziert. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Phänotypischen Analysen der analysierten Effektorproteine.

	XopI	XopH	XopG	XopB
vorhergesagte Funktion / Motive	F-box Protein, Repeatsstrukturen	Tyrosin-Phosphatase	Zink-Metallo-Protease	ARM-Repeats
Homologe in anderen Xanthomonaden	<i>Xp</i> , <i>Xac</i> , <i>Xfa</i> , <i>Xcvas</i> , <i>Xcm</i> , <i>Xooc</i>	<i>Xcc</i> (ohne N-Terminus)	<i>Xv</i> , <i>Xcc</i> , <i>Xcm</i> , <i>Xoo</i> , <i>Xg</i>	<i>Xfa</i> , <i>Xg</i> , <i>Xcm</i> , <i>Xcvas</i>
Homologe in anderen Phytopathogenen	---	<i>P. syringae</i> (HopAO1)	<i>P. syringae</i> (HopH1), <i>R. solanacearum</i>	<i>P. syringae</i> (HopD1), <i>P. savastanoi</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>R. solanacearum</i>
Länge (AS) / Gewicht (kDa)	451 / 49	357 / 39	214 / 23	613 / 66
Deletionsmutante	kein Effekt	beeinflusst AvrBs1-HR	verbessertes Wachstum (Wachstumskurve)	kein Effekt (Noël <i>et al.</i> , 2001)
Überexpression in <i>Xanthomonas</i>	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
Überexpression in <i>Agrobacterium</i>	kein Effekt	Suppression der XopJ-HR	HR in Paprika ECW und <i>N. tabacum</i>	Suppression diverser HRs; reduziert SA- und ACC-Gehalt in <i>planta</i> , HR in <i>N. benthamiana</i>
Subzelluläre Lokalisierung	Zytoplasma + Zellkern	Zytoplasma + Zellkern	Zellkern + Nukleolus	ER + Golgi-Apparat

Xp: *Xanthomonas perforans* 91-118, *Xac*: *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri, *Xfa*: *X. fuscans* subsp. *aurantifolia*, *Xcvas*: *X. campestris* pv. *vasculorum*, *Xcm*: *X. campestris* pv. *musacearum*, *Xooc*: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xcc*: *X. campestris* pv. *campestris*, *Xv*: *X. vesicatoria* ATCC 35937, *Xcc*: *X. oryzae* pv. *oryzae* MAFF 311018, *Xg*: *X. gardneri* ATCC 19865

3.5 Verifizierung neuer Effektorproteine

Während dieser Arbeit, sind 3 neue Effektorkandidaten in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifiziert worden: Xcv3215 (XopK), Xcv0285 (XopR) und Xcv0324 (XopS) (F. Thieme, U. Bonas, unveröffentlicht). Um zu untersuchen, ob XopK, XopR und XopS tatsächlich Typ III-Effektoren sind, wurde ihre Sekretion *in vitro* und ihre Translokation in die Pflanzenzelle überprüft. Zu diesem Zweck wurden translationale Fusionen mit dem Effektorprotein AvrBs3 aus *Xcv* hergestellt. AvrBs3 induziert eine HR im resistenten Paprika-Kultivar ECW-30R, welches das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* enthält (Minsavage *et al.*, 1990). Dem Reporterprotein AvrBs3 Δ 2 fehlen die Aminosäuren 2-152, die das Sekretions- und Translokationssignal enthalten. AvrBs3 Δ 2 ist jedoch in der Lage eine HR in resistenten Pflanzen auszulösen, wenn es transient exprimiert wird (Szurek *et al.*, 2002). Die translationale Fusion eines funktionellen T3S- und Translokationssignals ermöglicht die Translokation durch das T3SS und damit die Induktion der HR in ECW-30R-Pflanzen (Noël *et al.*, 2003).

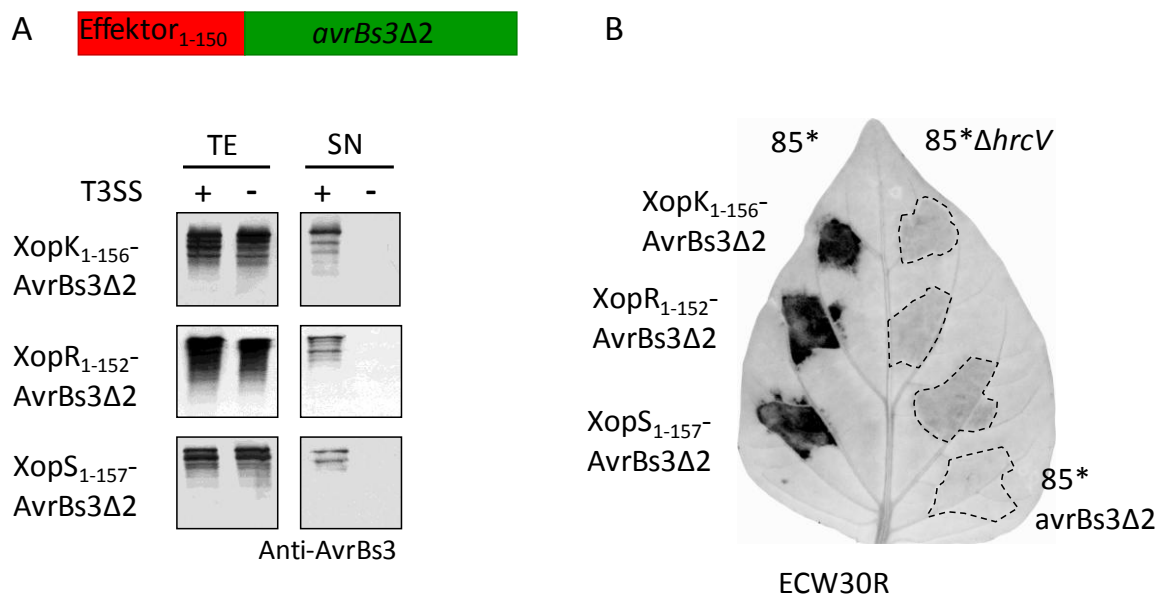


Abbildung 36: Die N-Termini von XopK, XopR und XopS besitzen Typ III-Sekretionssignale und übertragen AvrBs3 Δ 2 in die Pflanzenzelle. (A) *In vitro* Sekretionsanalyse der Xop-AvrBs3 Δ 2 Fusionsproteine. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stämme 85* (T3SS+) und die Typ3-Mutante 85* Δ hrcV (T3SS-) welche die AvrBs3 Δ 2 Fusionsproteine exprimierten wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gleiche Proteinmengen der Totalextrakte (TE) und Überstände (SN) wurden durch Immunoblotting unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers analysiert. (B) *In vivo* Translokationsanalyse. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stämme 85* und die Typ 3-Mutante 85* Δ hrcV welche die AvrBs3 Δ 2 Fusionsproteine exprimierten wurden in AvrBs3-responsive ECW-30R Pflanzen inokuliert. Die Blätter wurden 2 Tage nach Inokulation geerntet und unter UV-Licht, zur besserem Visualisierung der HR, dokumentiert. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Der Promotor und der 5' kodierende Bereich von *xopK*, *xopR* und *xopS* wurden im Plasmid pL6GW356 mit *avrBs3Δ2* fusioniert. Als Kontrolle wurde *AvrBs3Δ2* verwendet. Zusätzlich wurden die Fusionskonstrukte sowohl in 85* als auch in 85* Δ *hrcV* konjugiert. In 85* Δ *hrcV* wurde das Gen einer konservierten Komponente des T3SS deletiert (Rossier *et al.*, 2000). Der Stamm 85* ist ein Derivat des Stammes 85-10, das eine Punktmutation im Gen des Regulators *XopG* trägt, die zur konstitutiven Expression des T3SS führt (Wengelnik *et al.*, 1999).

Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Immunoblot-Analysen unter Verwendung eines *AvrBs3*-spezifischen Antikörpers überprüft (Abbildung 36a). Wenn die Bakterien in Sekretionsmedium inkubiert wurden, waren *XopK*₁₋₁₅₆⁻, *XopR*₁₋₁₅₂⁻ und *XopS*₁₋₁₅₇⁻ *AvrBs3Δ2* in den Kulturüberständen des Stammes 85* nachweisbar, jedoch nicht bei 85* Δ *hrcV* (Abbildung 36a).

Um die Typ III-abhängige Translokation zu überprüfen, wurden die Stämme 85* und 85* Δ *hrcV*, die die oben beschriebenen Fusionsproteine exprimieren, in Blätter von ECW-30R und die nahezu isogene Linie ECW inokuliert. Letztere erkennt *AvrBs3* nicht. Wie in Abbildung 36b gezeigt, lösen die 85*-Stämme, die *XopK*₁₋₁₅₆⁻, *XopR*₁₋₁₅₂⁻ und *XopS*₁₋₁₅₇⁻ *AvrBs3Δ2* Fusionen exprimieren, eine HR in ECW-30R aus, aber nicht in suszeptiblen ECW Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet war keine HR sichtbar, wenn *AvrBs3Δ2* im Stamm 85* exprimiert wurde (Abbildung 36b). Diese Ergebnisse demonstrieren die Typ III-abhängige Translokation der neuen Effektorprotein-Fusionen in die Pflanzenzelle.

4 Diskussion

Die Genome vieler Pflanzenpathogene sind in den letzten Jahren sequenziert worden (Salanoubat *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2011). Dadurch war es möglich, in genomweiten Suchen, zahlreiche neue T3 Effektorkandidaten zu isolieren. Dies geschah beispielsweise aufgrund von Sequenzvergleichen mit anderen Pathogenen, dem Vorkommen eukaryotischer Motive oder vom Genom abweichendem GC-Gehalt (Guttman *et al.*, 2002; Thieme *et al.*, 2005; Thieme, 2006; Furutani *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2009; Samudrala *et al.*, 2009). Die genombasierte Identifizierung neuer Effektorkandidaten gibt jedoch häufig zunächst keinen konkreten Hinweis auf deren Funktion (Thieme *et al.*, 2005). So ist nach der Identifizierung neuer Kandidaten und der experimentellen Bestätigung ihrer Sekretion und Translokation in die Pflanzenzelle ein nächster wichtiger Schritt zum Verständnis der Pathogen-Wirts-Beziehung, die Effektorproteine phänotypisch zu charakterisieren und deren Funktionen und Wirkungsweisen zu untersuchen. Die Untersuchung der Funktion von T3Es wird durch ihre funktionelle Redundanz und damit einhergehend durch das häufige Fehlen klarer Phänotypen erschwert (Noël *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004b; Büttner und Bonas, 2010). Eine weitere Schwierigkeit beim Studium von T3Es ist, dass deren Gen- und Proteinsequenzen häufig wenig oder keine Ähnlichkeit zu Proteinen mit bekannten Funktionen besitzen. Dies macht vergleichende Analysen häufig wenig aussagekräftig und verhindert das einfache Aufstellen von testbaren Hypothesen. Diese Arbeit gibt einen ersten Einblick in die Funktion der 3 neuen Effektorproteine XopG, XopH und XopI. Außerdem wurde der bereits früher beschriebene Effektor XopB (Noël *et al.*, 2001) weiter charakterisiert.

4.1 XopI

Der Effektor XopI ist durch das Vorhandensein eines für Eukaryoten typischen Motivs, der F-Box, identifiziert worden (Thieme, 2006). Die F-Box ist bis auf wenige bekannte Ausnahmen nur in eukaryotischen Proteinen zu finden, die Bestandteil des SCF (Skp1/Cullin/F-Box Protein) E3 Ubiquitin Ligase Komplexes sind. Dieser besteht neben dem F-Box Protein aus Skp1 (*suppressor of kinetochore protein*), Cullin 1, Rbx1 (Ring-Box 1) und Roc1 (Regulator of Cullin 1) und kontrolliert spezifisch die Ubiquitinierung von Proteinen. Anschließend werden die ubiquitinierten Proteine durch einen multikatalytischen Proteasekomplex, das 26S

Proteasom, abgebaut (Craig und Tyers, 1999; Kipreos und Pagano, 2000). Dieser Prozess ist in der Pflanze für viele Entwicklungsprozesse essentiell: diese reichen von der Phytohormon-Signalübertragung über die Blütenentwicklung bis hin zu Stressantworten (Ho *et al.*, 2008). Interessanterweise besitzt das in dieser Arbeit untersuchte Effektorprotein XopI als einziges in *Xcv* solch ein F-Box-Motiv.

XopI-homologe Proteine sind hingegen in verschiedenen Xanthomonaden konserviert: in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (94% Identität), *Xanthomonas fuscans* spp. *aurantifolii* str. ICPB 11122 (95% Identität) und hypothetische Proteine in *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* NCPPB702 (82% Identität) und *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* NCPPB4381 (82% Identität). Homologen Proteinen in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* und *Xanthomonas fuscans* spp. *aurantifolii* str. ICPB 10535 fehlt der für die F-Box kodierende N-Terminus. Außerhalb der Gattung *Xanthomonas* ist kein zu XopI homologes Protein bekannt. F-Box-Proteine besitzen neben der namensgebenden F-Box häufig *Repeat*-Strukturen, die der spezifischen Proteinbindung dienen. Die an diese Regionen bindenden Proteine werden so zum E3 Ligasekomplex rekrutiert. Auch XopI besitzt ARM-*Repeat*-Strukturen im C-terminalen Bereich, die für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich sein könnten. So könnte XopI Proteine zum SCF-Komplex rekrutieren und somit deren Ubiquitinierung und Degradation einleiten (Thieme, 2006). Ein wichtiger Schritt, um einen Hinweis auf die Funktion von XopI zu erhalten, sollte deshalb die Suche nach pflanzlichen Zielproteinen mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung sein. XopI war jedoch als Köderprotein ungeeignet, da es in Hefe mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert. Auch der Versuch, die F-Box oder die *Repeats* des Proteins einzeln als Köder zu nutzen, scheiterte, da diese, wie das Volllängenprotein, unspezifisch mit einem Kontrollprotein interagierten (Abbildung 10).

Ein XopI-spezifischer Phänotyp konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. So verhielt sich eine XopI-Deletionsmutante in *Xcv* unverändert im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10. Dies ist nicht ungewöhnlich und trifft, wie bereits erwähnt, auf viele T3Es zu (Kvitko *et al.*, 2009; Büttner und Bonas, 2010). Auch die Überexpression von XopI in *Xanthomonas* oder mittels *Agrobacterium* in Tomatenpflanzen, verschiedenen Paprika-Kultivaren sowie einer Vielzahl anderer Solanaceen ergab keine spezifische Reaktion einer Pflanze auf das Effektorprotein. Eine weitere Möglichkeit Rückschlüsse auf die Funktion eines Effektorproteins ziehen zu können, ist die Ermittlung der subzellulären Lokalisierung des Proteins in der Pflanze. XopI-GFP-Fusionen sind nach zwei Tagen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus sichtbar. Diese Lokalisierung widerspricht sich nicht mit einer Funktion am SCF-Komplex, gibt aber keinen weiteren Hinweis auf die Funktion von XopI.

Dennoch lohnt sich für die Zukunft eine genauere Untersuchung von XopI. Denn verschiedene pathogene Bakterien besitzen Proteine mit einer F-Box-Domäne und in einigen Fällen konnte bereits eine wichtige Rolle bei der Infektion gezeigt werden: Das erste bekannte Beispiel war VirF aus *Agrobacterium tumefaciens*, dem Auslöser von Wurzelhalsgallen an verschiedenen Pflanzen. Das F-Box-Protein VirF interagiert in der Pflanzenzelle mit dem SKP1-ähnlichen Proteinen ASK1/2 (Schrammeijer *et al.*, 2001). Inzwischen ist bekannt, dass VirF den Abbau von 2 Komponenten des T-Komplexes bewirkt und damit die T-DNA vor ihrer Integration ins Wirtsgenom freilegt (Tzfira *et al.*, 2004). Warum VirF für die Infektion einiger aber nicht aller Pflanzen benötigt wird, ist noch nicht bekannt (Lechner *et al.*, 2006). In *R. solanacearum* gibt es eine Familie von 7 Typ-III-Effektorproteinen die eine F-Box und eine LRR-Domäne besitzen. Sie wurden aufgrund einer konservierten GAXALA Sequenz in ihrer LRR-Domäne GALA-Proteine genannt. Es konnte durch Deletion aller 7 Gene gezeigt werden, dass sie für die Pathogenität in *Arabidopsis* essentiell sind und stark zur Virulenz in Tomate beitragen (Angot *et al.*, 2006). Einer der GALA-Effektoren, GALA7 bestimmt die Wirtsspezifität und wird für die Virulenz in *Medicago truncatula* benötigt. Da die F-Box essentiell für die Virulenzfunktion von GALA7 ist, wird angenommen, dass Effektoren dieser Familie agieren, indem sie den SCF-Komplex nutzen, um ein Wirtsprotein dem Proteasom zu überführen. Denkbar wäre ein positiver Regulator der basalen Abwehr (Angot *et al.*, 2006). Für die Zukunft ist verschiedenes experimentelles Vorgehen denkbar, auf einige Möglichkeiten wird in Kapitel 4.4. eingegangen.

4.2 Der Typ III-Effektor XopH

Das in dieser Arbeit untersuchte Effektorprotein XopH ist auf dem größten Plasmid von *Xcv* 85-10, pXC183, und stromaufwärts des Effektorgens *avrBs1* kodiert. Dennoch sind diese beiden Effektoren unterschiedlich reguliert: Während *AvrBs1* konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression von XopH HrpG- und HrpX-abhängig induziert (Escolar *et al.*, 2001; Thieme, 2006). Die offenen Leserahmen besitzen eine Länge von 1071 bp (*xopH*) und 1338 bp (*avrBs1*) und sind durch 90 Nukleotide voneinander getrennt. Da bei dieser räumlichen Nähe der Promotor von *avrBs1* möglicherweise im *xopH*-Gen lokalisiert ist, wurde versucht, beim Erstellen der *xopH*-Deletionsmutante diesen Promotor zu erhalten. Denn der Fokus in dieser Arbeit lag darauf, einen Phänotyp in der Pflanze zu identifizieren, der einzig auf die Abwesenheit des XopH-Proteins zurückzuführen ist. Jedoch führt sowohl eine partielle Deletion von *xopH*, die einen DNA-Bereich von ca. 600 Nukleotiden stromaufwärts des

avrBs1-Gens erhält, als auch das Einführen einer *frameshift*-Mutation in *xopH*, zur Verzögerung der AvrBs1-spezifischen HR. Dieser Phänotyp ist bereits früher beobachtet worden: Er trat nach N-terminaler Exonuklease III-Deletion des Bereichs stromaufwärts von *avrBs1* in einem pLAFR3 Plasmid auf und wurde als „intermediate“ bezeichnet (Ronald und Staskawicz, 1988). Jedoch war in diesen Experimenten ein DNA-Abschnitt von 497 nt stromaufwärts von *avrBs1* für eine HR in voller Stärke ausreichend. Erst wenn die Nukleotide bis zur Position 348 stromaufwärts von *avrBs1* deletiert waren, wurde der „intermediate“ Phänotyp beobachtet. Abweichend davon hatte in dieser Arbeit die genomische Deletion eines Teils von *xopH*, bei der 581 nt stromaufwärts von *avrBs1* erhalten blieben, bereits einen Einfluss auf die AvrBs1-HR. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass in dieser Arbeit die Deletionen auf dem endogenen Plasmid von *Xcv* pXCV183 vorgenommen wurden, während die Expression bei Ronald *et al.*, 1988 von dem *low copy number* Plasmid pLAFR3 erfolgte, welches einen *lac*-Promotor besitzt (Staskawicz *et al.*, 1987).

Der Einfluss des *xopH*-Gens auf die Stärke und Reaktionszeit der AvrBs1-HR lassen vermuten, dass die *avrBs1*-Expression von 2 Promotoren reguliert werden könnte. Es entsteht möglicherweise ein gemeinsames Transkript von *xopH* und *avrBs1*, welches HrpG- und HrpX-abhängig induziert wird und ein kürzeres Transkript von *avrBs1*, das konstitutiv abgelesen wird. Das längere Transkript wird durch die Mutation im *xopH*-Gen zerstört, während AvrBs1 weiterhin konstitutiv, wenngleich auf niedrigerem Niveau exprimiert wird. Man könnte mit Northern-Blot-Analysen diese Annahme überprüfen, wobei mit einer *avrBs1*-spezifischen Sonde die verschieden großen mRNAs nachgewiesen werden könnten.

4.2.1 *XopH* unterdrückt in Abhängigkeit von seiner enzymatischen Aktivität Zelltod

Eine Veränderung der Pathogenität von *Xcv* 85-10, die einzig auf die Abwesenheit von XopH zurückzuführen ist, konnte nicht beobachtet werden. Dies ist ein entscheidender Unterschied zu Beobachtungen des homologen T3S HopAO1, dessen Deletion zu reduzierter Virulenz in *Arabidopsis* führt (Espinosa *et al.*, 2003; Bretz *et al.*, 2003). Jedoch erbrachte die Überexpression von XopH *in planta* mittels *Agrobacterium* neue Hinweise auf die mögliche Funktion des Effektors. So ist XopH in der Lage, eine durch den T3E XopJ ausgelöste Zelltodreaktion in *N. benthamiana* zu unterdrücken. XopJ ist ein Mitglied der YopJ/AvrRxv Familie von SUMO Peptidasen und Acetyltransferasen, eine enzymatische Aktivität wurde bisher jedoch nicht demonstriert (Bartetzko *et al.*, 2009). Die XopJ-HR ist, im Gegensatz zu anderen durch Effektorproteine ausgelösten Reaktionen wie beispielsweise AvrBs1, AvrBs2 oder AvrBs3, eine relativ schwache und langsame Reaktion und somit nicht als HR im

eigentlichen Sinne, vielmehr als Zelltod zu bezeichnen. Sie ist nach 3-4 Tagen ausgeprägt und in der Ausprägung und Stärke abhängig vom Standort der Pflanzen. Auch die durch MAMPs hervorgerufene Abwehr (PTI) scheint im Gegensatz zu vielen durch Effektoren ausgelösten Resistenzreaktionen (ETI) durchschnittlich schwächer zu sein (Tao *et al.*, 2003; Boller und Felix, 2009). Darüber hinaus wird inzwischen angenommen, dass es eine Überlappung in der Signaltransduktion von PTI und ETI gibt (Tsuda und Katagiri, 2010; Block und Alfano, 2011). Daher wäre es spannend zu untersuchen, ob XopH in die basale Abwehr der Pflanzen eingreift. Dafür sind verschiedene Vorgehensweisen denkbar, auf die genauer unter 4.4.1 im Zusammenhang mit XopB eingegangen wird.

Hinweise darauf ergeben sich auch bereits aus Untersuchungen des homologen T3E HopAO1 aus *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. So ist gezeigt worden, dass HopAO1 in Tabak, den durch die transiente Expression einer konstitutiv aktiven MAPKK initiierten, Zelltod unterdrücken kann (Espinosa *et al.*, 2003). HopAO1 besitzt, wie XopH, eine Tyrosinphosphatasedomäne mit dem konservierten Motiv (HCxxGxxRS/T), welches typisch für Tyrosinphosphatasen ist (Bretz *et al.*, 2003; Thieme, 2006). Inzwischen ist bekannt, dass auch XopH, wie zuvor für HopAO1 gezeigt, *in vitro* Tyrosinphosphataseaktivität besitzt (Espinosa *et al.*, 2003; Bretz *et al.*, 2003; Potnis *et al.*, 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tyrosinphosphataseaktivitätsmotiv essentiell für die Funktion von XopH ist: Es findet keine Unterdrückung des XopJ-Zelltods mehr statt, wenn das Cystein an Position 267 im Aktiven Zentrum gegen ein Serin ausgetauscht wird. Es handelt sich hier um einen moderaten Eingriff in die Proteinstruktur, von dem bereits gezeigt wurde, dass er die Tyrosinphosphataseaktivität der homologen Effektoren HopAO1 aus *P. syringae* und AvrBs7 aus *X. gardneri* vollständig verhindert (Espinosa *et al.*, 2003; Potnis *et al.*, 2012). Man kann daher mutmaßen, dass XopH durch seine Tyrosinphosphataseaktivität den durch XopJ ausgelösten Zelltod unterdrücken kann. Ob dies durch eine Reduzierung der XopJ-Proteinmenge durch XopH geschieht, muss jedoch in weiteren Experimenten noch ausgeschlossen werden. Übereinstimmend zeigen Espinosa *et al.* in ihrer Arbeit ebenfalls, dass die Unterdrückung des durch Infektion mit *P. syringae* ausgelösten Zelltodes von der Tyrosinphosphataseaktivität abhängig ist. Interessanterweise ist auch die Erkennung von XopH in Paprika ECW-70R abhängig von seiner Tyrosinphosphataseaktivität (Potnis *et al.*, 2012). Darüber hinaus kann, übereinstimmend mit Untersuchungen an XopH in dieser Arbeit, auch HopAO1 keine durch klassische Avr-Proteine hervorgerufene HR in Wirts- oder Nicht-Wirtspflanzen unterdrücken (Jamir *et al.*, 2004; Underwood *et al.*, 2007).

Die Tyrosin-Phosphataseaktivität implizierte MAPKs als ein wahrscheinliches Virulenzziel von HopAO1, denn Tyrosin-Phosphorylierung ist in Pflanzen fast ausschließlich mit MAPK Signaltransduktion verknüpft (Pedley und Martin, 20005; Underwood *et al.*, 2007). Jedoch konnte die Hypothese, dass HopAO1 die PTI durch Dephosphorylierung der in die Signalweiterleitung von den PRRs involvierten MAPKs AtMPK3 und AtMPK6 unterdrückt, nicht bestätigt werden (He *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007). Es wird daher angenommen, dass HopAO1 stromabwärts in der MAPK-Signalweiterleitung wirkt.

4.2.2 *XopH* agiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, in welchem Zellkompartiment XopH eine Funktion hat, wurden GFP-Fusionen von XopH erstellt. Diese waren sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von *N. benthamiana*-Zellen nachweisbar. Eine Lokalisierung, die XopH mit anderen Effektorproteinen, beispielsweise XopI, teilt und die allein noch keinen genaueren Schluss auf den Wirkort des Effektorproteins zulässt. Durch die Fusion eines NES-Signals an XopG konnte der Wirkort von XopH weiter eingegrenzt werden. Eine kernausgeschlossene NES-Fusion von XopH besitzt immer noch CDS-Aktivität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass XopH im Zytoplasma agiert.

4.2.3 *WRKY1* und *LeArcA1* wurden als Beuteproteine von *XopH* isoliert

Bei einem Hefe-2-Hybrid-Sceen wurden als mögliche pflanzliche Interaktoren von XopH ein Transkriptionsfaktor, der zur WRKY-Familie gehört, und das Protein LeArcA1, ein vorhergesagtes *Scaffold*-Protein, identifiziert. Sie lokalisieren im Zellkern bzw. im Zellkern und Zytoplasma, so dass sie als potentielle Zielproteine von XopH in Frage kommen, welches im Zellkern und Zytoplasma. In der Tat könnte die Bindung an WRKY1 den Mechanismus für die Zelltodunterdrückung durch XopH darstellen. Für das homologe Protein WRKY1 aus Tabak konnte gezeigt werden, dass es durch die SA-induzierte MAP Kinase SIPK phosphoryliert wird und dadurch einen HR-ähnlichen Zelltod auslöst (Menke *et al.*, 2005). So kann man spekulieren, dass XopH durch Nutzung der Tyrosinphosphataseaktivität den Phosphatrest entfernen könnte, WRKY1 inaktiviert und den Zelltod verhindert.

Auch das Beuteprotein *LeArcA1* verleitet zu interessanten Spekulationen. Es gehört zur WD40-Superfamilie, zu der Proteine mit verschiedensten Funktionen gehören; beispielsweise Adaptoren oder regulatorische Module in der Signaltransduktion, Proteine mit Funktionen beim prä-mRNA Processing oder Aufbau des Zytoskeletts (NCBI: cd00200). Ein zu 91 %

identisches und 95 % ähnliches Protein aus *N. benthamiana* wurde als β -Untereinheit 1 eines heteromeren G Proteins annotiert. Die Proteinsequenz wurde im Mai 2009 von M. Wang und Z. Zhang unter dem Titel „Heterotrimeric G protein function in elicitor-triggered HR cell death and stomatal closure“ direkt unter der Akzessionsnummer GQ223794.1 in die NCBI-Datenbank eingestellt, ist jedoch darüber hinaus unpubliziert. Der Titel deutet darauf hin, dass dieses zu LeArcA1 hoch homologe Protein eine Funktion in der durch MAMPs induzierten HR sowie beim Schließen der Stomata haben könnte. Die Proteinsequenz von *LeArcA1* und homologen Proteinen ist hoch konserviert in Eukaryoten von Algen über höhere Pflanzen bis hin zu Säugetieren (Guo und Chen, 2008). Ein weiteres und bereits besser charakterisiertes homologes Protein ist RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) aus *Arabidopsis*. Es ist zu 81 % identisch und 90 % ähnlich zu *LeArcA1* und ist in verschiedene hormonabhängige Signaltransduktionswege und Entwicklungsprozesse involviert, indem es als vielseitige Plattform (*scaffold*) agiert (Chen *et al.*, 2006; Guo und Chen, 2008). In Reis wird die Transkription von RACK1 durch verschiedene Stimuli, wie einen pilzlichen Elicitor, Abszissinsäure (ABA), Jasmonat oder Auxin induziert (Nakashima *et al.*, 2008). Es spielt dann eine Rolle bei der Produktion von ROS und bei der Resistenz gegen die Brusone-Krankheit (*rice blast*). Es konnte gezeigt werden, dass RACK1 in einem Komplex unter anderem mit den wichtigen Regulatoren der pflanzlichen Resistenzreaktion: RAR1 und SGT1 interagiert. Es wird vermutet, dass RACK1 eine Rolle bei der pflanzlichen Immunität spielt, indem es als Plattform für diesen Immunkomplex dient (Nakashima *et al.*, 2008).

Die in Hefe gefundenen Interaktionen ließen sich jedoch nicht auf die Pflanze übertragen. Weder für WRKY1 noch für *LeArcA1* konnte mit Hilfe von BiFC eine Interaktion mit XopH nachgewiesen werden. Dass eine Interaktion mit dieser Methode nicht nachweisbar ist, muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass Sie in der Pflanze nicht stattfindet. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die an die Proteine fusionierten Hälften des Gelb-fluoreszierenden Proteins die Interaktion sterisch behindern. Die Interaktion könnte beispielsweise *in vitro* durch einen GST (Glutathion-S-Transferase) – *pull down* oder *in vivo* durch Koimmunopräzipitation in der Pflanze untersucht werden. Dabei sollten sowohl N-terminale als auch C-terminale und unterschiedlich große Epitop-Fusionen analysiert werden, um sterische Effekte auszuschließen.

Um eine Aussage über die biologische Relevanz der putativen Interaktoren treffen zu können, ist eine häufig angewandte Möglichkeit, die Gene der entsprechenden Interaktoren durch Gen-*Silencing* stillzulegen und eine Veränderung des für den Effektor spezifischen Phänotyps in den *Silencing*-Pflanzen zu untersuchen. Dazu ist jedoch ein relativ stabiler Phänotyp des

Effektors nötig, der sich unter den beim *Silencing* herrschenden Bedingungen im Gewächshaus zuverlässig reproduzieren lässt. Dies ist jedoch bei der Unterdrückung der XopJ-HR durch XopH nicht gegeben. Bei Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass die XopJ-HR auf *Silencing*-Pflanzen nicht sichtbar ist, was anscheinend auf die generelle Antwort der Pflanze auf das Virus-induzierte-Gen-*Silencing* zurückzuführen ist.

4.3 Das Typ III-Effektorprotein XopG

4.3.1 *XopG* wird spezifisch in Paprikapflanzen erkannt

Eine Hauptaufgabe bakterieller Effektorproteine ist, die Abwehr der Pflanze zu unterdrücken (Guo *et al.*, 2009). Dabei greifen sie an verschiedensten Stellen in die pflanzliche Abwehr ein. Pflanzen haben jedoch Mechanismen entwickelt, einige Effektoren zu erkennen und in einer spezifischen Reaktion Zelltod auszulösen um so das Wachstum des Pathogens zu stoppen (Boller und He, 2009). So wird auch das Effektorprotein XopG von Paprikapflanzen erkannt und löst, wenn es transient mittels *Agrobacterium* in ECW-Pflanzen exprimiert wird, innerhalb von 3 Tagen eine Abwehrreaktion aus. Dass es sich hierbei um eine Reaktion hoher Spezifität handelt, zeigt die Tatsache, dass sie in ECW-Paprikapflanzen erfolgt, nicht aber in ECW-30R-Pflanzen (Abbildung 17). Dieser Unterschied in der Erkennung von XopG war unerwartet, da es sich hierbei um zwei nahezu isogene Linien handelt, die sich neben dem Bs3-Lokus vermutlich nur in wenigen chromosomalen Abschnitten unterscheiden (Minsavage *et al.*, 1990). Ein direkter Einfluss des Bs3-Proteins auf die Erkennung von XopG konnte ausgeschlossen werden, da eine zusätzliche *Agrobacterium* vermittelte Übertragung von Bs3 in ECW-Pflanzen, die frühere Reaktion der Pflanze auf XopG nicht verändert. Auch der alleinige Einfluss des Bs3-Gens auf die Erkennungsspezifität konnte ausgeschlossen werden. Denn bei der Inokulation von F2-Pflanzen einer Kreuzung zwischen ECW und ECW-30R spaltete sich die Erkennung von AvrBs3 wie erwartet im Verhältnis 3:1 auf. Bei Pflanzen mit fehlender AvrBs3-Reaktion war jedoch auch keine XopG-HR zu beobachten. Abwesenheit von Bs3 scheint also nicht unmittelbar mit der XopG-HR verknüpft zu sein. Da auch keine für eine Gen-für-Gen-Antwort typische Aufspaltung der XopG-HR zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass verschiedene Gene an der Erkennung von XopG beteiligt sind.

4.3.2 XopG verzögert das Wachstum von Xcv

Es bleibt zu untersuchen, ob die Erkennung von XopG auch in *Xcv* nachgewiesen werden kann. Eine mögliche Vorgehensweise ist die Expression von XopG in einem *Xcv*-Stamm, der nur sehr eingeschränkt Effektorproteine in die Pflanze transloziert. Da eine multiple Effektor-Deletionsmutante in *Xcv* momentan noch nicht zur Verfügung steht, könnte beispielsweise die Deletionsmutante *Xcv* 85-10 Δ *hpaB* genutzt werden, von der bekannt ist, dass sie Effektoren gar nicht mehr oder nur stark reduziert sekretiert, aber nicht-Effektorproteine, wie z.B. XopA, in die Pflanzenzelle transloziert. Die ersten 51 Aminosäuren von XopA sind dafür ausreichend (Büttner *et al.*, 2004) und könnten an XopG fusioniert werden.

Einen ersten Hinweis auf die Erkennung von in *Xcv* exprimiertem XopG ist die Erkenntnis, dass die *Xcv* 85-10 *xopG*-Deletionsmutante in Paprika ECW-Pflanzen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp besitzt (Abbildung 16). Dies war in einigen Fällen auch phänotypisch zu beobachten, da die für Wachstumskurven mit niedriger Bakteriendichte inokulierten Bereiche nach 12 Tagen stärkere Krankheitssymptome und Nekrosen aufwiesen als die des WT-Stammes. Des Weiteren ist die Erkennung von XopG in einigen Solanaceen (Tabelle 4) ein Nachteil für *Xcv*, der durch Suppression der Erkennung ausgeglichen werden muss. Das Typ III-Effektorprotein XopB konnte in dieser Arbeit als ein Suppressor der XopG-Erkennung identifiziert werden. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass zusätzlich weitere Effektorproteine oder andere Mechanismen an der Unterdrückung des Zelltods beteiligt sein müssen. Eine Untersuchung weiterer Effektoren auf mögliche Suppressoraktivitäten wäre daher sinnvoll.

Doch obwohl XopG für *Xcv* scheinbar nachteilige Auswirkungen hat, spricht die Tatsache, dass XopG-homologe Proteine in verschiedenen Xanthomonaden sowie in Pseudomonaden, *Ralstonia* und *Acidovorax* im Genom zu finden sind, auf eine wichtige noch unbekanntes Virulenzfunktion hin.

4.3.3 Zink-Bindemotiv und Kernlokalisierung sind Voraussetzungen für die Erkennung von XopG in Paprika

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei XopG, wie auch bei anderen homologen Proteinen der HopH1-Familie um Zink-Metalloproteasen handelt (Lindeberg *et al.*, 2005; Thieme, 2006). Allen gemeinsam ist, dass sie ein Zink-Bindemotiv, ähnlich zu dem von Botulinumtoxin A aus *Clostridium botulinum*, besitzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Zink-Bindemotiv essentiell für die Erkennung von XopG in Paprikapflanzen

ist. So führt ein Austausch von Glutamat an Position 174 gegen Alanin zu einem vollständigen Ausbleiben der Zelltodreaktion (Abbildung 18).

Botulinumtoxin A ist ein Neurotoxin, das in Säugern spezifisch SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors*) Proteine spaltet. Dadurch wird die Fusion der synaptischen Vesikel mit den Nervenenden blockiert und somit die Freisetzung von Neurotransmittern verhindert (Lalli *et al.*, 2003). Es gibt verschiedene Proteine, die zur SNARE-Familie gehören und denen gemein ist, dass sie die Fusion von Vesikeln mit Zielmembranen vermitteln (Pratelli *et al.*, 2004). Sie binden spontan aneinander und ermöglichen durch die so freiwerdende Energie die Fusion der Membranen (Lipka *et al.*, 2007). In höheren Pflanzen gibt es im Vergleich zu Säugetieren eine deutlich größere Anzahl und Komplexität von SNARE-Genen, dies hängt vermutlich mit der komplexeren Membranstruktur in Pflanzen zusammen (Robatzek, 2007). SNAREs spielen eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr (Lipka *et al.*, 2007), so sind sie beispielsweise an dem Transport von Golgi-Vesikeln beteiligt, z.B. bei der Freisetzung von ROS. Es ist daher spekuliert worden, dass XopG in Pflanzen für die Spaltung von SNAREs verantwortlich sein könnte (Thieme, 2006). Das Eingreifen von Effektorproteinen in die Sekretion von pflanzlichen Wirtsproteinen ist bereits für XopJ beschrieben worden (Bartetzko *et al.*, 2009). Jedoch ist XopG nicht wie XopJ an pflanzlichen Membranen zu finden (Thieme *et al.*, 2007), sondern akkumuliert im pflanzlichen Zellkern und dort insbesondere im Nukleolus (Abbildung 18). Zudem ist es wahrscheinlich, dass XopG innerhalb des Zellkernes agiert, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass ein kernausschlossenes NES-Fusionsprotein in der Pflanze nicht mehr erkannt wird (Abbildung 19). Dies und die Tatsache, dass sich unter den in dieser Arbeit isolierten pflanzlichen Zielproteinen von XopG kein Protein mit Homologie zu SNAREs identifiziert wurde (Tabelle 6 und Tabelle 7), legt die Vermutung nahe, dass die Virulenzfunktion von XopG eine andere ist, als zuvor angenommen.

Im Nukleolus findet unter anderem die Transkription und Prozessierung nicht kodierender RNA und der Zusammenbau von der rRNA zu Ribosomen statt. Es ist jedoch bekannt, dass sich dort viele weitere Prozesse abspielen, so gibt es beispielsweise 217 nukleoläre Proteine unterschiedlicher Funktion in *Arabidopsis* (Boisvert *et al.*, 2007). Es sind bereits umfassende Nachweise erbracht worden, dass der Nukleolus sowohl in die Antwort auf zellulären Stress als auch in die Regulation des Zellzyklus und Zellwachstum involviert ist (Emmott und Hiscox, 2009). Als erstes bakterielles Protein wurde für den Typ III-Effektor EspF des enteropathogenen *E. coli* (EPEC) beschrieben, dass er spezifisch im Nukleolus akkumuliert und nukleoläre Proteine, wie das am stärksten präsenzte Nukleolin, in ihrer Funktion stört

(Dean *et al.*, 2010). Zuvor war dieser Mechanismus nur von Viren bekannt. So scheint es möglich, dass XopG direkt in die Transkription eingreift, indem es beispielsweise einen Transkriptionsfaktor, ein regulatorisches Protein oder ein RNA-bindendes Protein spalten könnte.

Um das Lokalisierungssignal von XopG näher zu untersuchen, wäre es sinnvoll gezielte Punktmutationen in die beiden putativen Kernlokalisierungssignale RKNRK (AS54-58) und RKKYN(A205-209) von XopG einzuführen. Dies müsste sowohl einzeln als auch kombiniert an beiden Positionen erfolgen, um zu prüfen, ob, wie vermutet, das C-terminale Signal für die Kernlokalisierung verantwortlich ist und das N-terminale Signal für die Lokalisierung im Nukleolus (Abbildung 23).

4.3.4 Die Erkennung von XopG erfolgt indirekt

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass XopG nicht durch die direkte Bindung an ein Zielprotein erkannt wird. Vielmehr könnte die Spaltung oder Veränderung eines Wirtsproteins erkannt werden. Denn die Mutation E174A im Zink-Bindemotiv von XopG verhindert die Erkennung durch die Pflanze, dies ist aber weder auf eine Fehllokalisierung von XopG_{E174A} innerhalb der Zelle noch mutmaßlich auf eine Fehlfaltung des Proteins zurückzuführen (Abbildung 18). Letztere sollte in der gewählten Mutante weitestgehend unbeeinflusst sein (Rigoni *et al.*, 2001). Die Veränderung eines Proteins durch XopG ist anscheinend für das Einleiten der Abwehrreaktion notwendig. Dies deutet gemeinsam mit der Annahme, dass mehr als ein pflanzliches Protein an der Erkennung beteiligt ist (vergl. 4.3.1), darauf hin, dass XopG an ein Virulenzziel oder Decoy-Protein binden könnte (van der Hoorn und Kamoun, 2008; Block und Alfano, 2011), dieses eventuell modifiziert oder spaltet und dass diese Modifikation oder Spaltung durch einen pflanzlichen Rezeptor registriert wird, der dann eine Abwehrkaskade auslöst.

4.3.5 XopG interagiert in planta mit den kernlokalisierten Proteinen SPRY und RRM

Bei einer Hefe-2-Hybrid-Sichtung mit dem WT XopG-Protein als Köder, sind 2 kernlokalisierte Interaktoren, ein RNA-bindendes Protein (RRM) und ein Protein mit einer SPRY-Domäne (SPRY) isoliert und näher untersucht wurden. Eine Interaktion mit einem ebenfalls isolierten pflanzlichen Porin erwies sich aufgrund fehlender Kolo-kalisierung mit XopG und aufgrund des Vorkommens von poly A im isolierten cDNA-Fragment als unwahrscheinlich. Insgesamt waren von 18 der insgesamt 37 potentiellen Interaktoren DNA-Fragmente isoliert worden, die entweder nur für poly-Lysin kodieren oder für ein kurzes

Peptid und poly-Lysin, so dass dies zur Annahme führte, dass die Bindung dieser Kandidaten und auch des Porin auf die Bindung von XopG an Poly-Lysin zurückzuführen sein könnte (Tabelle 6).

Die Interaktion von XopG mit RRM und SPRY konnte *in planta* durch Split-YFP-Experimente bestätigt werden. So wurde für YN/YC-Fusionen beider Interaktoren nach Koexpression mit XopG-YN bzw. XopG-YC ein YFP-Fluoreszenzsignal im Zellkern detektiert. Die Akkumulation aller drei Proteine im pflanzlichen Zellkern war zuvor durch GFP-Fusionsproteine gezeigt worden. Die Interaktion zwischen XopG und RRM wurde zusätzlich durch Koimmunopräzipitation bestätigt (Abbildung 26).

RRM ist ein Serin/Arginin-reiches Protein, welches eine RNA-Bindestelle ein sogenanntes RNA *recognition motif* (RRM) besitzt. Proteine mit RRM-Domänen sind ubiquitär verbreitet und in posttranskriptionelle Prozesse (RNA-Prozessierung, -Stabilisierung, -Editierung, -Abbau und translationale Regulation) involviert (Maris *et al.*, 2005). Es gibt bereits Beispiele, dass Effektoren auf RNA-bindende Proteine Einfluss nehmen können, so modifiziert HopU1 *AtGRP7*, das ein RRM-Motiv besitzt, durch seine mono-ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Fu *et al.*, 2007).

Blast-Suchen mit der Aminosäuresequenz von RRM identifizierten SR45 aus *Arabidopsis* als bekanntes Protein mit der größten Ähnlichkeit zu RRM (69% über 223AS; Altschul *et al.*, 1997). SR45 ist ebenfalls ein Mitglied der hoch konservierten Familie der Serin/Arginin-reichen Proteine, die eine Schlüsselrolle beim prä-mRNA-*Splicing* und anderen Aspekten des RNA-Metabolismus einnehmen. SR45 interagiert im Zellkern mit dem Spliceosom und reguliert das Glukose und ABA-Signalling während pflanzlicher Entwicklungsprozesse (Tanabe *et al.*, 2009; Zhang und Mount, 2009; Carvalho *et al.*, 2010).

Die SPRY-Domäne wurde erstmals in Ryanodin-Rezeptoren von Säugern identifiziert und tritt in verschiedenen Proteinfamilien auf (Rhodes *et al.*, 2005). Es sind Funktionen von Proteinen mit SPRY-Domänen beispielsweise bei regulatorischen und Entwicklungsprozessen, Abwehr von Retroviren und beim Calcium Signalling beschrieben. SPRY Domänen scheinen für ihre Träger ein extrem vielseitiges Gerüst für Protein-Protein-Interaktionen bereitzustellen (Rhodes *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2009). Die strukturell größte Ähnlichkeit zum als XopG-Interaktor isolierten SPRY-Protein haben Ash2 (*absent small and homeotic*) – ähnliche Proteine (Altschul *et al.*, 1997). Ash2 wurde zuerst bei *Drosophila* beschrieben und ist ein Mitglied der Trithoraxgruppe, welche die Transkription von Hox-Genen regulieren (Adamson und Shearn, 1996). Proteine dieser Gruppe sind hoch konserviert

in verschiedenen Spezies (Rhodes *et al.*, 2005). Das Ash2 Homologe in Hefe spielt eine Rolle bei der Histonmethylierung (Steward *et al.*, 2006). Eine große Ähnlichkeit zu SPRY (77 % ab AS 89) weist das pflanzliche Protein TRAUCO aus *Arabidopsis thaliana* auf. Dieses Protein gehört ebenfalls zur Trithoraxgruppe und ist für die frühe Embryogenese in *Arabidopsis* essentiell (Aquea *et al.*, 2010).

4.3.6 *SPRY* spielt möglicherweise eine Rolle bei der Erkennung von XopG in Paprika **ECW**

Die Frage, ob die pflanzlichen Proteine RRM oder SPRY eine Rolle bei der Erkennung von XopG in der Pflanze spielen, wurde durch Virus-induziertes-Gen-*Silencing* der Interaktoren in XopG-responsiven Paprikapflanzen adressiert. Die Stresssituation in der sich die Paprikapflanzen während der Virus-induzierten *Silencing*-Experimente befanden, erschwerte die Auswertung der Phänotypen, da diese nicht völlig stabil waren. Jedoch war eine Reduzierung der XopG-HR nach dem *Silencing* des nicht konservierten Bereichs von SPRY1 in 80% der Fälle sichtbar, wobei nur zwischen Anwesenheit und Abwesenheit der HR unterschieden wurde (Abbildung 27). Es ist daher zu vermuten, dass SPRY eine Rolle bei der Erkennung von XopG spielen könnte. Eine Quantifizierung der HR-Reaktionen durch die Messung des Elektrolytverlustes der Zellen, einer physiologischen Reaktion, die mit der HR assoziiert ist (Baker *et al.*, 1991), wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll. Gleichzeitig ließen sich so zeitliche Unterschiede detektieren.

Zusammengenommen mit den Schlussfolgerungen, dass mehrere pflanzliche Proteine an der Erkennung beteiligt sind und XopG indirekt erkannt wird, kann man eine Hypothese aufstellen, dass SPRY ein bewachtes Virulenzziel oder Decoy-Protein ist, an das XopG bindet. Die damit einhergehende Veränderung von SPRY wird von einem Immunrezeptor erkannt und eine Abwehrkaskade wird ausgelöst. Dieses Modell wurde bereits für einige andere Effektoren und ihre Interaktionspartner beschrieben (Zipfel, 2009; Ntoukakis *et al.*, 2009; DeYoung und Innes, 2006; Liu *et al.*, 2011).

Die Tatsache, dass *Silencing* von RRM keinen Einfluss auf die XopG-HR hat, deutet darauf hin, dass es bei der Erkennung von XopG in der Pflanze keine Rolle spielt. Vielmehr könnte es sich bei RRM um ein Virulenzziel von XopG handeln, eine Hypothese, die auch durch die Lokalisierung von XopG im Nukleolus, dem Zellkompartiment in dem die meisten Proteine mit RRM-Motiven vorkommen, unterstützt wird.

4.3.7 Neue Kandidaten, die Virulenzziele von XopG darstellen könnten

In einer weiteren Hefe-2-Hybrid-Sichtung bei der die inaktive Mutante XopG_{E174A} als Köder genutzt wurde, sollten auch solche Interaktoren identifiziert werden, die unter natürlichen Bedingungen von XopG gespalten werden und somit bei der Suche mit der aktiven Form von XopG möglicherweise nicht gefunden würden. Dabei kann es sich sowohl um Interaktoren handeln, die zur Steigerung der Virulenz von *Xcv* beitragen, als auch um solche Proteine, deren Spaltung in einer Abwehrreaktion der Pflanze mündet. Bei dieser Hefe-2-Hybrid-Sichtung ist unter anderem ein interagierendes Protein mit Homologie zu JAB1 (put. JUN kinase *activation domain binding protein 1*) aus Tomate isoliert worden. JAB1/CSN5 wurde ursprünglich als Koaktivator von c-Jun identifiziert (Chamovitz und Segal, 2001). Es ist die 5. Untereinheit des COP9 (*constitutive photomorphogenic-9*)-Signalosoms (CSN) Komplexes, ein multifunktionaler Proteinkomplex, der eine Rolle bei der Signaltransduktion, Transkription und Proteinstabilität in Zellen spielt (Shackleford und Claret, 2010).

Bei EPEC konnte gezeigt werden, dass der Typ III-Effektor NleD (*non LEE encoded effector D*), eine Zink-Metalloprotease mit Homologie zu XopG, die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) spezifisch spaltet (Baruch *et al.*, 2011). c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) sind Serin/Threonin-Kinasen und gehören zur MAP Kinase-Familie. In der intakten Wirtszelle phosphoryliert JNK c-Jun, einen Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie, der unter anderem eine Rolle bei der Zellteilung und Apoptose spielt (Shackleford und Claret, 2010). Durch die Spaltung von JNK, wird die Aktivierung von c-Jun verhindert und die Signaltransduktion unterbrochen. Möglicherweise spaltet XopG mit ähnlichen folgen JAB1 oder nutzt JAB1 als Carrier, um eine Jun-Kinase zu spalten. Wenn es sich bei XopG um eine spezifische Protease handelt, die eine Erkennungssequenz benötigt, könnte das erklären warum ein allgemeiner „in-gel“ Protease-Assay keine Proteindegradation zeigte (R. Szczesny, unveröffentlichte Daten). Ein spezifischer Antikörper eines potentiellen Zielproteins wäre hier nötig, um die Spaltung analog zu JNK durch NleD zu zeigen (Baruch *et al.*, 2011). Alternativ könnte für die identifizierten möglichen Substrate eine XopG abhängige Spaltung in Hefe oder nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression in der Pflanzenzelle unter Nutzung N- und C-terminaler Epitopmarkierung und Nutzung entsprechender Antikörper getestet werden.

Weitere interessante Kandidatenproteine sind in dieser Arbeit identifiziert worden, und können interessante Einblicke in die Funktion von XopG ermöglichen. Dazu zählen unter anderem eine Thioredoxin-Peroxidase und eine Calcium/Calmodulin Protein Kinase (CCPK, Tabelle 7). Interessanterweise wurden sowohl JAB1 als auch CCPK auch als Interaktoren von

XopB identifiziert. Ein Nachweis, dass einer dieser XopG-Interaktoren eine Rolle in der Virulenz spielt, kann nicht durch den Einfluss auf die durch XopG ausgelöste HR betrachtet werden. Vielmehr wäre es z.B. sinnvoll Wachstumskurven mit der XopG-Deletionsmutante in *Silencing*-Pflanzen der entsprechenden Interaktoren durchzuführen.

4.4 Das Typ III-Effektorprotein XopB

Der Effektor XopB wurde bereits vor mehr als 10 Jahren aufgrund seiner HrpX- und HrpG-abhängigen Regulation identifiziert (Noël *et al.*, 2001). Er besitzt eine imperfekte PIP-Box im Promotorbereich, an die HrpX möglicherweise direkt bindet (Koebnik *et al.*, 2006). Durch RT-PCR-Analysen wurde die Koregulation mit dem T3SS bestätigt (M. Egler und U. Bonas, unveröffentlicht). Über die Funktion von XopB war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Bioinformatische Analysen sagen kein Signalpeptid vorher und lassen keinen Schluss über pflanzliche Zielkompartimente von XopB zu. Eine Vorhersage der 3D-Struktur von XopB ergab mit 85%iger Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von *ARM-Repeats* (Web-Service P). Auf Aminosäureebene sind *ARM-Repeats* zwischen verschiedenen Proteinen wenig konserviert, sie besitzen jedoch ein hohes Maß an struktureller Konservierung. Ein *ARM-Repeat* ist ungefähr 42 Aminosäuren lang und besteht aus 3 α -Helices (Samuel *et al.*, 2006). Mehrere aneinandergereihte *ARM-Repeats* falten in einer superhelikalen Struktur und bilden dabei eine Oberfläche mit einer hydrophoben Furche, an die verschiedene Proteine binden können. Obwohl *ARM-Repeat* Domänen Protein-Interaktionen vermitteln, scheinen keine gemeinsamen Merkmale von Interaktionspartnern zu existieren (Samuel *et al.*, 2006). Proteine mit *ARM-Repeats* sind in der Pflanze in vielfältige Prozesse eingebunden: So spielen sie beispielsweise eine Rolle bei der Signaltransduktion, Regulation des Zytoskeletts, Kernimport, Regulierung der Transkription, Ubiquitinierung sowie bei Vesikeltransport und Anheftung an Membranen (Samuel *et al.*, 2006; Striegl *et al.*, 2010).

4.4.1 XopB – ein genereller Zelltodsuppressor

Das Interesse an XopB wurde während dieser Arbeit, durch die Fähigkeit die durch XopG ausgelöste Zelltodreaktion zu unterdrücken, geweckt. So ist XopB in der Lage, wenn es transient mittels *Agrobacterium* in Paprika ECW oder *N. tabacum* mit XopG koexprimiert wird, die sonst durch XopG ausgelöste HR zu unterdrücken (Abbildung 20). Durch Koexpression mit unterschiedlichen Effektorproteinen auf verschiedenen Pflanzen konnte

weiterhin gezeigt werden, dass XopB Pflanzenspezies-übergreifend agieren kann und eine Reihe unterschiedlicher langsamer oder schnellerer Zelltodreaktionen supprimiert. So werden Zelltodreaktionen der Effektoren XopJ, AvrRxv, AvrBs3, XopG und AvrBsT unterdrückt. Das dies auf eine veränderte Proteinmenge der HR-Elicitoren zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich, da für AvrRxv exemplarisch gezeigt wurde, dass ähnliche Proteinmengen vorliegen (Abbildung 30). Als Nächstes sollte jedoch auch für die weiteren Proteine eine Analyse der jeweiligen Proteinmenge durchgeführt werden.

Während XopB im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert, werden die genannten Effektoren wahrscheinlich in verschiedenen Zellkompartimenten erkannt, so lokalisiert XopJ an der pflanzlichen Membran und möglicherweise teilweise in Vesikeln (Thieme *et al.*, 2007; Bartetzko *et al.*, 2009), AvrRxv zytoplastidär (Bonshtien *et al.*, 2005), XopG und AvrBs3 im Zellkern und AvrBsT im Zellkern und Zytoplasma (Kapitel 3.3.4; Szurek *et al.*, 2002; Szczesny *et al.*, 2010). Eine Funktion von XopB bei der T3E-Erkennung ist daher unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse legen nahe, dass XopB in einen gemeinsamen Mechanismus im Signalweg zur Apoptose eingreift.

Bei Bestimmungen des Hormongehaltes von *N. benthamiana*-Blättern konnte festgestellt werden, dass XopB den durch die Inokulation mit *Agrobacterium* oder *Agrobacterium* (35S-*xopJ*) angestiegenen SA- und ACC-Gehalt drastisch reduziert (Kapitel 3.4.5). Die Gehalte an JA und IAA blieben unbeeinflusst. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass XopB SA- und Ethylen-abhängige Abwehrreaktionen unterdrückt. SA wird in Pflanzen bei der Antwort auf diverse Pathogene synthetisiert und ist essentiell für die Ausbildung von sowohl lokaler als auch systemischer Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*). Mutationen, die entweder zu reduzierter SA-Produktion oder beeinträchtigter SA-Perzeption führen, verstärken die Suszeptibilität gegenüber virulenten und avirulenten Pathogenen (Loake und Grant, 2007). Der durch XopB reduzierte SA-Gehalt der Zellen, könnte demnach auch zu einer verstärkten Virulenz des Pathogens führen. Außerdem ist bekannt, dass die künstliche Gabe von SA die Akkumulation von *pathogenesis-related* (PR) Proteinen in der Pflanze induziert (Loake und Grant, 2007). Ein nächster Schritt in der Untersuchung der CDS-Aktivität von XopB könnte daher sein, den Einfluss von XopB auf die Expression von bekannten PR-Genen zu untersuchen (van Loon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Dies könnte durch RT-PCR-Studien nach der Inokulation einer *Xcv hrp*-Mutante, bspw. *Xcv* 85-10 Δ *hrpN* oder eines PTI-Elicitors geschehen, z.B. *flg22* oder *elf18*.

Darüber hinaus gibt es weitere Möglichkeiten, um die Virulenzfunktion von XopB zu charakterisieren und zu adressieren, ob XopB mit der basalen Abwehr (PTI) interferiert: Die

durch PAMPs hervorgerufene Callose-Deposition stellt ein Werkzeug dar, das schon seit längerem zur Beschreibung von PTI herangezogen wird (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Hauck *et al.*, 2003). So könnte der Einfluss von XopB auf die durch einen Elicitor, beispielsweise flg22 oder LPS, verursachte Callose-Deposition analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Untersuchung des Einflusses von XopB auf die Strömung in den Leitgefäßen nach der Applikation eines Elicitors dar. Während der PTI ist der vaskuläre Fluss in *N. benthamiana* reduziert, ein Effekt der durch einige *Pseudomonas*-Effektoren rückgängig gemacht werden kann (Oh und Collmer, 2005). Darüber hinaus wäre es sehr interessant, die Effekte von XopB auf die Expression in die PTI involvierter Gene untersuchen, beispielsweise durch Reporterfusionen bekannter induzierter Promotoren. Ein solches System ist bereits für *N. benthamiana* Protoplasten etabliert worden (Nguyen *et al.*, 2010). Schließlich könnte man den potentiellen Einfluss von XopB auf MAPK-Kinasen durch Untersuchung von Kinase-Phosphorylierungsmustern adressieren. Eine Kombination verschiedener Methoden sollte genutzt werden, um ein differenziertes Bild der Effektorfunktion zu erhalten (Jamir *et al.*, 2004). Eine umfassende Aufstellung möglicher Methoden zur Untersuchung der PTI ist 2010 veröffentlicht worden (Nguyen *et al.*, 2010).

4.4.2 *XopB* ist im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Vesikeln lokalisiert und löst eine Zelltodreaktion in *N. benthamiana* aus

Wie bereits vielfach beschrieben, findet zwischen Pflanzen und Pflanzenpathogenen ein Prozess statt, den man als Wettrüsten bezeichnen kann. Pathogene, die die basale Abwehr der Pflanze unterdrücken, werden ihrerseits durch Immunrezeptoren erkannt (Jones und Dangl, 2006; Block und Alfano, 2011). Auch XopB löst nach 5-6 Tagen eine Abwehrreaktion in *N. benthamiana* aus (Kapitel 3.4.3). Ein ähnlicher Effekt von XopB ist bereits in *S. cerevisiae* beschrieben worden (Salomon *et al.*, 2011).

Bereits 18 Stunden nach Expression von XopB mittels *Agrobacterium*, ist das Protein im Endoplasmatischen Retikulum und in Golgivesikeln detektierbar (Abbildung 32; Nelson *et al.*, 2007). Diese Lokalisierung könnte ein Ansatzpunkt für die Virulenzfunktion von XopB sein. So könnte XopB die ko- oder posttranslationale Modifikation, z.B. die Glykosylierung, von sekretierten Proteinen beeinflussen (siehe 4.4.5) oder generell die Sekretion von pflanzlichen Proteinen hemmen, wie das bereits für den *Xanthomonas*-Effektor XopJ beschrieben worden ist (Bartetzko *et al.*, 2009).

4.4.3 XopB Homologe in anderen Phytopathogenen haben möglicherweise ähnliche Funktionen

Durch die voranschreitende Sequenzierung von *Xanthomonas*-Genomen konnten neue zu XopB homologe Proteine identifiziert werden. So gibt es 2 putative Typ III-Effektorproteine in *X. fuscans* spp. *aurantifolii* und *X. gardneri* ATCC 19865 die über die gesamte Länge eine Aminosäure-Identität zu XopB von jeweils 90% und 87% aufweisen. Bei zwei weiteren homologen Proteinen aus *X. campestris* pv. *musacearum* und *X. campestris* pv. *vasculorum* scheinen die N-terminalen 98 Aminosäuren zu fehlen, der Rest des Proteins ist jedoch hoch homolog (92% und 90% identisch auf Aminosäureebene). Ob in diesem N-terminalen Bereich eine für die Funktion wichtige Domäne lokalisiert ist, ist nicht bekannt, jedoch befinden sich die α -helikalen ARM-*Repeats* im C-terminalen, konservierten Bereich.

Bereits länger bekannt und teilweise charakterisiert, sind die homologen Effektoren HopD1 (früher AvrPphD), die in verschiedenen Pseudomonaden und in *Pantoea* zu finden sind (Arnold *et al.*, 2001). So reduziert HopD1_{Pag} aus *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophylae* (*Pag*) (früher *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*) die Größe der durch das Pathogen hervorgerufenen Gallen an *Gypsophila paniculata* drastisch um 85 % (Guo *et al.*, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht bekannt. HopD1_{Pag} ist zu 75 % identisch und 85 % ähnlich zu XopB, daher ist es wahrscheinlich, dass beide Proteine eine ähnliche 3D-Struktur aufweisen. Es lag daher nahe zu überprüfen, ob die beiden Proteine ähnliche Funktionen ausüben. Es stellte sich heraus, dass beide Effektoren eine überlappende Aktivität haben. So kann HopD1_{Pag} die XopJ-HR unterdrücken, nicht aber die HR-Reaktionen von XopG, AvrRxv oder AvrBsT und die in *N. benthamiana* ausgelöste Zelltodreaktion in im Vergleich zu XopB verzögert (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3).

Eine HopD1_{Pag}-Mutante, die an zwei Positionen Punktmutationen trägt, kann keinen Zelltod mehr supprimieren und löst ebenfalls keine HR mehr aus. Die ER-Lokalisierung dieser Mutante ist jedoch unverändert (Kapitel 3.4.4). Eine falsche Lokalisierung kann somit als Grund für den Verlust der Funktion von HopD1_{Pag} ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass sowohl die Zelltodsuppressor-Aktivität als auch das Hervorrufen von Zelltod in der Mutante verhindert wird, lässt vermuten dass Virulenzaktivität und Avirulenzaktivität funktionell miteinander verknüpft sind. Als nächster Schritt wäre es nun sinnvoll die Punktmutationen einzeln auf XopB zu übertragen, um weitere Untersuchungen der XopB-Aktivität durchführen zu können.

4.4.4 Ein Transmembranprotein und ein hypothetisches Protein beeinflussen die Erkennung von XopB in *N. benthamiana*

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zum besseren Verständnis der Pathogen-Wirts-Beziehung ist die Identifizierung von pflanzlichen Interaktoren der T3Es. Durch Hefe-2-Hybrid-Sicherungen sind neun potentielle Interaktionspartner von XopB isoliert worden. Um herauszufinden, ob die Bindung der pflanzlichen Proteine an XopB eine biologische Relevanz besitzt, wurden die Transkriptmengen der Gene von 5 der XopB-Beuteproteine durch Virus-induziertes-Gen-*Silencing* (VIGS) in *N. benthamiana* reduziert. Untersucht wurde der Einfluss der Abwesenheit jedes einzelnen Interaktors sowohl auf die Suppression der AvrRxv-HR durch XopB, als auch auf die XopB-HR. Somit könnten sowohl Virulenzziele von XopB identifiziert werden, als auch solche Proteine, die bei der Erkennung von XopB eine Rolle spielen (Block und Alfano, 2011). Bei der Analyse der Kandidaten aus der ersten Hefe-2-Hybrid-Sichtung zeigte sich, dass der Interaktor 23, ein putatives Typ 1 Transmembranprotein (PMP1), und der Interaktors 30, der keine Homologie zu einem bekannten Protein besitzt, die XopB-HR beeinflussen.

PMP1 besitzt ein Signalpeptid und eine Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich (InterPro Scan). Für homologe Proteine sind sowohl die Funktion als auch die biologischen Prozesse, in die sie involviert sind, unbekannt. Ein homologes PMP1 aus *Arabidopsis* (NCBI reference sequence: NP_189058.1) ist sowohl im ER als auch in der Plasma- und Vakuolenmembran zu finden (Dunkley *et al.*, 2006; Mitra *et al.*, 2007; Jaquinod *et al.*, 2007). Interaktor 30 kodiert für ein hypothetisches Protein mit Homologen in *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* und *Glycine max*.

Eine Analyse der CDS-Aktivität von XopB stellte sich auf den *Silencing*-Pflanzen als schwierig heraus. So war beispielsweise auf den Pflanzen nach Virus-induziertem Gen-*Silencing* mit dem leeren Kontrollplasmid nur bei 7 von 10 Inokulationen die Suppression der AvrRxv-HR beobachtbar. Generell waren nur sehr stabile Phänotypen auf *Silencing*-Pflanzen zuverlässig reproduzierbar (Kapitel 3.3.16. und 4.2.3.). Der Grund hierfür lag vermutlich darin, dass die Pflanzen durch die Virus-Infektion bereits Stress ausgesetzt sind. Um hier die Interaktoren weiter hinsichtlich ihrer Rolle bei der Zelltodunterdrückung untersuchen zu können, ist es nötig andere Methoden als *Silencing*, beispielsweise *knock out-Arabidopsis*-Linien zu nutzen. Um das System *Arabidopsis* nutzen zu können, müsste man zuerst untersuchen, ob homologe Proteine in *Arabidopsis* existieren. Wenn dies der Fall ist, könnte man in einem zweiten Schritt einen ZelltodsSuppressionsphänotyp mit XopB auf *Arabidopsis* etablieren. Denkbar wäre ein *Pseudomonas*-Effektor, der in einem bestimmten *Arabidopsis*-

Kultivar erkannt wird. Gibt es einen reproduzierbaren Phänotyp, könnte man in *Arabidopsis*-Knockoutlinien den Effekt auf die Zelltodunterdrückung untersuchen.

Ein anderer denkbarer Ansatz wäre die Expression von XopB mittels *Xanthomonas*. Hier scheinen Phänotypen auf *Silencing*-Pflanzen nach Erfahrungen in unserem Labor gut reproduzierbar zu sein. Nach Abschluss meiner Arbeit stellte sich heraus, dass die Deletionsmutante *Xcv* 85-10 Δ *xopB* reduzierte Krankheitssymptome im Vergleich zum WT-Stamm auslöst. Dieser interessante Phänotyp, der im Widerspruch zu einer früheren Veröffentlichung steht (Noël *et al.*, 2001), eröffnet vielfältige Möglichkeiten der Analyse der Virulenzfunktion von XopB. Beispielsweise könnten die Gene der XopB-Interaktoren in Paprika ECW stillgelegt werden und der Einfluss auf die gesteigerte Virulenz durch XopB könnte durch vergleichende Inokulation von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopB* adressiert werden.

4.4.5 Die Identifizierung neuer Interaktoren von XopB ermöglicht spannende Perspektiven für die Untersuchung des Mechanismus der HR-Suppression

Weitere Kandidaten, die Aufschluss über die Funktion von XopB und so Ansätze für weitere Experimente liefern können, wurden identifiziert: beispielsweise TPX2 (*targeting protein for Xklp2*), welches mehrfach als interagierendes Protein isoliert wurde und Ribophorin II. Durch die Bindung an Importin α/β wird TPX2 in den pflanzlichen Zellkern transportiert. TPX2 kolokalisiert mit Mikrotubuli und nimmt dabei eine Schlüsselposition bei der Koordination des Aufbaus des Spindelapparates ein (Meier und Brkljacic, 2009). Anders als bei Vertebraten wird TPX2 bei Pflanzen vor dem Zusammenbrechen der Kernhülle wieder in das Zytoplasma transportiert (Vos *et al.*, 2008). Diese Funktion von TPX2 bei der Mitose scheint keine Verbindung zur CDS-Aktivität von XopB zu haben. Es ist möglich, dass es sich um einen falsch positiven Interaktor handelt. Die Bindung von TPX2 an Mikrotubuli lässt aber auch andere Spekulationen zu: So spielen Mikrotubuli z.B. auch eine Rolle bei dem Geleiten von Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat und zur Zellmembran (Palmer *et al.*, 2005; Hehnlly und Stamnes, 2007).

Ribophorin II ist als Bestandteil des Proteinkomplexes Oligosaccharyltransferase (OST) für die N-Glykosylierung neu entstehender Proteine im ER verantwortlich. Die Interaktion könnte ein Weg sein, wie XopB möglicherweise eine durch MAMP ausgelöste pflanzliche Abwehr unterdrücken könnte. Es konnte in den letzten Jahren von 2 Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Erkennung von MAMPs durch PRRs abhängig von der korrekten Glykosylierung im ER ist (Nekrasov *et al.*, 2009; Häweker *et al.*, 2010). Die *loss-of-function*

Mutation eines Gens, das für einen weiteren Bestandteil der OST, STT3A, kodiert, führt zum Verlust der Erkennung von elf18 durch EFR, somit wird keine Abwehrreaktion ausgelöst (Nekrasov *et al.*, 2009). *FLS2* toleriert leichte Unterglykosylierung der *stt3a*-Mutante, die Abwehrreaktion blieb aber aus wenn die Glykosylierung durch Tunicamycin-Behandlung stark reduziert war (Häweker *et al.*, 2010). Die Zuckerreste befinden sich an den Asparaginresten des extrazellulären Teils der Rezeptoren und stellen vermutlich wichtige, erste Kontaktstellen dar (Häweker *et al.*, 2010). Das Fehlen aller Glykosylreste führt zum Verbleib der Proteine im ER. Beim Fehlen eines Glykosylrestes kann zwar noch eine korrekte Membranlokalisierung stattfinden, das Auslösen der PTI wird dennoch verhindert (EFR) oder stark reduziert (*FLS2*, Häweker *et al.*, 2010).

Ein weiterer potentieller XopB Interaktor ist ein 14-3-3 Protein. 14-3-3 Proteine nehmen wichtige Schlüsselpositionen bei vielen physiologischen Prozessen ein, die durch Phosphorylierung reguliert werden. Sie stehen dabei häufig am Ende eines Signaltransduktionsprozesses und binden mit ihrer konservierten Struktur ein phosphoryliertes Zielprotein, wodurch die Struktur verändert und die Aktivität reguliert wird (DeLille *et al.*, 2001). 14-3-3 Proteine sind auch als wichtige Spieler in der pflanzlichen Abwehr bekannt (Roberts und Bowles, 1999; Konagaya *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2010). Auch als Zielproteine von bakteriellen Effektorproteinen sind 14-3-3 Proteine bereits isoliert worden. So interagieren beispielsweise AvrRxv und XopN, zwei *Xanthomonas*-Effektoren mit verschiedenen 14-3-3-Proteinen (Whalen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Mutationsanalysen in AvrRxv legen nahe, dass die Bindung an das 14-3-3 Protein notwendig für die Funktion von AvrRxv in der Pflanze ist (Whalen *et al.*, 2008). Eine seit längerem bekannte Funktion von 14-3-3 Proteinen ist die Bindung an Protonenpumpen und dadurch die Regulation des Turgors der Pflanzenzelle (DeLille *et al.*, 2001). Das pilzliche Toxin Fusicoccin stabilisiert die Interaktion zwischen dem C-Terminus der H⁺-ATPase an der pflanzlichen Plasmamembran und 14-3-3 Proteinen. Dies führt zu einer dauerhaften Aktivierung der Protonenpumpe und dadurch zu einer irreversiblen Öffnung der Stomata, was zum Welken der Pflanze führt (Würtele *et al.*, 2003). Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass XopB als Enzym wirkt. Ein mögliches Szenario ist daher, wie bereits für XopN diskutiert (Kim *et al.*, 2009), dass es als Plattform wirkt und bestimmte Proteine in räumliche Nähe zueinander bringt.

Die momentane Herausforderung auf dem Weg zum Verständnis der Pathogen-Wirts-Beziehung, ist die Identifizierung der molekularen Funktion der T3Es. Sie ist für die meisten

Effektoren in *Xcv* bisher unbekannt. Hierzu kann die Identifizierung von biologisch relevanten pflanzlichen Interaktoren der T3Es einen wichtigen Beitrag leisten. Die vorliegende Arbeit gibt erste Einblicke in die mögliche Funktion der Effektoren XopG, XopH und XopB.

In manchen Fällen, wie z.B. XopI, erweist es als schwer, mit einem einzelnen Effektorprotein korrelierende Phänotypen zu identifizieren. Hier können z.B. multiple Deletionsmutanten helfen Effekte nachzuweisen. Außerdem würde ein Effekt der T3Es im biologischen System *Xcv* die biologische Relevanz der T3Es zu untermauern. Eine weitere Möglichkeit um Anhaltspunkte über die Funktion unbekannter Effektoren, wie z.B. für XopI oder die in dieser Arbeit neu beschriebenen Effektoren XopK, XopR oder XopS, zu erhalten, kann es darüber hinaus sein, transgene Pflanzen zu erstellen, die den zu untersuchenden T3E überexprimieren (Wilton und Desveaux, 2010). So wurde z.B. bei AvrRpt2-transgenen Pflanzen ein Phänotyp festgestellt, der dem von Pflanzen mit veränderter Auxin-Physiologie entsprach. Dies führte schließlich auf die Spur, dass AvrRpt2 die Virulenz von *P. syringae* steigert, indem es die Auxin-Physiologie verändert, in diesem Fall die Akkumulierung von freiem IAA verursacht (Chen *et al.*, 2007). Diese Analysen in Kombination mit den Erkenntnissen durch die Identifizierung von pflanzlichen T3E-Zielproteinen, werden zu einem tieferen Verständnis der Interaktion zwischen Pathogen und pflanzlichem Wirt beitragen.

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. und Martin, G.B.,** (2006a). 'Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (8):601-611.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E. und Martin, G.B.,** (2006b). 'Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (8):2851-2856.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.-J., Chen, S., Dickman, M.B. und Martin, G.B.,** (2003). 'Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death'. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 22 (1):60-69.
- Adamson, A.L. und Shearn, A.,** (1996). 'Molecular genetic analysis of *Drosophila* ash2, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation'. *Genetics*, 144 (2):621-633.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.,** (1997). 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs'. *Nucleic Acids Research*, 25 (17):3389-3402.
- Anand, A., Krichevsky, A., Schornack, S., Lahaye, T., Tzfira, T., Tang, Y., Citovsky, V. und Mysore, K.S.,** (2007). 'Arabidopsis VirE2 interacting protein 2 is required for *Agrobacterium* t-DNA integration in plants'. *The Plant Cell Online*, 19 (5):1695-1708.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C. und Genin, S.,** (2006). '*Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (39):14620-14625.
- Apel, K. und Hirt, H.,** (2004). 'Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction'. *Annual Review of Plant Biology*, 55 (1):373-399.
- Aquea, F., Johnston, A.J., Cañon, P., Grossniklaus, U. und Arce-Johnson, P.,** (2010). 'TRAUCO, a Trithorax-group gene homologue, is required for early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*'. *Journal of Experimental Botany*, 61 (4):1215-1224.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C. und Boucher, C.A.,** (1994). 'PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*'. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 13 (3):543-553.
- Arnold, D.L., Gibbon, M.J., Jackson, R.W., Wood, J.R., Brown, J., Mansfield, J.W., Taylor, J.D. und Vivian, A.,** (2001). 'Molecular characterization of *avrPphD*, a widely-distributed gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* involved in non-host recognition by pea (*Pisum sativum*)'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58:55-62.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H.-W., Horn, M. und Rattei, T.,** (2009). 'Sequence-based prediction of type III secreted proteins'. *PLoS Pathog*, 5 (4):e1000376.
- Aslam, S.N., Newman, M.-A., Erbs, G., Morrissey, K.L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T.T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Knight, M.R. und Cooper, R.M.,** (2008). 'Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation'. *Current Biology*, 18 (14):1078-1083.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U. und 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'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (9):911-921.

- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Vallejos, C.E., Davis, M.J. und Jones, J.B.**, (2000b). 'Xv4-avrXv4: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (12):1346-1355.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K., (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York.
- Bahar, O., Goffer, T. und Burdman, S.**, (2009). 'Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (8):909-920.
- Baker, C.J., Oneill, N.R., Keppler, L.D. und Orlandi, E.W.**, (1991). 'Early Responses During Plant-Bacteria Interactions in Tobacco Cell-Suspensions'. *Phytopathology*, 81 (12):1504-1507.
- Ballvora, A., Pierre, M., Van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T. und Bonas, U.**, (2001). 'Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus, governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (5):629-638.
- Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U.Z. und 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'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (6):655-664.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J. und Parker, J.E.**, (2006). 'Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the nudix hydrolase NUDT7'. *The Plant Cell*, 18 (4):1038-1051.
- Baruch, K., Gur-Arie, L., Nadler, C., Koby, S., Yerushalmi, G., Ben-Neriah, Y., Yogeve, O., Shaulian, E., Guttman, C., Zarivach, R. und Rosenshine, I.**, (2011). 'Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-[kappa]B'. *EMBO J*, 30 (1):221-231.
- Bashan, Y., Azaizeh, M., Diab, S., Yunis, H. und Okon, Y.**, (1985). 'Crop loss of pepper plants artificially infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in relation to symptom expression'. *Crop Protection*, 4 (1):77-84.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. und Baulcombe, D.C.**, (1999). 'The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses'. *Plant Cell*, 11 (5):781-791.
- Berger, C., Krüger, A., Weber, E. und Koebnik, R.**, (2006). 'Das Typ III-Sekretionssystem von *Xanthomonas*'. *Biospektrum*, 12 (6):592-594.
- Bertani, G.**, (1951). 'Studies on lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*'. *Journal of Bacteriology*, 62 (3):293-300.
- Block, A. und Alfano, J.R.**, (2011). 'Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys?' *Current Opinion in Microbiology*, 14 (1):39-46.
- Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J. und Lamond, A.I.**, (2007). 'The multifunctional nucleolus'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (7):574-586.
- Boller, T. und Felix, G.**, (2009). 'A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors'. *Annual Review of Plant Biology*, 60 (1):379-406.
- Boller, T. und He, S.Y.**, (2009). 'Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens'. *Science*, 324 (5928):742-744.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J. und Balbo, I.**, (1993). 'Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*'. *Molecular & General Genetics*, 238 (1-2):261-269.

- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V., Staskawicz, B.J. und 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'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (1):81-88.
- Bonas, U., Stall, R.E. und Staskawicz, B.,** (1989). 'Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. *Molecular & General Genetics*, 218 (1):127-136.
- Bonshtien, A., Lev, A., Gibly, A., Debbie, P., Avni, A. und Sessa, G.,** (2005). 'Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (4):300-310.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H. und Sheen, J.,** (2010). 'Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases'. *Nature*, 464 (7287):418-422.
- Boyer, H.W. und Roulland-Dussoix, D.,** (1969). 'A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*'. *Journal of Molecular Biology*, 41 (3):459-472.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. und Lamb, C.J.,** (1992). 'Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response'. *Cell*, 70 (1):21-30.
- Bretz, J.R., Mock, N.M., Charity, J.C., Zeyad, S., Baker, C.J. und Hutcheson, S.W.,** (2003). 'A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection'. *Molecular Microbiology*, 49 (2):389-400.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. und Collmer, A.,** (2003). 'The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (18):10181-10186.
- Büttner, D. und Bonas, U.,** (2002a). 'Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell'. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 21 (20):5313-5322.
- Büttner, D. und Bonas, U.,** (2002b). 'Port of entry – the type III secretion translocon'. *Trends in Microbiology*, 10 (4):186-192.
- Büttner, D. und Bonas, U.,** (2010). 'Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors'. *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (2):107-133.
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L.D. und Bonas, U.,** (2004). 'HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion'. *Molecular Microbiology*, 54 (3):755-768.
- Büttner, D. und He, S.Y.,** (2009). 'Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria'. *Plant Physiology*, 150 (4):1656-1664.
- Büttner, D., Noël, L., Thieme, F. und Bonas, U.,** (2003). 'Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes'. *Journal of Biotechnology*, 106 (2-3):203-214.

- Canteros, B.I.**, (1990). 'Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.' *University of Florida*.
- Carvalho, R.F., Carvalho, S.D. und Duque, P.**, (2010). 'The plant-specific SR45 protein negatively regulates glucose and ABA signaling during early seedling development in *Arabidopsis*'. *Plant Physiology*, 154 (2):772-783.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E.T. und Staskawicz, B.J.**, (2002). 'Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (12):8336-8341.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D. und Staskawicz, B.J.**, (2001). 'Biochemical Evidence for Bacterial Type III Effector Protein Translocation into Plant Cells'.
- Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J.G. und Staskawicz, B.J.**, (2010). 'The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (1):49-57.
- Chamovitz, D.A. und Segal, D.**, (2001). 'JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome'. *EMBO Reports*, 2 (2):96-101.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombor, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. und Dangl, J.L.**, (2005). 'A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (7):2549-2554.
- Chen, J.-G., Ullah, H., Temple, B., Liang, J., Guo, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Jones, A.M.**, (2006). 'RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*'. *Journal of Experimental Botany*, 57 (11):2697-2708.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J. und Kunkel, B.N.**, (2007). '*Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (50):20131-20136.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S. und Kemmerling, B.**, (2009). 'One for all: The receptor-associated kinase BAK1'. *Trends in Plant Science*, 14 (10):535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. und Boller, T.**, (2007). 'A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence'. *Nature*, 448 (7152):497-500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. und Staskawicz, B.J.**, (2006). 'Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response'. *Cell*, 124 (4):803-814.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.C., Chung, E.J., Oh, S.K., Lee, S., Park, J.M., Joung, Y.H. und Choi, D.**, (2004). 'A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang)'. *Molecules and cells*, 17 (2):377-380.
- Ciesiolka, L.D., Hwin, T., Gearlds, J.D., Minsavage, G.V., Saenz, R., Bravo, M., Handley, V., Conover, S.M., Zhang, H., Caporgno, J., Phengrasamy, N.B., Toms, A.O., Stall, R.E. und Whalen, M.C.**, (1999). 'Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (1):35-44.
- Cornelis, G.R.**, (2006). 'The type III secretion injectisome'. *Nature Reviews Microbiology*, 4 (11):811-825.
- Craig, K.L. und Tyers, M.**, (1999). 'The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction'. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72 (3):299-328.
- da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Sluys, M.A.V., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J.,**

- Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A.D., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C. und Kitajima, J.P., (2002). 'Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities'. *Nature*, 417 (6887):459-463.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.G., (2001). 'Plant pathogens and integrated defence responses to infection'. *Nature*, 411 (6839):826-833.
- Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyk, M.K., Byrde, R.J.W. und Fielding, A.H., (1984). 'Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1'. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 3 (13):3323-3328.
- de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammoun, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M. und Boch, J., (2006). '*Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*'. *Plant Journal*, 47 (3):368-382.
- Dean, P., Scott, J.A., Knox, A.A., Quitard, S., Watkins, N.J. und Kenny, B., (2010). 'The enteropathogenic *E. coli* effector EspF targets and disrupts the nucleolus by a process regulated by mitochondrial dysfunction'. *PLoS Pathog*, 6 (6):e1000961.
- del Pozo, O., Pedley, K.F. und Martin, G.B., (2004). 'MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease'. *EMBO Journal*, 23 (15):3072-3082.
- DeLille, J.M., Sehnke, P.C. und Ferl, R.J., (2001). 'The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators'. *Plant Physiology*, 126 (1):35-38.
- Denny, T.P., (1995). 'Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis'. *Annual Review of Phytopathology*, 33 (1):173-197.
- DeYoung, B.J. und Innes, R.W., (2006). 'Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense'. *Nature Immunology*, 7:1243-1249.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I., Ayliffe, M.A., Kobe, B. und Ellis, J.G., (2006). 'Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (23):8888-8893.
- Dougherty, D.E., (1978). 'Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays'. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 91:291-293.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N. und Poovaiah, B.W., (2009). 'Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity'. *Nature*, 457 (7233):1154-1158.
- Dunkley, T.P.J., Hester, S., Shadforth, I.P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S.L., Griffin, J.L., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R.B., Dupree, P. und Lilley, K.S., (2006). 'Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (17):6518-6523.
- Emmott, E. und Hiscox, J.A., (2009). 'Nucleolar targeting: the hub of the matter'. *EMBO Reports*, 10 (3):231-238.

- Engelhardt, S., Lee, J., Gäbler, Y., Kemmerling, B., Haapalainen, M.L., Li, C.M., Wei, Z., Keller, H., Joosten, M., Taira, S. und Nürnberger, T., (2008). 'Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity'. *The Plant Journal*, 55 (4):706-717.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.-A. und Cooper, R.M., (2008). 'Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: Structure and activity'. *Chemistry & biology*, 15 (5):438-448.
- Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C. und Baker, B., (1999). 'The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco'. *Plant Journal*, 18 (1):67-75.
- Escobar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. und Bonas, U., (2001). 'Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT'. *Molecular Plant Pathology*, 2 (5):287-296.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q. und Alfano, J.R., (2003). 'The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants'. *Molecular Microbiology*, 49 (2):377-387.
- Felix, G. und Boller, T., (2003). 'Molecular sensing of bacteria in plants—the highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco'. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (8):6201-6208.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., Wehling, M.D., Alfano, J.R., Moreno-Hagelsieb, G., Lamboy, W.F., DeClerck, G., Schneider, D.J. und Cartinhour, S.W., (2006). 'Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, allows *de novo* reconstruction of the Hrp *cis* element, and identifies novel coregulated genes'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (11):1167-1179.
- Figurski, D.H. und Helinski, D.R., (1979). 'Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (4):1648-1652.
- Flor, H.H., (1955). 'Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications'. *Phytopathology*, 45:680-685.
- Flor, H.H., (1971). 'Current status of the gene-for-gene concept'. *Annual Review of Phytopathology*, 9:275-296.
- Francis, M., Wolf-Watz, H. und Forsberg, (2002). 'Regulation of type III secretion systems'. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (2):166-172.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.-r., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D. und Alfano, J.R., (2007). 'A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity'. *Nature*, 447 (7142):284-288.
- Furutani, A., Nakayama, T., Ochiai, H., Kaku, H., Kubo, Y. und Tsuge, S., (2006). 'Identification of novel HrpXo regulons preceded by two *cis*-acting elements, a plant-inducible promoter box and a -10 box-like sequence, from the genome database of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'. *FEMS Microbiology Letters*, 259 (1):133-141.
- Galon, Y., Nave, R., Boyce, J.M., Nachmias, D., Knight, M.R. und Fromm, H., (2008). 'Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*'. *FEBS letters*, 582 (6):943-948.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. und Rathjen, J.P., (2009). 'AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants'. *Current Biology*, 19 (5):423-429.
- Glazebrook, J., (2005). 'Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens'. *Annual Review of Phytopathology*, 43 (1):205-227.

- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W. und Robatzek, S.,** (2008). 'Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB'. *Current Biology*, 18 (23):1824-1832.
- Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K. und Spann, T.P.,** (2002). 'Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture'. *Genes & Development*, 16 (5):533-547.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. und Boller, T.,** (1999). 'A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*'. *Plant Journal*, 18 (3):277-284.
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S. und Vojnov, A.A.,** (2009). 'Stomata and pathogens: Warfare at the gates'. *Plant signaling & behavior*, 4 (12):1114-1116.
- Gürlebeck, D.,** (2007). 'Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. Thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg (WWW Dokument):URL: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H066/index.htm>.
- Gürlebeck, D., Jahn, S., Gürlebeck, N., Szczesny, R., Szurek, B., Hahn, S., Hause, G. und Bonas, U.,** (2009). 'Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4'. *Molecular Plant Pathology*, 10 (2):175 - 188.
- Guo, J. und Chen, J.-G.,** (2008). 'RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*'. *BMC Plant Biology*, 8 (1):108.
- Guo, M., Manulis, S., Mor, H. und Barash, I.,** (2002). 'The presence of diverse IS elements and an avrPphD homologue that acts as a virulence factor on the pathogenicity plasmid of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (7):709-716.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y. und Alfano, J.R.,** (2009). 'The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (9):1069-1080.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. und Greenberg, J.T.,** (2002). 'A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*'. *Science*, 295 (5560):1722-1726.
- Hacker, J. und Kaper, J.B.,** (2000). 'Pathogenicity islands and the evolution of microbes'. *Annual Review of Microbiology*, 54:641-679.
- Hallé, M., Tremblay, M.L. und Meng, T.-C.,** (2007). 'Protein tyrosine phosphatases: Emerging regulators of apoptosis'. *Cell Cycle*, 6 (22):2773-2781.
- Hauck, P., Thilmony, R. und He, S.Y.,** (2003). 'A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (14):8577-8582.
- Häweker, H., Rips, S., Koiwa, H., Salomon, S., Saijo, Y., Chinchilla, D., Robatzek, S. und von Schaewen, A.,** (2010). 'Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity'. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (7):4629-4636.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. und Sheen, J.,** (2006). 'Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity'. *Cell*, 125 (3):563-575.
- He, P., Shan, L. und Sheen, J.,** (2007). 'Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions'. *Cellular Microbiology*, 9 (6):1385-1396.

- He, S.Y., Huang, H.-C. und Collmer, A.,** (1993). '*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants'. *Cell*, 73 (7):1255-1266.
- He, S.Y., Nomura, K. und Whittam, T.S.,** (2004). 'Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens'. *BBA-Molecular Cell Research*, 1694 (1-3):181-206.
- Heesemann, J., Algermissen, B. und Laufs, R.,** (1984). 'Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*'. *Infection and Immunity*, 46 (1):105-110.
- Hehnly, H. und Stamnes, M.,** (2007). 'Regulating cytoskeleton-based vesicle motility'. *FEBS letters*, 581 (11):2112-2118.
- Hermund, D.,** (2006). 'F-box proteins: more than baits for the SCF?' *Cell Division*, 1:30.
- Ho, M., Ou, C., Chan, Y.r., Chien, C.T. und Pi, H.,** (2008). 'The utility F-box for protein destruction'. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (13):1977-2000.
- Horke, S., Reumann, K., Schweizer, M., Will, H. und Heise, T.,** (2004). 'Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA'. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (25):26563-26570.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. und Mudgett, M.B.,** (2003). 'Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta'. *Mol Microbiol*, 50 (2):377-389.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. und Bonas, U.,** (1998). '*hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction'. *Molecular Microbiology*, 29 (6):1379-1390.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. und Alfano, J.R.,** (2004). 'Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast'. *Plant Journal*, 37 (4):554-565.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B. und Stebbins, C.E.,** (2006). 'A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase'. *Science*, 311 (5758):222-226.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J. und Bourguignon, J.,** (2007). 'A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture'. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6 (3):394-412.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. und Valent, B.,** (2000). 'Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance'. *EMBO Journal*, 19 (15):4004-4014.
- Jones, J.D.G. und Dangl, J.L.,** (2006). 'The plant immune system'. *Nature*, 444 (7117):323-329.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A. und Denny, T.P.,** (2002). '*Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence'. *Molecular Microbiology*, 46 (2):427-437.
- Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A.,** (2002). 'GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation'. *Trends in Plant Science*, 7 (5):193-195.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U.,** (2007). 'A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator'. *Science*, 318 (5850):648-651.
- Kearney, B. und Staskawicz, B.J.,** (1990). 'Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene, *avrBs2*'. *Nature (London)*, 346:385-386.
- Kelley, L.A. und Sternberg, M.J.E.,** (2009). 'Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server'. *Nat. Protocols*, 4 (3):363-371.

- Kim, J.-G., Jeon, E., Oh, J., Moon, J.S. und Hwang, I.,** (2004). 'Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants'. *Journal of Bacteriology*, 186 (18):6239-6247.
- 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. und Mudgett, M.B.,** (2009). '*Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1'. *The Plant Cell Online*, 21 (4):1305-1323.
- Kim, J.-G., Park, B.K., Yoo, C.-H., Jeon, E., Oh, J. und Hwang, I.,** (2003). 'Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island'. *J. Bacteriol.*, 185 (10):3155-3166.
- Kim, J.F. und Beer, S.V.,** (1998). 'HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class'. *Journal of Bacteriology*, 180 (19):5203.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A. und 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.
- Kipreos, E.T. und Pagano, M.,** (2000). 'The F-box protein family'. *Genome Biology*, 1 (5):REVIEWS3002.
- Knoop, V., Staskawicz, B. und Bonas, U.,** (1991). 'Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors'. *Journal of Bacteriology*, 173 (22):7142-7150.
- Koebnik, R., Krüger, A., Thieme, F., Urban, A. und Bonas, U.,** (2006). 'Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes'. *Journal of Bacteriology*, 188 (21):7652-7660.
- Konagaya, K.-i., Matsushita, Y., Kasahara, M. und Nyunoya, H.,** (2004). 'Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of *Tobacco mosaic virus*'. *Journal of General Plant Pathology*, 70 (4):221-231.
- Kousik, C.S. und Ritchie, D.F.,** (1998). 'Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes'. *Plant Disease*, 82 (2):181-186.
- Kvitko, B.H., Park, D.H., Velásquez, A.C., Wei, C.-F., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J. und Collmer, A.,** (2009). 'Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors'. *PLoS Pathogens*, 5 (4):e1000388.
- Lagaert, S., Beliën, T. und Volckaert, G.,** (2009). 'Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes'. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20 (9):1064-1073.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C. und Schiavo, G.,** (2003). 'The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons'. *Trends in Microbiology*, 11 (9):431-437.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T. und Genschik, P.,** (2006). 'F-box proteins everywhere'. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (6):631-638.
- Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H. und Koo, B.S.,** (2005). 'The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice'. *Nucleic Acids Research*, 33 (2):577-586.
- Lee, J., Klusener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W. und Nürnberger, T.,** (2001). 'HrpZ_{P_{sph}} from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds

- to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (1):289-294.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O. und Staskawicz, B.J.**, (2005). 'Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*'. *Plant Cell*, 17:1268-1278.
- Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M. und Taira, S.**, (2002). 'The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ'. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 21 (8):1909-1915.
- Li, J.-G., Liu, H.-X., Cao, J., Chen, L.-F., Gu, C., Allen, C. und Guo, J.-H.**, (2010). 'PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall'. *Molecular Plant Pathology*, 11 (3):371-381.
- Li, P., Lu, X., Shao, M., Long, J. und Wang, J.**, (2004). 'Genetic diversity of Harpins from *Xanthomonas oryzae* and their activity to induce hypersensitive response and disease resistance in tobacco'. *Science in China Series C: Life Sciences*, 47 (5):461-469.
- Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., Greenberg, J.T., Mansfield, J.W. und Guttman, D.S.**, (2005). 'Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (4):275-282.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C. und Panopoulos, N.J.**, (1986). 'Gene-cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants'. *Journal of Bacteriology*, 168 (2):512-522.
- Lipka, V., Kwon, C. und Panstruga, R.**, (2007). 'SNARE-ware: The role of SNARE-domain proteins in plant biology'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23 (1):147-174.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D. und Coaker, G.**, (2011). 'A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor'. *Cell host & microbe*, 9 (2):137-146.
- Liu, Y., Schiff, M. und Dinesh-Kumar, S.P.**, (2002). 'Virus-induced gene silencing in tomato'. *Plant Journal*, 31 (6):777-786.
- Lizada, C. und Yang, S.F.**, (1979). 'A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid'. *Analytical Biochemistry*, 100 (1):140-145.
- Loake, G. und Grant, M.**, (2007). 'Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists'. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (5):466-472.
- Lorenz, C. und Büttner, D.**, (2011). 'Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU'. *Molecular Microbiology*, 79 (2):447-467.
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. und Büttner, D.**, (2008). 'HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion'. *Molecular Microbiology*.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M. und Billiar, T.**, (2007). 'The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity'. *Immunological Reviews*, 220 (1):60-81.
- Ma, W. und Berkowitz, G.A.**, (2007). 'The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity'. *Cellular Microbiology*, 9 (11):2571-2585.
- Macho, A.P., Guevara, C.M., Tornero, P., Ruiz-Albert, J. und Beuzón, C.R.**, (2010). 'The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity'. *New Phytologist*, 187 (4):1018-1033.

- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. und Dangl, J.L.**, (2002). 'RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*'. *Cell*, 108 (6):743–754.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. und Bryant, S.H.**, (2011). 'CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins'. *Nucleic Acids Research*, 39 (suppl 1):D225-D229.
- Maris, C., Dominguez, C. und Allain, F.H.T.**, (2005). 'The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression'. *FEBS Journal*, 272 (9):2118-2131.
- McInnes, T.B., Gitaitis, R.D., McCarter, S.M., Jaworski, C.A. und Phatak, S.C.**, (1988). 'Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields'. *Plant Disease*, 72 (7):575-579.
- Medzhitov, R. und Janeway, C.A.**, (1997). 'Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition'. *Cell*, 91 (3):295-298.
- Meier, I. und Brkljacic, J.**, (2009). 'Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope'. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (6):752-759.
- Meixner, C., Ludwig-Müller, J., Miersch, O., Gresshoff, P., Staehelin, C. und Vierheilig, H.**, (2005). 'Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*'. *Planta*, 222 (4):709-715.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C.D., Hao, G., Turner, J.N., Burr, T.J. und Hoch, H.C.**, (2005). 'Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility'. *J. Bacteriol.*, 187 (16):5560-5567.
- Menke, F.L.H., Kang, H.-G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D. und Klessig, D.F.**, (2005). 'Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (10):1027-1034.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C.Q., Al Sady, B., Clark, E.T. und 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 Journal*, 41 (6):801-814.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. und Wasternack, C.**, (2008). 'Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling'. *New Phytologist*, 177 (1):114-127.
- Miersch, O., Schneider, G. und Sembdner, G.**, (1991). 'Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*'. *Phytochemistry*, 30 (12):4049-4051.
- Miller, J.H., (1972). *Experiments in molecular genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B.J. und Stall, R.E.**, (1990). 'Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3 (1):41-47.
- Mitra, S.K., Gantt, J.A., Ruby, J.F., Clouse, S.D. und Goshe, M.B.**, (2007). 'Membrane proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques'. *Journal of Proteome Research*, 6 (5):1933-1950.

- Morales, C.Q., Posada, J., Macneale, E., Franklin, D., Rivas, I., Bravo, M., Minsavage, J., Stall, R.E. und Whalen, M.C., (2005). 'Functional Analysis of the Early Chlorosis Factor Gene'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (5):477-486.
- Mudgett, M.B., (2005). 'New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants'. *Annual Review of Plant Biology*, 56:509-531.
- Mueller, L.A., Solow, T.H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M.H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E.V., Keyder, E.R., Menda, N., Zamir, D. und Tanksley, S.D., (2005). 'The SOL Genomics Network. A comparative resource for solanaceae biology and beyond'. *Plant Physiology*, 138 (3):1310-1317.
- Mukaihara, T., Tamura, N. und Iwabuchi, M., (2010). 'Genome-wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new functional screen'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (3):251-262.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. und Kimura, T., (2007). 'Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation'. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (1):34-41.
- Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T. und Shimamoto, K., (2008). 'RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex'. *The Plant Cell Online*, 20 (8):2265-2279.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. und Jones, J.D.G., (2006). 'A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling'. *Science*, 312 (5772):436-439.
- Nekrasov, V., Li, J., Batoux, M., Roux, M., Chu, Z.-H., Lacombe, S., Rougon, A., Bittel, P., Kiss-Papp, M., Chinchilla, D., van Esse, H.P., Jorda, L., Schwessinger, B., Nicaise, V., Thomma, B.P.H.J., Molina, A., Jones, J.D.G. und Zipfel, C., (2009). 'Control of the pattern-recognition receptor EFR by an ER protein complex in plant immunity'. *EMBO Journal*, 28 (21):3428-3438.
- Nelson, B.K., Cai, X. und Nebenführ, A., (2007). 'A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants'. *The Plant Journal*, 51 (6):1126-1136.
- Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A. und Parrilli, M., (2007). 'Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides'. *Journal of Endotoxin Research*, 13 (2):69-84.
- Nguyen, H.P., Chakravarthy, S., Velásquez, A.C., McLane, H.L., Zeng, L., Nakayashiki, H., Park, D.-H., Collmer, A. und Martin, G.B., (2010). 'Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (8):991-999.
- Nicaise, V., Roux, M. und Zipfel, C., (2009). 'Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm'. *Plant Physiology*, 150 (4):1638-1647.
- Niepold, F., Anderson, D. und Mills, D., (1985). 'Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (2):406-410.
- Noël, L., Thieme, F., Gäbler, J., Büttner, D. und Bonas, U., (2003). 'XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. *Journal of Bacteriology*, 185 (24):7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und Bonas, U., (2001). 'cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. *Molecular Microbiology*, 41 (6):1271-1281.

- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und Bonas, U., (2002). 'Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island'. *Journal of Bacteriology*, 184 (5):1340-1348.
- Ntoukakis, V., Mucyn, T.S., Gimenez-Ibanez, S., Chapman, H.C., Gutierrez, J.R., Balmuth, A.L., Jones, A.M.E. und Rathjen, J.P., (2009). 'Host inhibition of a bacterial virulence effector triggers immunity to infection'. *Science*, 324 (5928):784-787.
- O Garro, L.W., Gibbs, H. und Newton, A., (1997). 'Mutation in the *avrBs1* avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* influences survival of the bacterium in soil and detached leaf tissue'. *Phytopathology*, 87 (9):960-966.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S. und Boucher, C., (2005). 'Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (9):938-949.
- Oh, C.-S., Pedley, K.F. und Martin, G.B., (2010). 'Tomato 14-3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAPKKK α '. *Plant Cell*, 22 (1):260-272.
- Oh, H.-S. und Collmer, A., (2005). 'Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins'. *The Plant Journal*, 44 (2):348-359.
- Oh, J., Kim, J.-G., Jeon, E., Yoo, C.-H., Moon, J.S., Rhee, S. und Hwang, I., (2007). 'Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria'. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (18):13601-13609.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., Van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiäho-Lassila, E.L., Wengelnik, K., Bonas, U. und Korhonen, T.K., (1997). 'Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. *Journal of Bacteriology*, 179 (4):1280-1290.
- Palmer, K.J., Watson, P. und Stephens, D.J., (2005). 'The role of microtubules in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells'. *Biochem Society Symposium*:1-13.
- Park, J.M., (2005). 'The hypersensitive response. A cell death during disease resistance'. *Plant Pathology Journal*, 21 (2):99-101.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D. und Daniels, M.J., (1996). 'Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes.' *The Plant Cell*, 8:2033-2046.
- Pedley, K.F. und Martin, G.B., (2005). 'Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity'. *Current Opinion in Plant Biology* (8):541-547.
- Poplawsky, A.R., Urban, S.C. und Chun, W., (2000). 'Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12):5123-5127.
- Potnis, N., Minsavage, G.V., Smith, J.K., Hurlbert, J., Norman, D., Rodrigues, R., Stall, R.E. und Jones, J., (2012). 'Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Pratelli, R., Sutter, J.-U. und Blatt, M.R., (2004). 'A new catch in the SNARE'. *Trends in Plant Science*, 9 (4):187-195.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. und Mekalanos, J.J., (2006). 'Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system'.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (5):1528-1533.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J. und Tang, H.**, (2005). 'Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'. *Genome Research*, 15 (6):757-767.
- Racapé, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., Nürnberger, T., Parlange, F., Puvarel, S. und Keller, H.**, (2005). 'Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco'. *Molecular Microbiology*, 58 (5):1406-1420.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D. und Sonti, R.V.**, (1997). 'The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage'. *FEBS letters*, 415 (2):125-128.
- Ramonell, K.M., Zhang, B., Ewing, R.M., Chen, Y., Xu, D., Stacey, G. und Somerville, S.**, (2002). 'Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*'. *Molecular Plant Pathology*, 3 (5):301-311.
- Reddy, A.P.K.**, (1989). 'Bacterial blight: Crop loss assessment and disease management'. *International Rice Research Institute, Bacterial Blight of Rice*:79-88.
- Rehman, S., Postma, W., Tytgat, T., Prins, P., Qin, L., Overmars, H., Vossen, J., Spiridon, L.-N., Petrescu, A.-J., Goverse, A., Bakker, J. und Smant, G.**, (2009). 'A secreted SPRY domain-containing protein (SPRYSEC) from the plant-parasitic nematode *Globodera rostochiensis* interacts with a CC-NB-LRR protein from a susceptible tomato'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (3):330-340.
- Rhodes, D.A., De Bono, B. und Trowsdale, J.**, (2005). 'Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence?' *Immunology*, 116 (4):411-417.
- Rigoni, M., Caccin, P., Johnson, E.A., Montecucco, C. und Rossetto, O.**, (2001). 'Site-directed mutagenesis identifies active-site residues of the light chain of botulinum neurotoxin type A'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288 (5):1231-1237.
- Robatzek, S.**, (2007). 'Vesicle trafficking in plant immune responses'. *Cellular Microbiology*, 9 (1):1-8.
- Robatzek, S., Chinchilla, D. und Boller, T.**, (2006). 'Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*'. *Genes & Development*, 20 (5):537-542.
- Roberts, M.R. und Bowles, D.J.**, (1999). 'Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants'. *Plant Physiology*, 119 (4):1243-1250.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y. und Mudgett, M.B.**, (2004a). 'Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17 (6):633-643.
- Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J. und Mudgett, M.B.**, (2004b). 'A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (47):16624-16629.
- Romantschuk, M. und Bamford, D.H.**, (1986). 'The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili'. *Microbial Pathogenesis*, 1 (2):139-148.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauß, T., Bonas, U. und Lahaye, T.**, (2007a). 'Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene'. *Science*, 318 (5850):645-648.

- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. und Lahaye, T.,** (2007b). 'Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene'. *Science*, 318 (5850):645.
- Ronald, P.C. und Staskawicz, B.J.,** (1988). 'The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1 (5):191–198.
- Roper, M.C., Greve, L.C., Labavitch, J.M. und Kirkpatrick, B.C.,** (2007). 'Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*'. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (22):7252-7258.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F. und Martin, G.B.,** (2007). 'A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity'. *Nature*, 448 (7151):370-374.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U.,** (2000). 'HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant'. *Molecular Microbiology*, 38 (4):828-838.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. und Boucher, C.A.,** (2002). 'Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*'. *Nature*, 415 (6871):497-502.
- Salomon, D., Dar, D., Sreeramulu, S. und Sessa, G.,** (2011). 'Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effectors in yeast affects cell growth and viability'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24 (3):305-314.
- Samudrala, R., Heffron, F. und McDermott, J.E.,** (2009). 'Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems'. *PLoS Pathogens*, 5 (4):e1000375.
- Samuel, M.A., Salt, J.N., Shiu, S.-H., Goring, D.R. und Kwang, W.J., (2006). 'Multifunctional Arm repeat domains in plants'. *International Review of Cytology*: Academic Press, 1-26.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und Pühler, A.,** (1994). 'Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*'. *Gene*, 145 (1):69-73.
- Schornack, S.,** (2006). 'Struktur, Erkennungsspezifität und Regulationsmechanismus des Resistenzproteins Bs4 aus Tomate'. *Thesis, Mathematisch –Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg* (WWW Dokument):URL <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/07H001/index.htm>.
- Schrammeijer, B., Risseuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J.G., Crosby, W.L. und Hooykaas, P.J.J.,** (2001). 'Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein'. *Current Biology*, 11 (4):258-262.
- Shackelford, T. und Claret, F.,** (2010). 'JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer'. *Cell Division*, 5 (1):26.
- Shrivastava, S. und Mande, S.S.,** (2008). 'Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes'. *PLoS ONE*, 3 (8):e2955.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.-A. und Parrilli, M.,** (2005). 'The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*'. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (39):33660-33668.
- Spoel, S.H. und Dong, X.,** (2008). 'Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses'. *Cell host & microbe*, 3 (6):348-351.

- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. und Napoli, C.,** (1987). 'Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*'. *Journal of Bacteriology*, 169 (12):5789-5794.
- Steward, M.M., Lee, J.-S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E. und Shilatifard, A.,** (2006). 'Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes'. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13 (9):852-854.
- Straus, M.R., Rietz, S., Ver Loren van Themaat, E., Bartsch, M. und Parker, J.E.,** (2010). 'Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in *Arabidopsis*'. *The Plant Journal*, 62 (4):628-640.
- Striegl, H., Andrade-Navarro, M.A. und Heinemann, U.,** (2010). 'Armadillo motifs involved in vesicular transport'. *PLoS ONE*, 5 (2):e8991.
- Swords, K.M., Dahlbeck, D., Kearney, B., Roy, M. und Staskawicz, B.J.,** (1996). 'Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* avrBs2'. *Journal of Bacteriology*, 178 (15):4661-4669.
- Szczesny, R.,** (2009). 'Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. Thesis, Mathematisch –Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg:URL <http://digital.bibliothek.uni-halle.de/hs/content/titleinfo/232113>.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A. und 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 Phytologist*, 187 (4):1058-1074.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. und Bonas, U.,** (2002). 'Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell'. *Molecular Microbiology*, 46 (1):13–23.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E. und Staskawicz, B.J.,** (1999). 'Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (24):14153-14158.
- Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. und Kokkinidis, M.,** (2004). 'Conserved features of type III secretion'. *Cell Microbiol*, 6 (9):805-816.
- Tanabe, N., Kimura, A., Yoshimura, K. und Shigeoka, S.,** (2009). 'Plant-specific SR-related protein atSR45a interacts with spliceosomal proteins in plant nucleus'. *Plant Molecular Biology*, 70 (3):241-252.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. und Katagiri, F.,** (2003). 'Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*'. *The Plant Cell Online*, 15 (2):317-330.
- Thieme, F.,** (2006). 'Genombasierte identifizierung neuer potentieller Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. Thesis, Mathematisch –Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg (WWW Dokument):URL <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/06H103/prom.pdf>.
- 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-Klößen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorhölter, F.J., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D. und Kaiser, O.,** (2005). 'Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris*

- pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence'. *Journal of Bacteriology*, 187 (21):7254-7266.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G. und Bonas, U.,** (2007). 'New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (10):1250-1261.
- Tsuda, K. und Katagiri, F.,** (2010). 'Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity'. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (4):459-465.
- Tzfira, T., Vaidya, M. und Citovsky, V.,** (2004). 'Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*'. *Nature*, 431 (7004):87-92.
- Underwood, W., Zhang, S. und He, S.Y.,** (2007). 'The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*'. *The Plant Journal*, 52 (4):658-672.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. und Bonas, U.,** (1996). 'Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell'. *Cell*, 87 (7):1307-1316.
- van der Hoorn, R.A.L. und Kamoun, S.,** (2008). 'From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors'. *The Plant Cell*, 20 (8):2009-2017.
- van Doorn, J., Boonekamp, P.M. und Oudega, B.,** (1994). 'Partial Characterization of Fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7 (3):334-344.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P. und Boucher, C.,** (1995). 'The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex'. *Molecular Microbiology*, 15 (6):1095-1114.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. und Schell, J.,** (1974). 'Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability'. *Nature*, 252 (5479):169-170.
- van Loon, L.C., Rep, M. und Pieterse, C.M.J.,** (2006). 'Significance of inducible defense-related proteins in infected plants'. *Annual Review of Phytopathology*, 44 (1):135-162.
- Venugopal, S.C., Jeong, R.-D., Mandal, M.K., Zhu, S., Chandra-Shekara, A.C., Xia, Y., Hersh, M., Stromberg, A.J., Navarre, D., Kachroo, A. und Kachroo, P.,** (2009). 'Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling'. *PLoS Genetics*, 5 (7):e1000545.
- Verberne, M.C., Brouwer, N., Delbianco, F., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. und Verpoorte, R.,** (2002). 'Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material'. *Phytochemical Analysis*, 13 (1):45-50.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. und Schell, J.,** (1975). 'Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains'. *Journal of General Virology*, 26 (1):33-48.
- Vos, J.W., Pieuchot, L., Evrard, J.-L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L.H., Sardon, T., Vernos, I. und Schmit, A.-C.,** (2008). 'The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown'. *The Plant Cell Online*, 20 (10):2783-2797.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. und Kudla, J.,** (2004). 'Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation'. *The Plant Journal*, 40 (3):428-438.

- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X. und Zhou, J.-M., (2010). 'A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases'. *Plant Cell*, 22 (6):2033-2044.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U. und Koebnik, R., (2005). 'The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants'. *Journal of Bacteriology*, 187 (7):2458-2468.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. und Beer, S.V., (1992). 'Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*'. *Science*, 257 (5066):85-88.
- Wengelnik, K. und Bonas, U., (1996). 'HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'. *Journal of Bacteriology*, 178 (12):3462-3469.
- Wengelnik, K., Rossier, O. und Bonas, U., (1999). 'Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes'. *Journal of Bacteriology*, 181 (21):6828-6831.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U., (1996). 'HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (8):704-712.
- Whalen, M.C., Richter, T., Zakharevich, K., Yoshikawa, M., Al-Azzeh, D., Adefioye, A., Spicer, G., Mendoza, L.L., Morales, C.Q. und Klassen, V., (2008). 'Identification of a host 14-3-3 protein that interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- 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. und Staskawicz, B.J., (1993). 'Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6 (5):616-627.
- Wilson, C.M. und High, S., (2007). 'Ribophorin I acts as a substrate-specific facilitator of N-glycosylation'. *Journal of Cell Science*, 120 (4):648-657.
- Wilton, M. und Desveaux, D., (2010). 'Lessons learned from type III effector transgenic plants'. *Plant signaling & behavior*, 5 (6):746-748.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G. und Desveaux, D., (2010). 'The type III effector HopF2_{Pto} targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (5):2349-2354.
- Würtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A. und Oecking, C., (2003). 'Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex'. *EMBO Journal*, 22 (5):987-994.
- Xiang, T., Zong, N., Zhang, J., Chen, J., Chen, M. und Zhou, J.-M., (2011). 'BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto'. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24 (1):100-107.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. und Zhou, J.-M., (2008). '*Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases'. *Current Biology*, 18 (1):74-80.
- Xing, W., Zou, Y., Liu, Q., Liu, J., Luo, X., Huang, Q., Chen, S., Zhu, L., Bi, R., Hao, Q., Wu, J.-W., Zhou, J.-M. und Chai, J., (2007). 'The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto'. *Nature*, 449 (7159):243-247.
- Xu, J., Zheng, H.-j., Liu, L., Pan, Z.-c., Prior, P., Tang, B., Xu, J.-s., Zhang, H., Tian, Q., Zhang, L.-q. und Feng, J., (2011). 'Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82'. *Journal of Bacteriology*, 193 (16):4261-4262.

- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L. und Chai, J.,** (2007). 'A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants'. *Cell host & microbe*, 1 (3):175-185.
- Zhang, X.-N. und Mount, S.M.,** (2009). 'Two alternatively spliced isoforms of the *Arabidopsis* SR45 protein have distinct roles during normal plant development'. *Plant Physiology*, 150 (3):1450-1458.
- Zipfel, C.,** (2009). 'Early molecular events in PAMP-triggered immunity'. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (4):414-420.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. und Felix, G.,** (2006). 'Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation'. *Cell*, 125 (4):749-760.
- Zipfel, C. und Robatzek, S.,** (2010). 'Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: Veni, vidi...?' *Plant Physiology*, 154 (2):551-554.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G. und Boller, T.,** (2004). 'Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception'. *Nature*, 428 (6984):764-767.

Anhang**A1****Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide.**

Name	Sequenz	Bemerkung
xopI_Start	CACCATGCCGATCACCCGAAC	xopI forward für pENTR/Topo
xopI_Stop	TCACATGTCCATATACCTGCGCGACA	xopI reverse mit Stop
xopI_rev	CATGTCCATATACCTGCGCGACAC	xopI reverse ohne Stop
xopIrep-fwd	CACCAGTGCAGAAAGCATGCGTGTC	<i>Repeats</i> von XopI für pENTR/Topo
xopI127-rev	GCGATCCTCATCGTCCGGATAG	F-box von XopI für pENTR/Topo
xopH_Start	CACCATGCCGAACAAAATCTC	xopH forward für pENTR/Topo
xopH_Stop	TTATGCATTGTGGTCGAGCCATTC	xopH reverse mit Stop
xopH_rev	TGCATTGTGGTCGAGCCATTC	xopH reverse ohne Stop
xopI_fwd-1	ACTAAGCTTCAGAGCTGCCTGGTGCGTTG	flankierende Bereiche von xopI zum Erstellen einer XopI-Deletionsmutante
xopI_rev-1	TAGAATTCATCTCGGGTCTCCTGCGGTG	
xopI_fwd-2	CGGAATTCTGAGCACTGTTTGATTGAGTG	
xopI_rev-2	ATAGGATCCAATGCGCGCAGCGTTGCAAC	
xopH_fwd-1	TAGAAGCTTGATTACCGTCCCAGCCATGAC	flankierende Bereiche von xopH zum Erstellen einer XopH-Deletionsmutante
xopH_rev-1	GCGAATTCGATCGGAAGTTATGTCGTC	
xopH_fwd-2	CGGAATTCTCTTCCATCGCAAAGATGTC	
xopH_rev-2	CTGGATCCTCCTTCTCCATACTCTTCAG	
Hframe-F1	ATCGGATCCTACCGATCGTCGTGTAGCTG	zum Erstellen der XopH-frameshift-Mutante
Hframe-R1	ACGGAATTCGTCATTTGTTTCGGCATTTTCAG GC	
Hframe-F2	AGCGAATTCATCTCCGGCTCAATTGCAC	
Hframe-R2	TCGAAGCTTTGCCGTTTCGATGATATCATC	
XopH-262rev	PHO-GTCTCTCATCATGGCCATCTCC	Mutageneseprimer für XopH-Punkmutationen im putativen aktiven Zentrum
XopH-HC267AA	Pho-TGCATGTAG GCTGCT TGGTATGG GCCT	

Name	Sequenz	Bemerkung
XopH-C267A	Pho-TGCATGTACAT GCT TGGTATGGGCCT	
XopH-C267S	Pho-TGCATGTACAT TCT TGGTATGGGCCT	
WRKY-Start	CACCATGGAATTTACCAGTTTGG	WRKY forward für pENTR/Topo
WRKY-rev	CCATCTCCCTGTCTGATTATTATG	WRKY reverse ohne Stop
LeArcA1-Start	CACCATGTGCGAAGAATCACTG	LeArcA1 forward für pENTR/Topo
LeArcA1-rev	GTAGCGGCCAATACCCACAC	LeArcA1 reverse ohne Stop
Kin-Start	CACCATGGCGGGATTGAATAT	Kinase forward für pENTR/Topo
Kin-rev	AACACAATTATCCGGTAGAG	Kinase reverse ohne Stop
xopG_Start	CACCATGCCAATCAGTCAAAC	xopG forward für pENTR/Topo
xopG_Stop	TCACATGCCGTGAGGCTTATA	xopG reverse mit Stop
xopG_rev	CATGCCGTGAGGCTTATATTT	xopG reverse ohne Stop
xopG-mut1-rev	AGT GCCT CCTTTCCGGCTTC	für SOE-PCR zur XopG-
xopG-fwd3	TCTCCGATAACCAAGCGCTC	Mutagenese (E174A)
XopA-F+15bp	GCCCCCTTACCATGATCAATTCATTGAATA CG	Für Austausch des N-Terminus von XopG gegen den N-Terminus des Nicht-Effektors XopA
XopA-51+15bp	ATTCTTGCAGCGCTTGAAAAGATGAACTGG GTC	
pENTR/D_R	CATGGTGAAGGGGGCGGC	
XopGΔN-F	AGCGCTCGCAAGAATCGAA	
5'-RACE-SPRY	GGTTGCAGGTGTTGACAAGGGTA	Primer für die RACE-PCR
3'-RACE-SPRY	TAGGTGACACAGGGCATAACGA	
5'-RACE-POM	CAACCCAGGAGCAGCTTCATCAACG	
3'-RACE-POM	AGTACCGCTGTTGGGGCTGAGGTG	
SPRY_Start	CACCATGGAGAATCTCATGGCTAC	SPRY forward für pENTR/Topo
SPRY_Stop	CTAACTCTTTTGCTCATTGG	SPRY reverse mit Stop
SPRY_rev	ACTCTTTTGCTCATTGGACAC	SPRY reverse ohne Stop
POM_Start	CACCATGGGGAAGGGTCCTGGAC	POM forward für pENTR/Topo
POM_Stop	CTATGGCTTGAGAGCCAAAGC	POM reverse mit Stop
POM_rev	TGGCTTGAGAGCCAAAGCAAG	POM reverse ohne Stop

Name	Sequenz	Bemerkung
RRM_Start	CACCATGGCGAAACCAGGTCGAG	RRM forward für pENTR/Topo
RRM_Stop	CTAAGGCTTACGAGGTGGTG	RRM reverse mit Stop
RRM_rev	AGGCTTACGAGGTGGTGAAC	RRM reverse ohne Stop
SPRY_128-F	CACCCAGTGTGGATACTCCAG	<i>Silencing-Fragment SPRY1</i>
SPRY_626-R	TTTACATCTGGGCTATCATC	
SPRY_673-F	CACCAAGATAGATTAAGTGCAG	<i>Silencing-Fragment SPRY2</i>
SPRY_1173-R	TGTATACATTGAAGCAGCAG	
RRM_505-R	CTTTCTCAGCATCAATTCTAGTC	<i>Silencing-Fragment</i> (mit RRM_Start)
XopA-F+15bp	GCCCCCTTCACCATGATCAATTCATTGAATA CG	amplifizieren die ersten 153 bp von XopA + 15 bp Überhänge passend zum Zielvektor
XopA-51+15bp	ATTCTTGCGAGCGCTTGAAAAGATGAACTGG GTC	
pENTR/D-R	CATGGTGAAGGGGGCGGC	amplifizieren pENTR-XopG ohne die ersten 153 bp von XopG
XopG Δ N-F	AGCGCTCGCAAGAATCGAA	
hopD1_Start	CACCATGAATCCTCTACAATCTATTC	hopD1 forward für pENTR/Topo
hopD1_Stop	TCAGGGTGCTGGCTGCCG	hopD1 reverse mit Stop
hopD1_rev	GGGTGCTGGCTGCCGCGG	hopD1 reverse ohne Stop
B-Int5_248-F	CACCTGAGGCTGTGAAGTCCAGTG	416 bp Fragment für <i>Silencing</i>
B-Int5_664-R	CCAGAGCTTTGTGCTTTTCC	
B-Int22_1330-F	CACCTTGATTTGGCAGGGAAGAAC	468 bp Fragment für <i>Silencing</i>
B-Int22_1798-R	CAAGGGCCAAAAAGATGAGA	
B-Int23_204-F	CACCGGTTTTGCACCTCCTGCTAC	449 bp Fragment für <i>Silencing</i>
B-Int23_653-R	TGCACAGCTCCAGACAAATC	
B-Int27_285-F	CACCATGCAAGGTAAGACGGATGG	466 bp Fragment für <i>Silencing</i>
B-Int27_751-R	GGCAATCGAGAGAGGACTTG	
B-Int30_xx-F	CACCTGAACTTGAGGAGCCTGTGA	409 bp Fragment für <i>Silencing</i>
B-Int30_xx-R	GACAGGCCCTTCTCCTTGAG	
TPX_RT-F	GAAAAGCACAAAGCTCTGGA	287 bp Fragment für RT-PCR Int. 5
TPX_RT-R	TAAACACCAATGCTGTGACG	
B22_RT-F	TGCACCTTCTCTGTCTGTGA	282 bp Fragment für RT-PCR Int

Name	Sequenz	Bemerkung
B22_RT-R	CTGTCAAGCACAGCAACATC	22
B23_RT-F	AGATTTGTCTGGAGCTGTGC	334 bp Fragment für RT-PCR Int
B23_RT-R	TGCAACAGTTCGTCTAACCA	23
B30_RT-F	GCTGCACAAGTGAAAGAACC	292 bp Fragment für RT-PCR Int
B30_RT-R	TATTTGTGCCCTTACCAGA	30
3215(-1008)-F	CACCGCTATCGGGATGGCATC	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopK
3215-465-R	GTACTTGCGCACCACGAAGAC	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopK
0285(-998)-F	CACCTGCCTGCACACTTCGTTG	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopR
0285-456-R	AAAGCGTTCTGACGCGCGTG	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopR
0324(-1041)-F	CACCGCTGTTACCGCAGTGCAC	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopS
0324-471-R	AGCGATATAGCTACCTTCAC	für AvrBs3 Δ 2-Fusionen, XopS

A2

Nukleotidsequenzen der cDNA-Inserts (TPX2, RPN2, PMP1, JAB, BIP18, BIP30) bzw. vollständige Sequenzen (WRKY1, LeArcA1, UMPK-like, SPRY, RRM, POM) der im Hefe-Dihibrid-System isolierten Interaktoren von XopB, XopH und XopG.

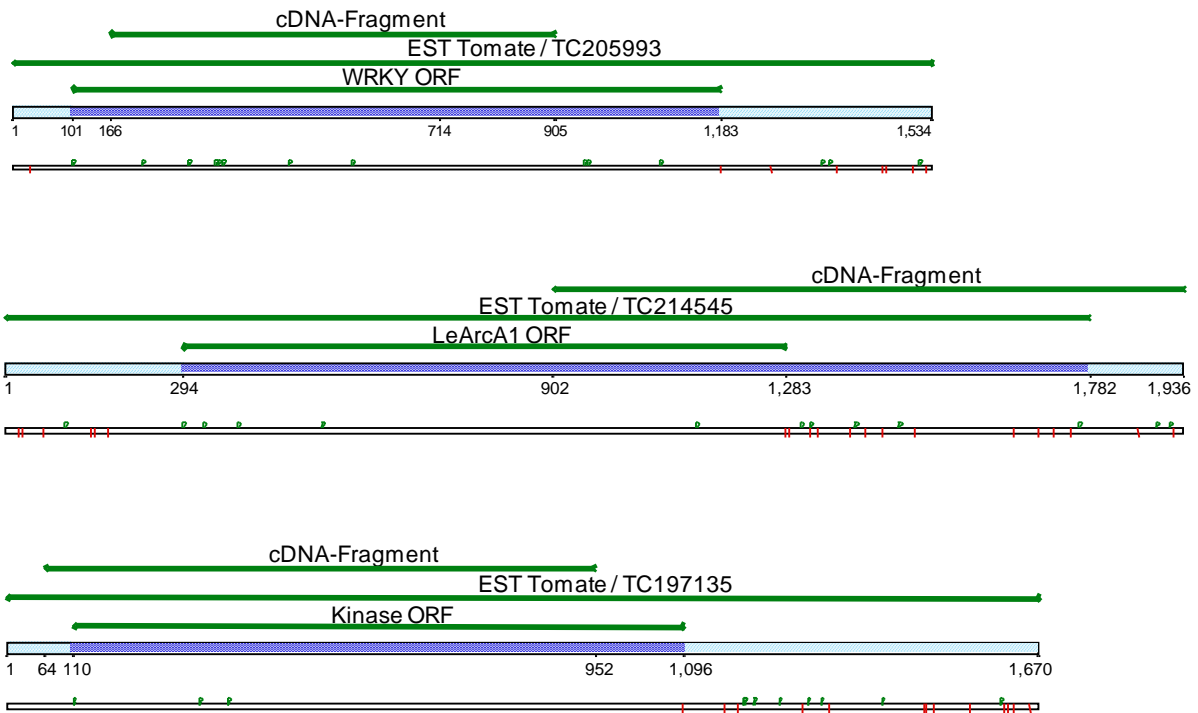


Abbildung A1: Isolierung der vollständigen ORFs der XopH-Beuteproteine durch Sequenzvergleiche. In den Abbildungen sind die jeweiligen in der H2H-Sichtung isolierten cDNA-Fragmente, die bekannten EST-Sequenzen und die ORFs der 3 XopH-Interaktoren WRKY1, LeArcA1 und Kinase zueinander angeordnet. In der jeweiligen unteren Zeile symbolisieren die grünen Zeichen ein Start-Codon und die roten Striche ein Stop-Codon.

Sequenz cDNA-Fragment XopH-Beuteprotein WRKY1:

```

ATGGAATTTACCAGTTTGGTTGATACTTCATTGGATTTGAGCTTTAGGCCTCGTCAAAAAGT
CCTGAAACAAGAAGTGCAGAGTGATTTCACTGGATTGAGCATAGAAAGAGAGAATATGGTGG
TGAAAAATGAGGCAGGGGATTTGTTAGAGGAACTAACAGAGTGAGTAGTGAAAACAAGAAG
TTAACAGAGATGCTTACTGTAGTTTGTGAAAATTACAATGCTTTAAGAAACCAATGATGGA
GTATATGAGCACACAAAATGGTGTAGCTGAAGATACTAGTGCAGGGTCAAGGAAAAGAAAAG
CTGAAAGTATCTCTAATCCTGTTAACAACAACAATAATAATAACAATATGGATGTTGTT
CATGGACGTTTCATCAGAAAGCAGTTCGAGTGACGAAGAGTCCTGTTGCAAGAACTCAGAGA
GGAGCACATAAAAGCGAAAGTTACAATTGTTTCTATGAAGACTGATGCATCTGATACCTCTC
TTATTGTAAAGGATGGTTATCAGTGGAGAAAGTATGGTCAGAAAGTAACTAGAGACAACCTT
TGTCCAAGAGCTTACTTCAGATGCTCATTTCACCTGGTTGCCCTGTCAAGAAAAGGTTCA
GAGAAGCATTGAAGATCAGTCTATTGTGGTAGCAACATATGAAGGAGAACATAACCATCCAC
AAACCTCAAACCGAATCAGGTCCAAGTACTAATACTTCCACAGCCAGCCGATTAATGTG
ACAACCTATCGCGGGCACTACTTTCAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAGGACC
AACCATTACTCTCGATCTTACTGCACCGAAAACAGTGAAAAGCGCGATATGAAGATGAATC
ACAGTACTACTAGTCTTACCAGTGGCAATAGCATTAGAACAACAACAACATCAGCAGCA
GGAGGTGAATATCAAAATAGGCCAGAGTTTCAACAGTCTTGATAGAACAATGGCTACTTC

```

CTTGACCAAAGATCCAAGTTTCAAAGCAGCACTTGCTGCCGCCATATCAGGAAAAATCCTCC
AACATAATAATCAGACAGGGAGATGGTAA

Sequenz XopH-Beuteprotein *LeArcA1*:

ATGTCGCAAGAATCACTGGTCTCCGCGGCACAATGAAGGCCATACAGATTGGGTGACAGC
CATTGCCACTCCGATTGATAACTCCGACATGATTGTCACATCGTCTCGTGACAAATCCATCA
TTGTTTGGTCACTTACAAAAGAGGGCTCACAGTACGGTGTCCCCCGTCGCCGTCTCACCGGA
CACGGCCATTTTCGTCCAAGATGTTGTGTTATCATCAGACGGTATGTTTGCACTTTCCGGATC
TTGGGACGGTGAACCTCCGTTTATGGGATCTTCAAGCTGGAACCACTGCCCGCGTTCGTTG
GACACACGAAGGATGTTTTATCCGTTGCATTTTCAGTTGATAACCGTCAGATTGTTTCTGCA
TCTCGTGACAAATCGATTAAGCTATGGAACACTTTGGGTGAGTGTAATAACACGATTCAGGA
TCAAGATTCACATTTCTGATTGGGTGTCTTGTGTTTCGTTTTAGCCCAAATAATCTTCAACCAA
CTATTGTTTCTGGATCATGGGATCGGACTGTGAAAATCTGGAATCTTCTAACTGTAAGCTT
CGCGCTACTCTTGCTGGGCACACTGGTTATGTGAATACTGCTGCAGTATCTCCAGATGGTTC
TTTGTGTGCTAGTGGAGGAAAGGATGGAGTGATTTTGTGTTGGGATTTGGCTGAAGGGAAGA
AATTGTACTCCCTTGATTCTGGTTCTATTATTCATGCTCTTTGTTTTAGCCCAAATAGGTAC
TGGTTATGTGCTGCAACTGAGTCTAGTATTAATAATTTGGGATTTGGAGAGTAAGAGTATTGT
TGTTGATCTTCGTGTTGATCTCAAGCAAGAGACTGAAATGTCTGGCAATGCAACTTCTACTT
CTGGCAATAGCAAACCAAGGTTATATACTGCACCAGTTTGAGTTGGAGTGCTGATGGGAGC
ACACTTTTCAGTGGATAACAGATGGTCTGATTAGAGTGTGGGGTATTGGCCGCTACTAA

Sequenz XopH-Beuteprotein UMPK-like:

ATGGCGGGATTGAATATATTATCTCAGACTCCGTCGCCATGGCAGCTGTCAGCTTCATCCAC
ATCATCATCAATATCATATTCTTCAAGATTTCCACATTTTTATGATTTAATAATAATTACA
ATTGCGGCGATTCCAAATGCTCGACAAATTTCCCTTTCTGGAAACCCAAGACCAAAGCGT
CCAACTTTATCCTCTCAAATGCAGCCTCACTTCTCCAATTCATCAGGCAGTGAATGTTTCATG
GATGCAAGATAAATCCGCTTCTTGTGATAATTTTCCCTAACGGAAGGAAGCAAGGTGCAT
TGAATGCTGCGTCTTCAAAGAACGAGCACTAGTTTCTTCTGTGGACGATCTTTATGACTTC
ATATGCTCAGGCCCACTCATCAGTAAGATTGGTCTGACACCAGAAAAGGTGGCCGAGTCCAT
TGACGAGTGGATAGAGTATGGATTACGGCTTTGTAGATTGTTTCAACTCAATCAGTTGTCTC
TCAACGAGGCCCAAAAATTCGAATCTACCACTACTATATTCAGTCTTCTTGTGGTGTGAA
CAAGAAATTTTCGAGCATAGTTCTAAGTTCAAAGAAGAAGAAGAAATCCCTCCATTGGTGAT
TGGCTTCAGTGCGCTCAAGGATGTGAAAAACAACACTAGTATTCGCATTAGAATATCTTT
TTAAAATCACAGGGAGGAAAGCTGCGACAGTATCCATTGATGATTTTTACTTAAACAGCGGAA
GAACAGGCCAAAATAAGAGACAGCAACCCAGGGAACCTTGCTTTTGGAGTTTCGTGGAAATGC
TGGAAGCCATGATCTTCCATTTTCTGTTGAGACTCTGACAGCACTAAGTAAATTGACAAAAG
AAGGTGTGAAGGTGAAGCTTCCAAGATATGATAAATCTGCTTACAGTGGTAGAGGTGACAGA
GCTGATCCCTCCGAATGGCCAGAGGTTGAAGGACCTTACCGGATAAATTGTGTTTGA

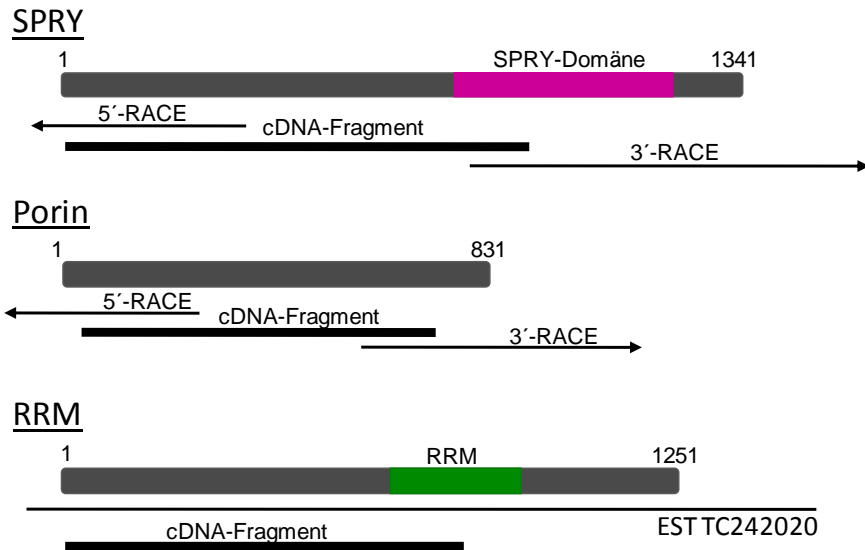


Abbildung A2: Isolierung der volle-Länge Sequenzen der XopH-Interkatoren SPRY, Porin und RRM durch RACE-PCR und Sequenzanalyse. Maßstabsgetreue schematische Darstellung der vollständigen Gensequenzen der potentiellen Interkatoren und der Lage der cDNA-Fragmente im Verhältnis zu der durch RACE isolierten Sequenzbereiche, bzw. der EST-Sequenz (RRM).

Sequenz XopG-Beuteprotein POM:

ATGGGGAAAGGGTCTGGACTTTACACTGAAATCGGAAAGAAGGCTCGAGATCTGTTGTACAA
 KGACTACCAGAGTGACCACAAGTTCTCTATCACTACCTACTCTCCCACCGGAGTTGTTATTA
 CTTCATCAGGATCGAAGAAAGGTGATCTGTTTTTGGCTGATGTTAACACTCAGCTGAAGAAC
 AAGAATGTTACAACAGACATTAAAGTAGACACAACTCCAATCTTTTCACCACCATTACCGT
 TGATGAAGCTGCTCCTGGGTTGAAGACAATTTTAAGCTTCAGAGTTCCTGACCAAAGGTCTG
 GAAAGTTGGAAGTTCAATATCTGCATGACTATGCTGGGATATGCACTAGCGTAGGGTTGACA
 GCAAACCCTATTGTTAACTTTTCTGGTGTAGTGGGTACCAACATTGTTGCTCTTGGAAGTGA
 TGTATCCTTTGACACCAAGACTGGAGATTTACCAAAATGCAATGCTGGTTTGAGCTTCACAA
 ATGCCGACCTTGTTGCTTCTTTGAATCTGAATAACAAGGGAGACAATCTGACTGCATCATA
 TACCACACAGTGAGCCCTCTTACAAGTACCGCTGTTGGGGCTGAGGTGAATCACAGCTTCTC
 TACCAATGAGAACATCATCACCGTGGGTACTCAGCACCGATTGGATCCTTTGACCAGTGTGA
 AGGCAAGGATTAACAACCTTTGGCAAGGCCAGTGCTCTGCTTCAACATGAGTGGCGTCCGAAG
 TCCCTTTTCACAGTTTCAGGAGAAGTGGACACTAAATCTGTTGACAAGGGTGCCAAGTTTGG
 ACTTGCTTTGGCTCTCAAGCCATAG

Sequenz XopG-Beuteprotein SPRY

ATGGAGAATCTCATGGCTACTTACCAAGACGAAGAAGAAGAGGAAATTACCGCCGACCCTGC
 TCCGTTATCCGCCGTGGAAGCTCCGGTGACCCTTGAGGAAGTCTGCAGGAAGTTGCAAAAA
 AAGGCAGTGTGGATACTCCAGAACCTGAATCCGATGTACCATCTGCCGACCCGAAAAGTCCA
 TTGAAATCCACCAAATTGGAAGAAGATAACGATGATGAAGAGGAGGATGAGGAGGAAGAAGA
 GGAGGAAGTTGATGAGCCACCGCCGAAGAAGCAGAAACAACACTATCCAGTTTAACCCTAGAAT
 CACCAAAAATAGAAAAAGAAGAAGAAGATTTGGCGAAATTACCCTTGTCAACACCTGCA
 ACCGCTAAGGGAAATGGCGTTCGTCTGGTAGCAAGAAGAAGGCAAAATCAAAATCGAAGAAGAA
 AAACAACAATAACAACCTTTGGACGAAATCCAGTTCGAGAAAAGGGGAAGAAGAACAAGA
 ACAACACTAGCAACCAAAAAAGCAATGGAAGAAGAAAATGGAGTCGTTCCAGAACAGGAAGCA
 GAAGACAAAGTTTACATTATACCAATTCCAAGGTTTCCAGACAAAAATGATGATAGCCCAGA
 TGTA AAAATCTGTCTTTCAAAGGTTTACAAAGCAGAAAAAGTTGATGTAAGTGAAGATAGAT
 TAACTGCAGGAAGTACAAAAGGTTATAGGATGGTGAGAGCAACAAGAGGGGTGTTAGAAGGA
 GCATGGTATTTTCGAGATTAAGGTAGTGAAATTAGGTGACACAGGGCATAACGACTTGGGTG

GTCAACAGATAAAGGGGATTTGCAAGCACCTGTTGGATATGATGGGAATAGTTTTGGTTATA
GAGATATTGATGGTAGCAAGATTCATAAAGCATTAAAGGGAGAAATACGGGGAAGAAGGATAT
GGAGAAGGTGATGTTATTGGCTTGTATATCAATTTGCCTGAAGGTGCTCAATATGCCCCAAA
ACCGCCTCGGCTTGTGGTATAAGGGACAGAGATATATGTGTGCAGCTGATCCTAAAGAAG
ATCCTCCTAAAATAATTCCTGGGAGTGAGATATCTTTCTTCGAAAATGGAGTTTGTCAAGGT
GTTGCTTTCAAAGATCTTTATGGTGGTCTTACTATCCTGCTGCTTCAATGTATACACTTCC
TGACCAACCTAATTGCACTGTGAAGTTCAACTTCGGCCCCGGACTTTGAATGCTTTCCTGAAG
ATTTTGTGGGCGCTCTGTTCCAAAACCAATGGTTGAAGTTCCTTATCATGTTTTCGATGGA
AGAGTTGAGAATGGTGTGTCCAATGAGCAAAAGAGTTAG

Sequenz XopG-Beuteprotein RRM:

ATGGCGAAACCAGGTCGAGGCCGTGCGGCTTACCCTCAGGCTCGTCTTCTCGTTCCCGGTC
TCGTTCCCGTTCCCGGTCTCGCTCTTACACTCCTTCAAACCTCTCGCTCCTCAAGTTCGCGTT
CTCCATCTCGATCTAGATCCCGCTCCAGATCAATTTCTTCATCTTCTCTGCTTCCCGGAGT
GCAAGTTCTCGCAGCCCTAGTTCGTGCGCCCTCCATCTCAACGAAAAGCCCTGCTGGAGTATC
TAAGCGAGGCCGCTCGCCGCCACCACCAGAGTCTAAGAAAGCTTCTCCACCTCCAAGGA
AAGTATCTCCTATACCTGAGTCGCGTGTAAATTCATGTGGATCAACTCAGCAGGAATGTCAAT
GAAAACCATTTGAAAGAAATATTTGGTAATTTGGTGAAATTCTGCATGTGCAGTTGGCCAT
TGATCATGTTGTTAATCTTCCCAAAGGGTTTGCTTATGTTGAGTTCAAGACTAGAATTGATG
CTGAGAAAGCCCAACTACACATGGATGGTGTCTCAGATTGATGGGAAAGTAGTTCATGCCAGG
TTTACCCTTCTCTGAGCGAAAGAAGGCTGCCTCACCTCCAAGGGCTGTTGCAACTTCTCAAG
AAGAGATGCTCCGAGAACCGATAATGCTCCTGTTGATGTGGAGAAAGATGGACCAAAACGGC
AACAAGAGTTATCTCCTCGTCGAAAGCCTGCTTCTTACCTCGGAGGTCCCCTATAGGACGA
AGAGGGTCTCCTAGACGTGGGCCAGATTCTCCTGTTTCGCCGACGAGCAAATTCTCCTTTTAG
GCGCGGCAGTCCACCACCCACAGGAGGAGGCCTGCATCTCCCATGAGGCGCCGTTACCAT
CCCCTCCACTAAGACGTCATCGGACACCTCCTAGGGGCTCTCCAGAAGAATTCGTGGCAGA
CCTGTTAGAAGACGTTTCTCCCTTCCGCCAAGGCGTCGTTCTCCACGACGTGCTAGAAGTCC
ACCAGAAGATCTCCGATTGGTCTCGGTCCCGTTCACCTATTAGAAGGCCTCTCCGGTCC
GATCAAGATCCATTTCTCCTAGGCGGGGAAGGGGTGCAGCTGCAAGACGTGGGAGGTCATCA
TCCTACTCTTCTTCTCCAGTCCCTCGCAAGGGACCCCGCAAGATTTCAAAGAGTGCAGTCC
TAAGAGAAGGCCTTTAAGAGGGAGGAGCCCCAGCAACAGTAACAGCAGCAGTTACCACCTC
GTAAGCCTTAG

Sequenz cDNA-Fragment XopB-interagierendes Protein TPX2 (BIP5+BIP14):

GGGGCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAAGAGTTGGTTTTCACGTTTGTGGGGTTT
TGTGTTTTTGTGCTGTGTTGAAGAGATCTCTATCAGATCAGAAGCTTAAAGGGTCATAAAAGA
TAACCTCGTGATGGGGAGAGACGTTACAGGTTACGTTCTGATAAGAAACCTACTGTTAAGC
CAAATGGTGTCAACCATGGTGCAGTCCATGTTGCCCCAGAATTGCCAAGGAAAGGGTTGAA
GCAAAGGAGTTTGAGGCAGAGGATCACACTGCAAATGGCACACATGTGGAGGAAGCCCATGA
GAAGCAGGATGTACTATCTGTGAAAAGCACTAACTGTGAACCTGGCCCGATTGAGGGAAAAA
TTACGAAGACTGAGGCTGTGAAGTCCAGTGACAAGAAGTTGGGCTCACCAATGAAAACCTCA
TCTGATTCTACTGCAGCAACTGAAAGTCCAGCCCCCAGTTATGAATTCATCAGGGAATGA
ATCTGAAAATCATGAAAACACTCAGACTGTTGATGCTGGCTCGAATTGTTTCATCAAAGTCCA
TCGATCTGCAGTCTCCTATGACTTCACAAAAATTGCATCAAAATTCCTCCCATGATGACAAGG
AAGTTGCGGATGCAGGATGAAGATGATAATTGGTCTTTGGCTTCTCAACTGCAGCTTCTGT
GCGGACAATTAGGTCCAAGGTTACTGTTCTGTAGCTCCAACATTTAAATGTTCTGAACGCT
CAGCGAGACGTAAAGAGTATTACACAAAGTTAGAGGAAAAGCACAAAGCTCTGGAGGCGGAG
AAACAAGAATATGCAGCCAGAACAAGGAAGAGGAAGAGGCAGCAATTAACAGCTTAGAAA
GGCCATGTCCTACAGAGCAAATCCAGTTCCTAATTTTTTACCGTGAAGGGCCACCTCCAAAGG
CTGAACTTAAGAAGCTACCAGTCACTCGTCCAAATCACCAAATCTAACCCGTAGAAAGAGC
TGTAGTGATGCAGTCCGAGCATCTCCTGAAGAAAAGAAAGCTTCTGCTAGGGGTGCTCACAG
CATTGGTGTTTACAAACAAGGCAGTCTACCC

Sequenz cDNA-Fragment XopB-Interaktor 18 (BIP18):

AACAAAACCAGAAGCTTCGACTCCAGGGAGTAGCGAGACAAAAGTAGCTCCAGCGAAGGCTC
CGGTCAACAACCTCCATGCAACAGCTACGAAGAAATCTTCTCTATCTCCGGTGCCTCTTTCTT
CTTTTCCGATGAGGATTAACAGCAAATTTAGGCAAATACTTCAAATCTTTGAGCTTGTTAA
GACGGATCTTGGCAGATCCGTCCAAGTAAGTTTTAATCAACTTTATGGTCATTTTAACTCTT
TGATGTGAATGAGTTTGATTAGTTTGAGAATTCGAGCATGATATAGTTTGTTCATGATATATT
AATTTGTCTTGTAACATGCTGATGTTTAGATAGCATATCTAGGTTGAAGTTGTCTAATTAAA
ATTCATGTTTCATTTGCTTAATAGTGATCTGATAGATTTCTCTCTTTGCCTTTGTGTTAATAT
TTACCGTCGGTTGTTTAAACAGGTTTCATTGAATTTTGTTTTTTTTTCTCTGTCATAATCATGGA
CTTGTTAATTTTTCAATATTTTTTTTTCTCAATAGCCTAAATAGTTTATTAAATCCAAGAATGT
TTGTTGGTGATAATTTATTGTCATTATGTTTAAATTTGAGTACTGTTGGTTGTTTTACTAATT
GATTGATTTGTTTTTTCCCTTCTTTGCTTGGTTGTAATTAGGATCTACCAGTTGTTTATAGA
CTTTGTCAAATTAACAAAATTTGATATTTAAAATTTATGGCTTACACTGCGTAATTAATGTTG
TAAATTTGGATTCAATTAAGTATTGTGCTTCGCTTGTCTTAATTACAACAAGCAATTCCAAC
AAGGTAATTTGTTTGGACTAATTTTTATCTTTTAAATTTATATGTTCTGATGGATTTTCTGTA
ATTTTTATTTTACTGACTTATGTTAATTGATTTTTCTACCTTAATTAAGTACTAGTTAGTAAGA
TGCAATCATGTCCGGCTATGCTAAAATGTATATTGGTATATTTTTTTAGTTGTAATTATCACC
CTTCTCGTATTAATTATTACCTTTCTTACTTGATTTTTTGCATATCATTTGTTAGTTAATTGA
TCCCGTTTTCTTGATTTAAAGTTGATAGATCTTACTTTTTTATATTTGGTAAAAAAAT
AGAACAAAAAAATATTAATTAATTAATAAATAAATCTAATTTCACTCTTTTAAAATAAGAAACG
ATTACCCC

Sequenz cDNA-Fragment RibophorinII (BIP22):

CAGCTCTGGTTCAAAGGATGCTTCAATCATTGATCAGTATCTCAAATTTGATCCTGAAAATG
CTGTGCATTTCTTGGATGCATTGCCAGAAAACATTGATGTTGGCAGTTACATTTTTTTCTTTG
GAGATTGTCCTTGACAATCCAGAGGATAAAAAGATCTATGCCACTGGAGGACGAACAAAAGT
ACCCATATATGTGACGGGATTTATCAAAGTTGACCATCCAGATGTTGCTGTGCTTGACAGTG
ATCTTGGTAATGTGGAACTCAAAGAGATTTGATTTGGCAGGGAAGAACACACTCTCTCTC
TCAGCAAACCATCTTCAAAGCTACGGTTGTCATTCCAATTAACTTCTCCTCTTGGGAATGT
TTTTAAGCCACATCAGGCTTTCTCAAGTTGAGACATGAGAGCAAAGTGGAACACATCTTTG
TGGTGGAAAATTTCTGGAAAAAATTTGAAATAATACTAGATTTTCTTGGACTAGTTGAGAAG
TTTTTCTATCTATCAGGTAGATATGACATCCAACCTTACAGTTGGGGATGCTGTCATGGAAAA
CTCGTTCTTCTACTACTGGGTTCAATTGAATTAGATCTGCCGGAGCCTCCAGAAAAGGCAA
CTCGCCCTCCTCCACAACCTATTGATTCTACCTCAAGATTTGGGCCCAAGGCAGAAATATCT
CACATATTCAGAGCTCCCGAGAAAAGACCTCCTAAGGGGCTTTCTCTCATCTTTTTGGCCCT
TGTTCTCTTGCCATTTATTGGATTTTTGGTTCGGGCTTTTGGAGGCTGCAAGTCAACCTGAAGA
ACTTCCCAAAGCATCAGCACTTGCTACATTTGCCATTCTTTTCCACCTTGGCATAGCAGCT
GTCTTAACACTCTATTTACTATTTTGGTTGAAGCTGAATCTATTCACAACACTCCAAGCGCT
TGGATTTTTGGGGATCTTCTTGATGTTTGGTGGGCATAGAACCCTTTCATATTTAGCATCAT
CATCTGCCAAGTTGAAATCAGCCTAATTTAGACAGATCACTTCTAATTATAGATGTGAGGAA
GCCTTGAATAGAAAAGAGAGTTGGATAATCCAATTTTGTGTTGACGACAAACATACGTATCTA
GTATGATGTTAACTACACCAGATTTTGTCTTCAAATGATCGATAGTTGCTACGTTAACCTGG
TAAAGTTGCAGTGATTTGTCTGAGGGGCGTTTTTCTCGACATCATGAATATATACCTACAGT
ACTTACTATGAGGACTTATGGTAATTCATCACTTGTGTTTGTATCTGATGTTTGCAGAAGTT
TTCACCTAATAGACTGTATTGTCTAAATGCATTTTTAAGAAGTTCATATATTGTTAAAAAGT
TCAAAGATCTATTACATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Sequenz cDNA-Fragment XopB-Beuteprotein putatives Typ 1
Transmembranprotein (PMP1, BIP23):

GGCATCGATAACCCATCTCACCGTTACTTCCGTTCTCCATCTTCCGATGCTTCTTCTAAGAT
AAGTTCCTTGTCTCTTTCCGATGTTGGTGTACTGTATCAATCTTGCTTGGTTTTGCACCTC
CTGCTACTCTTTCCTCTGCTAGTTCATCAAAGTTGAATGAGGTAAGTGTACCAAATCCATTT
GATAGGCCGGGTTCTGTCTCATCCTAGAAGTTACAGGAGCTGAAGGTGTTGCTTTTGAGGC
CCTTAGGAGCAATGTAGTAAACGAAAATAGAGCTGACATTCAACTTCCAGATGCAGATAAAG
TTTTCTCTTTTTTTCATTGGATGAACCAAAAACAGATGCTGAACATTCAGAGAAAGAATTAAGT
GAATTTGCATCATGGTTGAGTGGTTCATATGTGAATGGAGAGCTGACAATCCCCTTGGAGGA
TGACGCTAATTTGAAATTTCAATTGTCAAAGGAAGCAGATAGGGACTTTGTAACAAGTCTTG
TTTCACTCACCCATAAGATTCAAAGAGCAATGGAGAAGCACCAAGATTTGTCTGGAGCTGTG
CACCATCCATCTGAGCTAATTTCTGGAAAATTTGATGGCCTTAAGGCTCTCAAAGAGCAATA
TGGAGCAGAAGGTGTTGTGGAAGGAGCTAAATGTTTTAGTATTGTGATGTCCAAGATGTTTG
ATTCCTTAAGTGAAGCCTATAAAGGTCAAATGTTGGAGTCATTGTCTGCAATGAAACACCT
TCAGTAGCTGAGCTATTATTGACGTTGTTTTCACTTCTCAACCATCTGCCCGCTGGCTGGA
GGAAACACAACTTCACCCAATCAACTGCTGTTGAAGAAGTTATATTGGTTAGACGAACTG
TTGCATGGATTACAGGACTCTTGCTTATAATTGCCACTCTATTAGGAATCTACTTTCTCCTG
CGCC

Sequenz cDNA-Fragment XopB-Beuteprotein 27 (BIP27) JAB:

GCGGAAAACCTCTGCGTCCGATGCAATATTCCACTATGACGATGCGGCACAGACTAAGTTCCA
GCGGGAGAAGCCGTGGACGAGTGACCCTCACTACTTCAAGCGCGTGAAGATCTCTGCTCTTG
CTCTTCTAAAGATGGTTGTTACGCGCGTCTGAGAGTACAATTGAGGTAATGGGACTAATG
CAAGGTAAGACGGATGGAGATGCTATTATTGTTATGGACGCTTTTTGCCCTTCCAGTTGAAGG
AACTGAACTAGGGTTAATGCTCAAGCTGATGCGTATGAATACATGGTTGAATATTCACAGA
CCAACAAGCAGGCTGGTCCGCTGGAGAATGTGGTCCGATGGTATCATTTCTCATCTGGCTAT
GGATGCTGGCTCTCTGGCATTGATGTAACACTACACAAATGCTTAACCAGCAGTATCAGGAGCC
CTTTCTTGCAGTTGTTATTGATCCAACAAGAAGTGTCTGCTGGAAAAGTTGAGATTGGTG
CCTTTCGAACATATCCTGAAGGATATAAGCCTCCAGATGACCCTATCTCAGAGTACCAGACC
ATTCCTTTGAACAAAATTGAAGACTTCGGAGTACATTGCAAGCAGTATTATTATTGATAT
TACCTATTTCAAGTCCTCTCTCGATTGCCATCTCTTGACCTACTATGGAACAAGTATTGGGT
GAACACACTTTCTCTCTCTTTGCTTGGAAATGGAGACTATGTGCTGGACAGATATCTGATC
TGCTGAAAGTGGAGCAAGCTGAAATCAGCTGTCCATTACGTTTGGGCACTAGTGGCAGCCC
TCAAAGGAAGAGAGAAGAA

Sequenz cDNA-Fragment XopB-Beuteprotein 30 (BIP30):

GGCAAAGACTCTACTAAAGCTGCACAAGTGAAGAACAACCAAGCAGCAGCCTTCAAAGAT
TGGAAGCACTCCTAGGACCCGGAATTTCTGTAAACAAAATTGCTGCAGCTGCGAAATCTATAT
CACCAAAAAGTGGAGGTCGTACCACAAAAGAGAACTTCAAAGCCTGCTAAGCCAGAACCA
AATAAGGCTAAGGTGATGAAAAGACAGGGAAAGAGATCTGCTCAAGGAGAAGGGCCTGTCTGA
TGCCTGTATTTTCAAGAGAAAGTCCGGAAGAAGATAAGGAAAATCTGGTAAGGGGCACAAATA
TGGTTTTCTCATTTTGTATGAGTTGAATTTCTACCTTTTTATTGCATTTTGGTTGTACTGACTG
CTATAAGTTACAGGATGCTCCACAAACAGAAGTGATTAGCACCTGAAGTTTTTGGCAGGAAG
CTTTTGAATCATATCAGAGGCCAAGGTGGAAGTATTTGAATCTGGAGTGTGCATTTCAATT
TTGGATTTGGTTTGTTCATTTGTTTATTCTTAATTTTTTAAAAGAAAATACCGAACCATT
ATACAGTTGTGTCTAGCCTGTTTCTGATTTGGAATTCATGCAAGACGTACAGTGCCTTTCTTTT
TACTCAACAGCTTCTATGCGCTTGCAGTTGAATATTACTTGAAGTAATTATACCTG

A3

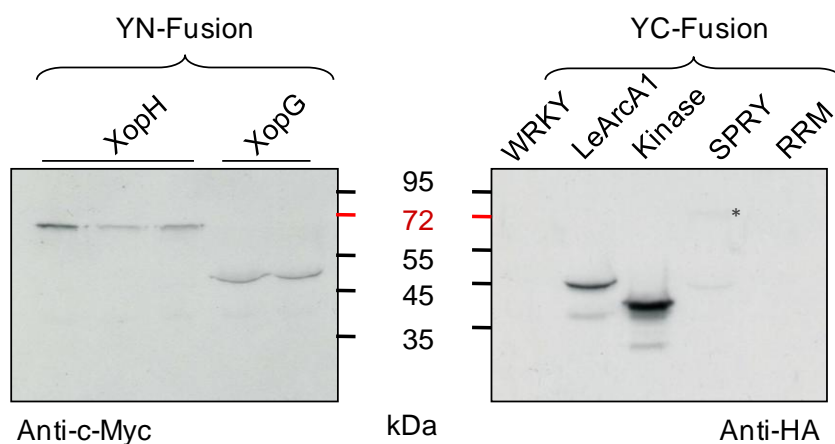


Abbildung A3: Expression der YN- und YC-Fusionen von XopH und Interaktoren in der Pflanze, jedoch keine Interaktion durch Nutzung von BiFC nachweisbar. XopH fusioniert mit der N-terminalen Hälfte von YFP wurde mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* koexprimiert mit jeweils einem Interaktor (WRKY1, LeArcA1, Kinase) fusioniert an die C-terminale Hälfte von YFP. 2 dpi wurden Blattscheiben geerntet und Proteine isoliert, bzw. mikroskopische Analysen durchgeführt (Daten nicht gezeigt) Mit Ausnahme von WRKY1 waren alle Proteine durch Immunoblotting unter Nutzung eines c-myc oder HA-Antikörpers nachweisbar. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt. Der Effektor, XopG, mit 2 interagierenden Proteinen SPRY und RRM diene als Positivkontrolle. Eine Interaktion konnte hier beobachtet werden (3.3.12), jedoch war das RRM-Protein im Westernblot nicht nachweisbar.

	Bezeichnung	Phytohormongehalt (pmol/g)		
		SA	IAA	ACC
1. Experiment (junge Pflanzen)	Medium 18 hpi-1	171	108	1025
	Agro 18 hpi-1	221	83	2007
	XopB 18 hpi-1	172	62	1258
	XopJ+Agro 18 hpi-1	195	88	1433
	XopJ+XopB 18 hpi-1	167	98	2135
	Medium 24 hpi-1	395	50	115
	Agro 24 hpi-1	2930	49	766
	XopB 24 hpi-1	241	53	383
	XopJ+Agro 24 hpi-1	1342	34	2502
	XopJ+XopB 24 hpi-1	536	53	305
2. Experiment (ältere Pflanzen)	Medium 18 hpi-2	180	61	270
	Agro 18 hpi-2	183	59	1068
	XopB 18 hpi-2	231	57	703
	XopJ+Agro 18 hpi-2	173	65	945
	XopJ+XopB 18 hpi-2	190	57	1069
	Medium 24 hpi-2	145	33	0
	Agro 24 hpi-2	518	40	248
	XopB 24 hpi-2	278	41	133
	XopJ+Agro 24 hpi-2	473	35	1888
	XopJ+XopB 24 hpi-2	187	37	157
3. Experiment (junge Pflanzen)	Medium 18 hpi-3	180	52	309
	Agro 18 hpi-3	203	44	1206
	XopB 18 hpi-3	282	62	1001
	XopJ+Agro 18 hpi-3	324	56	1008
	XopJ+XopB 18 hpi-3	271	42	1064
	Medium 24 hpi-3	388	26	140
	Agro 24 hpi-3	1560	35	484
	XopB 24 hpi-3	268	37	131
	XopJ+Agro 24 hpi-3	1295	40	3390
	XopJ+XopB 24 hpi-3	567	36	335

Abbildung A4: Meßwerte Phytohormonmessungen. Ergänzend zu Abbildung 33 sind hier alle Messungen der 3 Experimente aufgeführt. Bei Experiment 2 fallen die Änderungen der Phytohormone weniger stark aus, mutmaßlich weil hier ältere *N. benthamiana*-Pflanzen genutzt wurden. Aus diesem Grund wurden für Experiment 3 wieder jüngere Pflanzen gewählt. Alle Messungen ergeben sich aus Pflanzenmaterial, das von jeweils 3 Pflanzen gepoolt wurde.

Danksagung

Ich danke Frau Prof Dr. Ulla Bonas für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieses spannenden Themas, für ihre Betreuung, fachlichen Diskussionen und ihr reges Interesse am Voranschreiten der Experimente. Darüber hinaus danke ich ihr für die Begutachtung der Arbeit.

Für das gute Klima im Laboralltag und in den Pausen möchte ich mich bei Christian (B), Dirk, Matthias, Steve, Maria, Frank, Oliver, Robert, Christian (L), Monique, Thomas, Jens, Eva, Heidi, Simone, Sabine (T), Annett, Patrik sowie der gesamten AG Bonas bedanken.

Christian (B), Dirk und Binh möchte ich für ihre helfenden Hände besonders bei den vielen Hefearbeiten danken.

Ich bedanke mich bei der AG Otto Miersch, IPB Halle, insbesondere bei Birgit Ortel für die Kooperation und Durchführung der Messungen des Phytohormongehaltes in Blättern.

Bei Carola und Marina für ihre Unterstützung im Laboralltag, sowie bei Bianca für die Anzucht und Pflege der Pflanzen sowie spontane Hilfe bei größeren Vorhaben.

Mein besonderer Dank gilt Sebastian Schornack, Thomas Lahaye, Jens Boch, Ralf Koebnik und Frank Thieme für ihre Unterstützung, gute Ideen sowie motivierende Worte, auch in schweren Stunden.

Meinen Freunden Sabine (K), Anna und Jens gilt ein besonders tiefer Dank für aufmunternde Gespräche und das Glauben an das Gelingen, sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit und damit die wichtigste Motivation besonders in der Endphase des Schreibens. Robert (R) danke ich für endlose Gespräche. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft!

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen und Vorgesetzten des BVL Berlin, insbesondere Dr. Joachim Bendiek und Prof. Dr. Detlef Bartsch, für ihr Verständnis und Entgegenkommen bedanken, welche mir ermöglicht haben, meine Arbeit zu beenden.

Meinen Eltern und meinem Mann Horst Georg danke ich für ihre Liebe, ihre Geduld und für die stete Unterstützung über die letzten Jahre.

Veröffentlichungen und Poster

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, and Bonas U;
Analyses of new type III effectors from *Xanthomonas* uncover XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist*, akzeptiert Mai 2012

Krüger, A., Thieme, F., Bonas, U.

Analysis of the virulence function of the *Xanthomonas* type III effector proteins XopG and XopH. Poster, 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Deutschland (2007)

Szczesny, R., **Krüger, A.**, Egler, M., Thieme, F., and Bonas, U.

Analysis of the virulence function of the type III effector proteins from *Xanthomonas*. Poster, International Symposium "Communication in the Plants and their Response to the Environment" (2007)

Krüger A., Koebnik R., Thieme F., Urban A., Bonas U.

Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes.
Journal of Bacteriology; 2006 Nov;188(21):7652-60.

Berger, C., **Krüger, A.**, Weber, E., Koebnik, R.

Das Typ III Sekretionssystem von *Xanthomonas*. *Biospektrum*; 2006 Oktober (06)

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Antje Schonsky (geb. Krüger)
Anschrift: Kavalierstr. 5
13187 Berlin
Geburtsdatum: 01.02.1979
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

AUSBILDUNG

1991 – 1997 Gymnasium Oschersleben
1997 Abitur
1997 – 2004 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg;
Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas,
Forschungsgruppe PD Dr. Ralf Koebnik
Thema: „Molekulare Charakterisierung des HrpX-Transkriptionsaktivators
von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*“
2004 Abschluss: Diplom-Biologin
2005 – 2012 Promotion am Institut für Biologie an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas,
Thema: „Funktionale Charakterisierung neuer Effektorproteine sowie des
Effektors XopB“

Beruf

seit 01/2010 Wissenschaftliche Referentin am Bundesamt für Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit in Berlin (BVL)

Berlin, den 14.06.2012

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.

Berlin, den 14.06.2012