

**Identifizierung und Charakterisierung von dem pflanzlichen
Interaktionspartner OAS-TL des Typ-III-Effektors XopC**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Eva-Maria Herzfeld, geb. Plugge
geb. am 16. April 1979 in Haltern (Westfalen)

Zusammenfassung

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. Für die Pathogenität der Bakterien ist ein Typ-III-Sekretionssystem essentiell, welches mindestens 20 Effektoren direkt in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert. Zumindest einige dieser Effektoren tragen in suszeptiblen Pflanzen zur Virulenz des Pathogens bei. In resistenten Pflanzen können einzelne oder mehrere Effektoren auf verschiedenen Wegen des pflanzlichen Immunsystems erkannt werden, wodurch meist die hypersensitive Reaktion (HR) ausgelöst wird. Eines dieser Effektorproteine ist *XopC*, dessen Gen nur in *Xcv* und *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (*Xcm*), dem Erreger des Bakterienbrandes auf Mango, vollständig vorhanden ist. Das Protein besitzt eine vorhergesagte Phosphoribosyltransferasedomäne sowie eine vorhergesagte *haloacid dehalogenase (HAD)-like* Hydrolase-Domäne und weist außerhalb dieser Domänen keine Homologien zu beschriebenen Proteinen auf. *XopC* lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus der Pflanzenzelle. Die Abwesenheit von *xopC* im *Xcv*-Genom führte zu einer beschleunigten AvrBs1-vermittelten HR in resistenten Paprikapflanzen, wenn diese zusätzlichem Stress in Form von exogener Salizylsäure (SA) ausgesetzt waren. Dies konnte durch *xopC* jedoch nicht durch ein Derivat mit einer Mutation in der Sequenz für die vorhergesagte *HAD-like* Hydrolase-Domäne komplementiert werden. In Hefe-Dihybrid-Studien wurde ein Wirtsprotein identifiziert, mit dem *XopC* auch *in planta* interagiert. Dieser Interaktor lokalisiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle, besitzt typische Eigenschaften einer pflanzlichen, zytosolischen *O*-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) und zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* OAS-TL-Aktivität. Diese Aktivität wird durch die Zugabe von *XopC* *in vitro* gesteigert. Damit wurde erstmals eine zytoplasmatische Isoform der OAS-TL aus *Capsicum annuum* beschrieben und charakterisiert. Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) der OAS-TL *in planta* führte zum Verlust der durch die Abwesenheit von *xopC* in *Xcv* ausgelösten Beschleunigung der AvrBs1-abhängigen HR in resistenten Paprikapflanzen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Induktion der AvrBs1-vermittelten HR in resistenten Paprikapflanzen durch den Effektor *XopC* in Abhängigkeit von einer *HAD-like* Hydrolase-Domäne und in Zusammenhang mit SA-Stress verzögert wird. Diese Verzögerung wird durch den pflanzlichen Interaktionspartner OAS-TL vermittelt. Weiterhin zeigten Expressionsanalysen resistenter, mit *Xcv* infizierter Paprikapflanzen eine durch die Anwesenheit von *xopC* in *Xcv* induzierte Erhöhung der Transkriptakkumulation einer β -1,3-Glucanase. Dies lässt den Schluss zu, dass der Effektor *XopC* in verschiedene Mechanismen des pflanzlichen Metabolismus eingreift.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of bacterial spot disease on pepper and tomato. A type III secretion system, which translocates a minimum of 20 effectors into the host cell cytoplasm, is essential for the bacteria's pathogenicity. At least some of those effectors contribute to the pathogen's virulence in susceptible plants. In resistant plants one or several effectors are recognized via different mechanisms of the plant immune system, which results mostly in induction of the hypersensitive response (HR). One of those effector proteins is XopC. The complete *xopC* gene is only found in *Xcv* and *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (*Xcm*), the causal agent of bacterial canker of mango. The XopC protein exhibits a predicted phosphoribosyl transferase domain and a predicted haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase domain. Besides these two domains there is no homology of XopC to described proteins found. XopC localises to the plant cell cytoplasm and the nucleus. The absence of *xopC* in the genome of *Xcv* leads to an accelerated AvrBs1-induced HR in resistant pepper plants, if the plants are additionally stressed by exogenous application of salicylic acid (SA). This was complemented by *xopC*, but not by a *xopC* derivative carrying a mutation in the predicted HAD-like hydrolase sequence. Yeast-2-hybrid studies revealed a XopC interactor, which also interacted with XopC *in planta*. The interactor localises to the plant cell cytoplasm and carries typical features of plant cytosolic O-acetylserine (thiol)lyases (OAS-TL). It shows OAS-TL activity *in vivo* and *in vitro*. The latter one is enhanced by adding XopC. Hence, a cytosolic isoform of OAS-TL from *Capsicum annuum* was described and characterised for the first time. Virus-induced gene silencing (VIGS) of OAS-TL *in planta* abolished the acceleration of AvrBs1-mediated HR formation induced by the absence of *xopC* in *Xcv* in resistant pepper plants dependent on SA. These data suggest, that the induction of the AvrBs1-dependent HR in resistant pepper plants is SA-stress dependently delayed by XopC, which is reliant on a HAD-like hydrolase domain in XopC. This delay is mediated by the XopC plant interaction partner OAS-TL. Furthermore, expression analysis showed an increased accumulation of β -1,3-Glucanase transcript in *Xcv*-infected, resistant pepper plants by the presence of *xopC*. This indicates, that the effector protein XopC influences different mechanisms of the plant metabolism.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien	1
1.1.1 Das Typ-III-Sekretionssystem	2
1.1.2 Der Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems	4
1.1.3 Die Substrate des Typ-III-Sekretionssystems	4
1.2 Typ-III-Effektorproteine und ihre Funktionen	5
1.2.1 Identifizierung von Typ-III-Effektoren	5
1.2.2 Effektoren als Suppressoren der pflanzlichen Basalabwehr	7
1.2.3 Effektoren als Induktoren der spezifischen pflanzlichen Abwehr	9
1.2.4 Effektoren als Suppressoren der spezifischen pflanzlichen Abwehr	11
1.3 Die Gattung <i>Xanthomonas</i>	12
1.3.1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	12
1.4 Typ-III-Effektoren von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	13
1.4.1 Der Typ-III-Effektor XopC aus <i>Xcv</i>	18
1.5 Zielstellung	18
2 Material & Methoden	19
2.1 Verwendete Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide und Oligonukleotide	19
2.2 Pflanzenmaterial	28
2.3 Pflanzeninfektionsexperimente	29
2.3.1 Inokulation von Agrobakterien	29
2.3.2 Inokulation von <i>Xcv</i>	29
2.3.3 <i>electrolyte leakage</i> -Messungen	29
2.3.4 Wachstumskurven von <i>Xcv</i> <i>in planta</i>	30
2.4 Hefe-Di-Hybrid-Sichtung	30
2.4.1 Paprika-cDNA-Bibliothek	31
2.4.2 Datenbanken	31

2.5 Nukleinsäuren	32
2.5.1 RNA-Isolierung	32
2.5.2 cDNA-Synthese	32
2.5.3 Quantitative real-time PCR	32
2.6 Klonierung	32
2.6.1 Das GATEWAY-System	32
2.6.2 GoldenGate-Klonierung	33
2.6.3 Klassische Klonierung	33
2.7 Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i> (VIGS)	33
2.7.1 <i>Silencing</i> -Konstrukte	34
2.8 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.8.1 GFP-Fluoreszenzmikroskopie für Lokalisationsstudien	34
2.8.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für <i>in planta</i> - Interaktionsstudien	34
2.9 Koimmunopräzipitation (KoIP)	35
2.10 Heterologe Überexpression und Reinigung von <i>CaOAS-TL</i>	35
2.11 Heterologe Überexpression und Reinigung von <i>XopC</i> und <i>AvrBs3</i>	36
2.12 <i>OAS-TL</i> -Aktivitätsbestimmung	36
2.13 1,3- β -Glucanase-Aktivitätsbestimmung	38
2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotanalysen	38
2.15 Nicht-polare Mutagenese in <i>Xcv</i>	39
2.15.1 Deletion des <i>xopC</i> -ORFs in <i>Xcv</i> 85-10	39
2.15.2 Reintegration von <i>xopC</i> in das Genom von <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i>	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Bioinformatische Untersuchungen von <i>XopC</i>	40
3.2 <i>XopC</i> lokalisiert im Zytoplasma und im Nukleus der Pflanzenzelle	42
3.3 Verschiedene Pflanzen zeigen keine Reaktion auf die transiente Expression von <i>XopC</i>	44
3.4 Die Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> 85-10 führt zu einer beschleunigten <i>AvrBs1</i> -HR in Paprika ECW-10R	45
3.4.1 Die Mutante <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> induziert die HR in resistenten Paprikapflanzen früher als <i>Xcv</i> 85-10	49
3.4.2 <i>XopC</i> hat keinen Einfluss auf Phänotypen suszeptibler Paprika- pflanzen als Reaktion auf <i>Xcv</i>	51
3.4.3 <i>XopC</i> verzögert die Ausbildung von Krankheitssymptomen in Tomate	52

3.5 Die Deletion von <i>xopC</i> führt nicht zu einer veränderten Wachstumsrate von <i>Xcv</i>	53
3.6 XopC induziert die Expression von 1,3- β -Glucanase	54
3.7 Identifizierung von pflanzlichen XopC-Interaktoren	57
3.7.1 Hefe-Di-Hybrid-Analysen identifizieren einen XopC-Interaktor aus <i>C. annuum</i>	58
3.7.2 <i>CaOAS-TL</i> hat Homologie zu pflanzlichen, zytosolischen <i>O</i> -Acetylserin(thiol)lyasen	60
3.7.3 <i>CaOAS-TL</i> lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus	62
3.8 XopC und <i>CaOAS-TL</i> interagieren <i>in planta</i>	63
3.8.1 Koimmunopräzipitationsanalysen zeigen eine Interaktion von XopC und <i>CaOAS-TL</i>	63
3.8.2 XopC und <i>CaOAS-TL</i> interagieren in BiFC-Analysen	65
3.9 Charakterisierung der <i>CaOAS-TL</i>	67
3.9.1 <i>CaOAS-TL</i> hat <i>in vitro</i> -Aktivität	67
3.9.2 <i>CaOAS-TL</i> zeigt <i>in vivo</i> -Aktivität	68
3.10 XopC, jedoch nicht XopC _{D693A} , fördert die Aktivität der <i>CaOAS-TL in vitro</i>	70
3.11 Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i> der <i>CaOAS-TL</i> in ECW-10R supprimiert die XopC-abhängige Verzögerung der AvrBs1-vermittelten HR von Paprika ECW-10R	72
4 Diskussion	
4.1 Die Anwesenheit von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> 85-10 verzögert die AvrBs1-vermittelte HR in <i>C. annuum</i> in Abhängigkeit von SA-Stress	75
4.1.1 Der XopC-Virulenzeffekt in Paprika hängt von einer zytosolischen OAS-TL ab	79
4.1.2 Der XopC-Virulenzeffekt hängt von einer potenziellen <i>HAD-like</i> Hydrolase-Domäne ab	85
4.2 XopC moduliert die pflanzliche Abwehr durch die Induktion der Expression von 1,3- β -Glucanase	87
Literaturverzeichnis	90
Danksagung	
Anhang	
Lebenslauf	
Erklärung	

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung des Typ-III-Sekretionssystems pflanzenpathogener Bakterien.	3
Abbildung 1.2	Rolle von PAMPs und Effektoren in Zusammenhang mit der Abwehrreaktion von Pflanzen.	10
Abbildung 1.3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate.	13
Abbildung 2.1	Schema der Reinigung von CaOAS-TL.	36
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung der OAS-TL-Aktivitätsbestimmung.	37
Abbildung 3.1	XopC lässt sich auf <i>HAD-like</i> Hydrolasen modellieren.	40
Abbildung 3.2	XopC hat Homologe in <i>Xanthomonas</i> spp., <i>R. solanacearum</i> und <i>T. vaginalis</i> .	42
Abbildung 3.3	XopC lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus von <i>N. benthamiana</i> .	43
Abbildung 3.4	XopC-cMyc-Fusionsproteine werden synthetisiert.	44
Abbildung 3.5	<i>N. benthamiana</i> , Paprika ECW und <i>N. tabacum</i> reagieren nicht auf die Inokulation von <i>Agrobacterium</i> -Stämme mit den XopC-c-Myc-Fusionskonstrukten.	45
Abbildung 3.6	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> ₅₄₁ löst die HR in Blätter von Paprika ECW-10R früher aus als <i>Xcv</i> 85-10.	46
Abbildung 3.7	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> #1, 8, 11 und 13 (rechts) lösen die HR in Blätter von Paprika ECW-10R früher aus als <i>Xcv</i> 85-10 (links).	47
Abbildung 3.8	Schematische Darstellung der relevanten Bereiche des <i>Xcv</i> 85-10-Genoms und der generierten Derivate.	48
Abbildung 3.9	XopC::c-Myc wird in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i>) und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i> _{D693A}), jedoch nicht in 85-10, <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> synthetisiert.	48
Abbildung 3.10	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i> _{D693A}) lösen die HR in Blättern von Paprika ECW-10R früher aus als <i>Xcv</i> 85-10 und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i>).	49
Abbildung 3.11	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i> _{D693A}), nicht jedoch <i>Xcv</i> 85-10 und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i>) führen 13 hpi in Blättern von Paprika ECW-10R zu einem beginnenden Gewebekollaps.	50
Abbildung 3.12	Die Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> 85-10 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung von Krankheitssymptomen in Blättern von suszeptiblen Paprika ECW.	52
Abbildung 3.13	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i> _{D693A}) lösen Krankheitssymptome in Blättern von Tomate MoneyMaker früher aus als <i>Xcv</i> 85-10 und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> (<i>xopC</i>).	52
Abbildung 3.14	<i>Xcv</i> 85-10 und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> zeigen keinen Wachstumsunterschied <i>in vitro</i> .	53
Abbildung 3.15	<i>Xcv</i> 85-10 und <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> zeigen keinen Wachstumsunterschied <i>in planta</i> .	54

Abbildung 3.16	1,3- <i>B-Glucanase</i> -Transkripte akkumulieren 4 hpi von Paprika ECW-10R-Pflanzen mit <i>Xcv</i> 85-10, jedoch nicht nach Inokulation mit <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> .	56
Abbildung 3.17	Die 1,3- <i>B-Glucanase</i> -Aktivität in Proteinextrakten aus Paprika ECW-10R-Blättern 6 hpi mit <i>Xcv</i> 85-10 ist höher als 6 hpi mit <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopC</i> .	57
Abbildung 3.18	Schematische Darstellung der Fragmente der in der Hefe-Dihibrid-Sichtung gefundenen Beuteplasmide im Verhältnis zu <i>cacn7895</i> und dem ORF.	58
Abbildung 3.19	Die Interaktion von <i>XopC</i> und <i>CaOAS-TL</i> in Hefe ist spezifisch.	59
Abbildung 3.20	<i>CaOAS-TL</i> hat typische Eigenschaften von <i>OAS-TLs</i> .	61
Abbildung 3.21	<i>CaOAS-TL</i> lässt sich auf eine <i>OAS-TL</i> modellieren.	61
Abbildung 3.22	<i>CaOAS-TL</i> lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus von <i>N. benthamiana</i> .	63
Abbildung 3.23	<i>XopC</i> und <i>CaOAS-TL</i> koimmunopräzipitieren.	64
Abbildung 3.24	<i>XopC</i> und <i>CaOAS-TL</i> interagieren in BiFC-Analysen.	65
Abbildung 3.25	Nachweis der in der BiFC verwendeten Proteine.	66
Abbildung 3.26	Verifizierung der Reinheit und Identität von rekombinanter <i>CaOAS-TL</i> und <i>AtSAT5</i> .	68
Abbildung 3.27	<i>CaOAS-TL</i> hat <i>in vivo</i> -Aktivität.	69
Abbildung 3.28	Verifizierung der Reinheit und Identität von rekombinantem <i>XopC</i> und <i>AvrBs3</i> .	70
Abbildung 3.29	<i>XopC</i> , jedoch nicht <i>XopC</i> _{D693A} , fördert die Aktivität der <i>CaOAS-TL in vitro</i> .	71
Abbildung 3.30	<i>CaOAS-TL</i> ist für die <i>XopC</i> -abhängige Verzögerung der <i>AvrBs1</i> -vermittelten HR erforderlich.	73
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung des CSC.	80
Abbildung 4.2	Modell für die Abläufe bei Inokulation mit <i>Xcv</i> .	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	Typ-III-Effektoren aus <i>Xcv</i> und ihre (potenzielle) biologische Funktion.	13
Tabelle 2.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.	19
Tabelle 2.2	Verwendete <i>A. tumefaciens</i> -Stämme.	21
Tabelle 2.3	Verwendete <i>Xcv</i> -Stämme.	22
Tabelle 2.4	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.	23
Tabelle 2.5	Verwendete Plasmide.	23
Tabelle 2.6	Verwendete Oligonukleotide.	27
Tabelle 2.7	Verwendete Antikörper.	38
Tabelle 3.1	Pflanzliche, zytosolische OAS-TLs sind hochkonserviert.	60
Tabelle 3.2	Katalytische Konstanten verschiedener OAS-TLs.	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
<i>avr</i> , Avr	Avirulenz
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
cv.	Kultivar
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post inoculation</i> , Tage nach Inokulation
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> , und andere
ETI	<i>effector triggered immunity</i>
ECW	<i>Early Californian Wonder</i> , Kultivar von <i>Capsicum annuum</i>
(e)GFP	(<i>enhanced</i>) grün-fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HAD	<i>haloacid dehalogenase</i>
<i>hop</i> , Hop	<i>hrp outer protein</i>
<i>hpa</i> , Hpa	hrp-assoziiert
hpi	<i>hours post inoculation</i> , Stunden nach Inokulation
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i> , Hrc	hrp-konserviert
<i>hrp</i> , Hrp	Hypersensitive Reaktion und Pathogenität
IS	<i>insertion sequence</i>
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonien-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
OAS	O-Acetylserin
OAS-TL	O-Acetylserin(thiol)lyase
ORF	offenes Leseraster
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	<i>pathogenesis related</i>
PTI	<i>pathogen triggered immunity</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

pv.	Pathovar
R, R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SA	Salizylsäure
(SDS)-PAGE	(Natriumdodecyl)-Polyacrylamidgelelektrophorese
spp.	Subspezies
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TAT	<i>twin arginine translocation</i>
VIGS	Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i>
<i>xop</i> , Xop	<i>Xanthomonas outer protein</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Der Anbau von Nutzpflanzen ist essentiell, um das Überleben der Menschheit zu gewährleisten. Dabei sind die Pflanzen in ihrer natürlichen Umgebung mit einer Vielzahl von abiotischem, z. B. Trockenheit oder Lichtmangel, und biotischem Stress, z. B. pflanzenpathogenen Organismen wie Insekten, Nematoden, Pilzen, Viren und Bakterien, konfrontiert. Diese Organismen leben und vermehren sich auf Kosten ihres Wirtes und lösen häufig Krankheitssymptome bei den Pflanzen aus. Daher kommt es speziell bei den Nutzpflanzen immer wieder zu Ernteausschlägen, was zu Versorgungsengpässen bezüglich der Ernährung führen kann (www.fao.org).

Die meisten Pflanzen sind Nicht-Wirte für die meisten Pathogenen, so dass die erfolgreiche Infektion von Pflanzen durch Pathogene die Ausnahme darstellt. Da das Abwehrsystem der Pflanze unterwandert werden muss, gelingt die Besiedlung nur wenigen, hochspezialisierten Pathogenen.

Pflanzenpathogene Bakterien spielen bei der Infektion von Pflanzen eine große Rolle. Sie können Welke, Fäule und Nekrosen auslösen. Unter den pflanzenpathogenen Bakterien findet man beispielsweise Subspezies von *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xylella*, *Ralstonia* und *Xanthomonas*, welche zu den Gram-negativen Bakterien zählen, aber auch Gram-positive Bakterien wie *Clavibacter* (Agrios, 2005).

1.1 Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien

Pflanzen sind gegenüber verschiedenen, nicht-phytopathogenen Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli*, resistent, da sie Basalabwehrmechanismen besitzen, durch die mikrobielle Moleküle erkannt werden, was meist zu einem programmierten Zelltod der infizierten Pflanzenteile führt (PTI siehe 1.2.2; Gómez-Gómez & Boller, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004). Um die Besiedlung von Pflanzen zu ermöglichen, besitzen Gram-negative, pflanzenpathogene Bakterien Virulenzfaktoren. Zu den Virulenzfaktoren zählen Lipopolysaccharide (LPS), Exopolysaccharide (EPS), extrazelluläre Enzyme und Adhäsine (Kao *et al.*, 1992; Dow *et al.*, 1995; Alfano & Collmer, 1996; Newman *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002).

EPS umhüllen die Bakterien, was diese vor dem Austrocknen und dem Kontakt mit Stoffen schützt, die von der Pflanze zu Abwehrzwecken sekretiert werden. Weiterhin ermöglichen

EPS die Anreicherung von Nährstoffen und erleichtern zusammen mit Adhäsinen die Anheftung an die Wirtszelle. EPS und Adhäsine fördern die Bildung von Biofilmen, bei denen es sich um Aggregationen von Bakterien untereinander handelt (Coplin & Cook, 1990; Kao *et al.*, 1992; Dharmapuri & Sonti, 1999; Ray *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002). Biofilme sind in der Lage, die Resistenz von Bakterien gegenüber verschiedenen Faktoren signifikant zu erhöhen (Bryers 1993; Costerton *et al.*, 1994). Bei den von den Bakterien zum Zweck der erfolgreichen Infektion des Wirtes sekretierten Enzymen handelt es sich beispielsweise um Zellwand-abbauende Zellulasen, Xylanasen und Polygalacturonasen (Alfano & Collmer, 1997; Thanassi & Hultgren, 2000).

Wie alle anderen Bakterien nutzen auch phytopathogene Bakterien spezielle Sekretionssysteme zur Sekretion von Proteinen und anderen Substanzen. Diese Sekretionssysteme werden auch von human- und animalpathogenen Bakterien genutzt. Gram-negative Bakterien besitzen mindestens sechs verschiedene Sekretionssysteme, die teilweise gut charakterisiert sind (Kostakioti *et al.*, 2005). Das Typ-I-Sekretionssystem sekretiert Proteasen, Lipasen und Toxine (Binet *et al.*, 1997; Delepelaire, 2004; Holland *et al.*, 2005). Über das Typ-II-Sekretionssystem werden neben Toxinen auch hydrolytische Enzyme sekretiert (Sandkvist, 2001; Johnson *et al.*, 2006). Das Typ-III-Sekretionssystem dient der Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle (Alfano & Collmer, 1997; Tampakaki *et al.*, 2004). Der Transport von DNA findet beispielsweise in *Agrobacterium* spp. über das Typ-IV-Sekretionssystem statt, welche auch in der Lage ist, Proteine zu transportieren (Cascales & Christie, 2003).

1.1.1 Das Typ-III-Sekretionssystem

In der Majorität der Gram-negativen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien ist das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ein essentieller Pathogenitätsfaktor (He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). Die Sekretion von Proteinen über das T3SS erfolgt unabhängig von Zwischenstufen oder Prozessierungen, wie man sie beispielsweise beim TAT-abhängigen Proteintransport kennt, direkt in das Zytoplasma oder den Apoplasten der Wirtszellen (Heesemann *et al.*, 1984; Natale *et al.*, 2008). Erstmals wurde die Typ-III-abhängige Proteinsekretion für *Yersinia enterocolitica* beschrieben (Michiels *et al.*, 1991).

Durch die Untersuchung nicht-pathogener *Pseudomonas syringae* wurde das T3SS Mitte der 1980er Jahre isoliert (Niepold *et al.*, 1985; Lindgren *et al.*, 1986), seine Funktion jedoch erst in der 1990er Jahren in *Yersinia* spp. identifiziert (Michiels *et al.*, 1991). Bakterien,

welche Mutationen in den sogenannten *hrp*-Genen (hypersensitive Reaktion und Pathogenität) tragen, lösen keine Abwehrreaktionen in resistenten Wirts- bzw. Nicht-Wirtspflanzen aus, rufen keine Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen hervor und können in Pflanzen nicht effizient wachsen (Lindgren *et al.*, 1986; Bonas *et al.*, 1991). Die *hrp*-Gene phytopathogener Bakterien werden im *hrp*-Gen-Cluster kodiert (Alfano & Collmer, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). Von den 25 kodierten Hrp-Proteinen, die auf acht Transkriptionseinheiten verteilt sind, sind elf in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und bilden wahrscheinlich den Basalapparat (Bogdanove *et al.*, 1996; He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). Sie werden daher auch als Hrc-Proteine (*Hrp conserved*) bezeichnet. HrpG und HrpX, welche nicht im *hrp*-Gencluster kodiert sind, spielen eine Rolle bei der Regulation der *hrp*-Gene. Dabei ist HrpG der übergeordnete Transkriptionsfaktor und besitzt Homologie zu Regulatoren der OmpR-Familie (Wengelnik *et al.*, 1996). Durch HrpG wird die Expression von *hrpA* und *hrpX* induziert. Letzteres kodiert einen Transkriptionsaktivator der AraC-Familie und reguliert die Gene der Operone im Bereich zwischen *hrpF* und *hrpB* positiv (Wengelnik & Bonas, 1996).

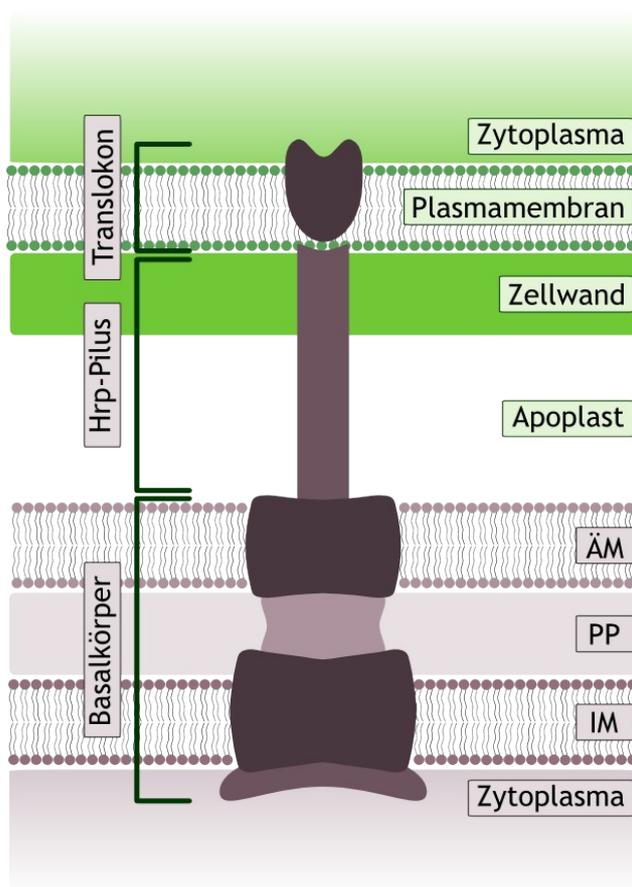


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Typ-III-Sekretionssystems pflanzenpathogener Bakterien.
 Der Basalkörper, der beide bakteriellen Membranen durchspannt, wird von den Hrc-Proteinen gebildet. Der Hrp-Pilus, welcher die pflanzliche Zellwand penetriert, hat eine Länge von ca. 200 bis 500 nm. Das T3S-Translokon inseriert vermutlich als kanalähnlicher Proteinkomplex in die pflanzliche Plasmamembran.
 ÄM, äußere, bakterielle Membran; PP, Periplasma; IM, innere, bakterielle Membran

1.1.2 Der Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems

Die Struktur des T3SS lässt sich grob in den Basalapparat, den Hrp-Pilus und das Translokon, unterteilen (Abb. 1.1; Büttner & He, 2009). Der Basalapparat besteht aus mehreren Proteinen und durchspannt die innere und äußere Membran der Bakterien (Tampakaki *et al.*, 2004). Teile dieses Apparates sind beispielsweise HrcN, welches auf Grund seiner Homologie zu β -Untereinheit von F_1F_0 -ATPasen vermutlich zur Energetisierung der Sekretion beiträgt (Minamino & MacNab, 2000; Zhu *et al.*, 2002; Claret *et al.*, 2003; Pozidis *et al.*, 2003; Savvides *et al.*, 2003), und HrcC, welches zur Familie der Sekretine gehört, die homooligomere, ringförmige Strukturen aus 12 bis 14 Molekülen und dadurch Poren in der Membran bilden (Koster *et al.*, 1997; Burghout *et al.*, 2004). Der Basalapparat ist bei pflanzenpathogenen Bakterien mit dem extrazellulären Hrp-Pilus assoziiert, bei dem es sich um eine Art Kanal handelt, den Proteine vermutlich in ungefaltetem Zustand passieren können (Koebnik, 2001; He *et al.*, 2004). Über das Translokon, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Pore in der pflanzlichen Plasmamembran handelt, gelangen die Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle (Büttner & Bonas, 2002 & 2010).

1.1.3 Die Substrate des Typ-III-Sekretionssystems

Substrate des Typ-III-Sekretionssystems sind extrazelluläre Proteine. Zu ihnen gehören einige Komponenten des T3SS und Typ-III-Effektorproteine. Die Translokon- und Hrp-Pilus-Proteine werden nicht in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert. Typ-III-Effektorproteine hingegen durchlaufen nach der Sekretion über das T3SS die Translokation in das Zytoplasma der Wirtszelle (Alfano & Collmer, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass globale Typ-III-Sekretionschaperone wie z. B. HpaB (*hrp associated*) in *Xanthomonas* spp. mehrere verschiedene Typ-III-Substrate binden können (Büttner *et al.*, 2003 & 2006) und vermutlich zu deren Rekrutierung durch das T3SS beitragen, wobei die Substrate stabilisiert und in partiell ungefaltetem Zustand gehalten werden (Stebbins & Galan, 2001; Gaudriault *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2004; Losada & Hutcheson, 2005). Da HpaB nicht bei allen Effektoren gleichermaßen zu deren Translokation beiträgt, wurden diese auf Grundlage ihrer Abhängigkeit von HpaB in der Translokation in zwei Klassen eingestuft. Effektoren der Klasse A (z. B. XopF1, XopJ) werden in *hpaB*-Deletionsmutaten nicht mehr nachweisbar transloziert. Die Translokation von Effektorproteinen der Klasse B ist jedoch auch bei fehlendem HpaB nachweisbar, wenn auch in deutlich geringerem Maße (Büttner *et al.*, 2006). Weiterhin gibt es spezifische Typ-

III-Sekretionschaperone, welche an einzelne Effektoren oder Translokonproteine binden können (Badel *et al.*, 2003; Parsot *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2004; Wehling *et al.*, 2004; Büttner & Bonas, 2006).

Das Typ-III-Sekretionssignal ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass es sich in den N-Termini der Substrate befindet (Mudgett *et al.*, 2000; Schechter *et al.*, 2004). Anhaltspunkte hierfür sind die Existenz fünf hydrophiler AS-Reste, die Absenz saurer AS-Reste innerhalb der ersten zwölf AS sowie die Akkumulation von Serinen und Glycinen, wobei keine Consensus-Sequenz vorhanden ist (He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). 1997 und 1999 wurde von Anderson & Schneewind auch ein T3S-Sekretionssignal in der mRNA diskutiert.

1.2 Typ-III-Effektorproteine und ihre Funktionen

1.2.1 Identifizierung von Typ-III-Effektoren

Als Effektorproteine, auch Effektoren genannt, werden T3SS-Substrate bezeichnet, deren Wirkungsort sich innerhalb der Wirtszelle befindet (Cornelis & van Gijsegem, 2000). Bei den ersten identifizierten Effektoren handelte es sich um Avirulenzproteine (Avr), welche in resistenten Pflanzen eine hypersensitive Reaktion (HR) auslösen (Staskawicz *et al.*, 1984; Ronald & Staskawicz, 1988). Bei der HR handelt es sich um einen lokalen, programmierten und schnellen Zelltod, welcher dazu führt, dass den pflanzenpathogenen Bakterien die Lebensgrundlage entzogen wird und so eine weitere Ausbreitung in der Pflanze ausbleibt. Während der HR kommt es unter anderem zu einer gesteigerten Synthese von Proteasen und Nukleasen, welche Nukleinsäuren und Proteine hydrolytisch spalten. Weiterhin kommt es zum einem vermehrtem Ionenflux und zu einer Erhöhung der Konzentration von reaktiven Oxigen-Spezies (ROS) sowie zur Synthese von Stickstoffmonoxid (Mur *et al.*, 2008; Yoshioka *et al.*, 2009; Nanda *et al.*, 2010).

Effektoren mit Avirulenzfunktion tragen somit zur Wirtsspezifität bei (Staskawicz *et al.*, 1984; Swanson *et al.*, 1988) und wirken zum Teil in suszeptiblen Pflanzen als Effektoren mit Virulenzfunktion (Ritter & Dangl, 1995; Bai *et al.*, 2000; Gürlebeck *et al.*, 2009).

Die Identifizierung von Effektorproteinen, welche eine Avr-Funktion besitzen, ist verhältnismäßig einfach. Die Erlangung von Kenntnissen über Effektoren ohne Avr-Funktion gestaltet sich komplizierter. Dies liegt hauptsächlich daran, dass viele Effektoren keine erkennbare Relevanz für die Virulenz des Bakteriums haben und somit keinen erkennbaren

Phänotyp verursachen (Swarup *et al.*, 1991; Ritter & Dangl, 1995; Bai *et al.*, 2000; Wichmann & Bergelson, 2004; Yang & White, 2004; Angot *et al.*, 2006).

Eine Möglichkeit, dennoch Effektoren zu identifizieren, ist ihre häufige Koregulation mit dem T3SS. Alle bisher identifizierten Typ-III-Effektoren aus *Pseudomonas* werden mit dem T3SS koreguliert. *Xanthomonas* besitzt hingegen einige Effektoren, zum Beispiel AvrBs1 und AvrBs3, welche konstitutiv exprimiert werden (Knoop *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 1994; Escolar *et al.*, 2001; Noël *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005).

Die Sequenzen vieler bekannter Typ-III-Effektorgene besitzen typische Merkmale, zu denen ein geringerer GC-Gehalt als das restliche bakterielle Genom, flankierende mobile Elemente, die Existenz eukaryotischer Motive in den kodierten Proteinen oder eine PIP-Box (*plant inducible promoter*) im korrespondierenden Promotor gehören (Noël *et al.*, 2001; Collmer *et al.*, 2002; Büttner *et al.*, 2003; Greenberg & Vinatzer, 2003; Dobrindt *et al.*, 2004; Koebnik *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011).

Durch bakterielle Genomprojekte und die damit verbundenen vollständigen Sequenzierungen dieser Genome werden bioinformatische Analysen ermöglicht, mit denen spezifisch nach typischen Motiven von Effektorproteinen gesucht werden kann (Da Silva *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2004; Thieme *et al.*, 2005; Guo, 2009). Dabei werden die Merkmale bekannter Effektoren als Suchkriterien eingesetzt, wozu in *Xanthomonas* die von den globalen Regulatoren HrpG- und HrpX-abhängige Expression gehört (Wengelnik *et al.*, 1996; Koebnik *et al.*, 2006).

Effektoren werden auch als *outer protein* bezeichnet, z. B. *Yersinia outer protein* (Yop) für Effektoren aus *Yersinia*. Effektoren aus *Xanthomonas* werden als *Xanthomonas outer protein* (Xop), solche aus *Pseudomonas* als *Hrp outer proteins* (Hop) und die aus *Ralstonia* nach der alten Systematik als *Pseudomonas outer protein* (Pop) bezeichnet, wobei Ausnahmen existieren (z. B. AvrBs3), welche jedoch meist historisch bedingt sind (Alfano & Collmer, 1997; Noël *et al.*, 2001; Lindeberg *et al.*, 2005).

Über die Anzahl der Effektorproteine verschiedener Bakterien gibt es meist keine exakten Daten. Es wird aber davon ausgegangen, dass *Xanthomonas* und *Pseudomonas* etwa 20 bis 35 Effektorproteine T3SS-abhängig in die Wirtszelle translozieren, bei *Ralstonia* werden über 40 Effektoren angenommen (Cunnac *et al.*, 2004; Ghosh, 2004; Thieme *et al.*, 2005; Lindeberg *et al.*, 2006, Mukaihara & Tamura, 2009; Büttner & Bonas, 2010). Studien bezüglich der Funktion einzelner Effektoren gestalten sich häufig schwierig, da das Zusammenspiel mehrerer Effektoren oder deren Funktionsredundanz dazu führen, dass

Mutationsanalysen einzelner Effektoren nicht aussagekräftig sind (Alfano & Collmer 2004; Wichmann & Bergelson, 2004; Kunkel & Chen, 2006; Hann *et al.*, 2010). Mutmaßlich zentrale Funktionen von Effektorproteinen sind die Gewinnung von Nährstoffen aus den Pflanzenzellen und die Suppression der pflanzlichen Abwehrmechanismen zum Vorteil der Bakterien im Interzellularraum (Alfano & Collmer, 2004; Jones & Dangl, 2006).

1.2.2 Effektoren als Suppressoren der pflanzlichen Basalabwehr

Pflanzen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen. Obwohl sie kein flexibles Immunsystem wie zum Beispiel Tiere besitzen, sind alle Zellen des pflanzlichen Organismus' in der Lage, Pathogene zu erkennen (Dangl & Jones, 2001; Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006). Die erste Barriere für Pathogene stellen physikalische Hindernisse wie die Kutikula, Haare oder auch die Zellwand dar, welche die Invasion der Erreger verhindern. Eine wichtige Rahmenbedingung für das Immunsystem der Pflanze in der Verteidigung gegen Pathogene ist die Basalabwehr (Nürnberger *et al.*, 2004). Desweiteren stehen induzierbare Abwehrmechanismen zur Verfügung.

Eine induzierbare Abwehrreaktion ist die sogenannte *PAMP-triggered immunity* (PTI). Dabei werden PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), MAMP (*microbe-associated molecular patterns*) oder DAMP (*damage associated molecular patterns*) von extrazellulären Rezeptoren der Pflanzenzelle erkannt (Nürnberger *et al.*, 2004; Nürnberger & Kemmerling, 2006; Bittel & Robatzek, 2007). PAMP sind konservierte Strukturen der Pathogene wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS), Glukane oder der Elongationsfaktor EF-Tu (Postel & Kemmerling, 2009; Zipfel, 2009). Der bekannteste Vertreter der PAMP ist flg22, ein sehr gut untersuchtes, 22 Aminosäuren (As) großes Peptid aus dem Flagellin des Flagellums (Zipfel & Felix, 2005). Strukturen einiger bakterieller Flagellae werden von der Pflanze als fremd erkannt (Gómez-Gómez & Boller, 2002) und von der Rezeptorkinase FLS2 perzipiert (Zipfel & Felix, 2005). FLS2 besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne mit Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin rich repeat*, LRR), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne (Bittel & Robatzek, 2007). In *fls2* mutierte *Arabidopsis thaliana* sind empfindlicher gegenüber der Exposition mit flg22 oder *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Zipfel *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006).

Wurde durch die Pflanzenzelle ein Signal perzipiert, wird dieses über verschiedene Mechanismen weitergeleitet. Dies kann über die Bildung von Stickstoffmonoxid, reaktiven

Oxigenspezies (ROS), Salizylsäure (SA) oder Ethylen, aber auch über Kalziumfluxe geschehen (Greenberg, 1997; Fritig *et al.*, 1998; Nürnberger & Scheel, 2001; Bittel & Robatzek, 2007). Die am häufigsten vorkommenden Signalweiterleitungen sind allerdings von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalkaskaden und/oder WRKY-Transkriptionsfaktoren abhängig (Greenberg *et al.*, 1994; Eulgem *et al.*, 1999; Nürnberger & Scheel, 2001; Zhang & Klessig, 2001; Asai *et al.*, 2002; Eulgem & Somssich, 2007).

In der Konsequenz wird die Transkription zahlreicher Gene induziert, zu denen zum Beispiel *PR* (*pathogenesis related*)-Gene gehören. Dies führt zur Synthese antimikrobieller Substanzen wie PR-Proteinen oder Phytoalexinen sowie verschiedenen Sekundärmetaboliten wie beispielweise VOC (*volatile organic compounds*) oder SDC (*sulfur-containing defence compounds*) (Croft *et al.*, 1993; Dangl & Jones, 2001; Conrath *et al.*, 2002; Kruse *et al.*, 2006). Die Einlagerung von Lignin, Kallose und/oder Suberin und die damit verbundene Verdickung der Zellwände minimiert die Demission von Wasser und Nährstoffen (Bowles, 1990; Hammond-Kosack & Jones, 1996; Dangl & Jones, 2001; Boerjan *et al.*, 2003; Flors *et al.*, 2005; Bhuiyan *et al.*, 2009).

Um eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln, muss ein Pathogen die Basalabwehr umgehen oder supprimieren. Da Wildtyp-Bakterien Virulenz zeigen, T3SS-Mutanten jedoch die Basalabwehr induzieren, wurde spekuliert, dass Typ-III-Effektoren in der Lage sind, die Basalabwehr zu unterdrücken (Jakobek *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995; Nomura *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007). Dies konnte für einige Typ-III-Effektoren experimentell belegt werden. Der Effektor HopM1 aus *P. syringae* hat einen negativen Einfluss auf die Kalloseeinlagerung in die Zellwände von *A. thaliana*- und *Solanum lycopersicon*-Zellen und spielt somit eine Rolle bei der Virulenz von *P. syringae* (DebRoy *et al.*, 2004; Badel *et al.*, 2006). Der Mechanismus, dem dieser Effekt unterliegt, ist bisher unbekannt, jedoch interagiert HopM1 mit dem G-Protein *AtMIN7*. Dieses ist eine Schlüsselkomponente der Signaltransduktion, und es wird vermutet, dass HopM1 einen Proteasom-abhängigen Abbau von *AtMIN7* verursacht (Nomura *et al.*, 2006). AvrE1 vermindert ebenfalls die Kalloseeinlagerung, reduziert aber auch die Salizylsäureproduktion, wozu auch HopM1 in der Lage ist (DebRoy *et al.*, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Effektor AvrPto mit miRNAs aus *A. thaliana* interferiert und so zur Suppression der Basalabwehr beiträgt (Navarro *et al.*, 2008b).

Andere Effektoren sind in die Regulation der MAPK involviert (Hauck *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; de Torres *et al.*, 2006; Hann & Rathjen, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Die durch einen avirulenten *P. syringae*-Stamm induzierte Abwehrreaktion von *Nicotiana*

benthamiana kann durch den Typ-III-Effektor HopAO1 supprimiert werden (Bretz *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2003). Dieser besitzt Tyrosin-Phosphatase-Aktivität, die möglicherweise dafür verantwortlich ist, dass die MAPK-Signalkaskade behindert wird. Hinweise darauf gibt die Fähigkeit von HopAO1, die durch konstitutiv exprimierte MAPK induzierte HR zu supprimieren (Espinosa *et al.*, 2003). Auch HopAI1, eine Phosphothreonin-Lyase interferiert mit der MAPK-Signalkaskade, indem er eine MAPK-Kinase irreversibel dephosphoryliert, was zur Reduktion der PAMP-induzierten Genexpression führt (Li *et al.*, 2007).

Drei Effektoren der AvrBs3-Familie aus *Xanthomonas*, AvrXa7, AvrXa10 und Apl1, supprimieren ebenfalls die Basalabwehr (Fujikawa *et al.*, 2006).

1.2.3 Effektoren als Induktoren der spezifischen pflanzlichen Abwehr

Um trotz der Suppression der Basalabwehr durch Effektoren erfolgreich gegen die Besiedlung durch Bakterien vorgehen zu können, haben Pflanzen die *effector triggered immunity* (ETI) evolviert. Dabei tragen Resistenz (*R*)-Gene dazu bei, einzelne Effektoren spezifisch zu erkennen (Abb. 1.2).

Essentiell für die Erforschung von Resistenzgenen war eine Beobachtung von R.H. Biffen im Jahr 1905: Die Resistenz von Weizen gegen Weizenrost wird stabil monogen vererbt. Auf Grund dieser Erkenntnis wurde die Gen-für-Gen-Hypothese aufgestellt, die besagt, dass zu jedem Avirulenzgen (*avr*) des Pathogens ein entsprechendes *R*-Gen in der Pflanze existiert (Flor, 1955 & 1971). Das Vorliegen von *avr*- und *R*-Gen führt zu einer durch eine Resistenzantwort bedingten inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion, welche häufig eine HR induziert. Die Abwesenheit einer der beiden Komponenten führt zu einer kompatiblen Interaktion und damit zur Auslösung von Krankheitssymptomen.

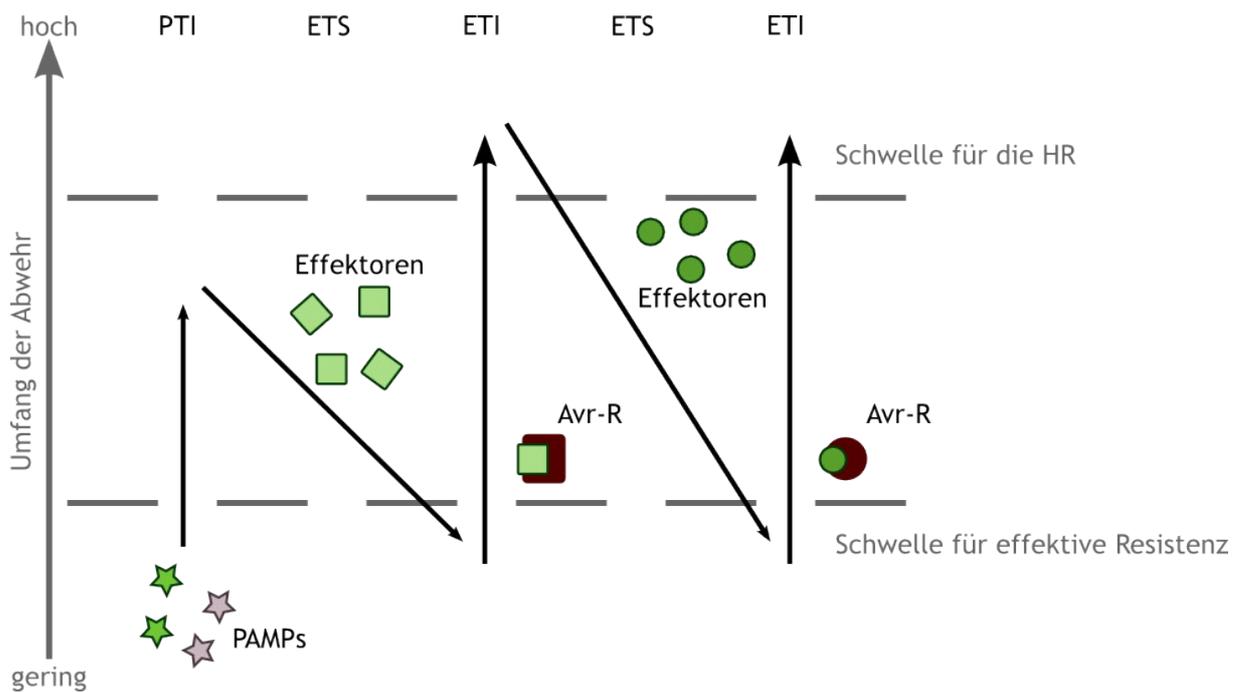


Abb. 1.2: Rolle von PAMPs und Effektoren in Zusammenhang mit der Abwehrreaktion von Pflanzen. PAMPs lösen die Basalabwehr aus, die durch Effektoren supprimiert werden kann. Diese können durch korrespondierende *R*-Gene erkannt werden, wodurch die HR ausgelöst wird. Diese kann wiederum durch weitere Effektoren supprimiert werden, deren Erkennung erneut zur Induktion der HR führt. PTI, *PAMP-triggered immunity*; ETS, *effector-triggered susceptibility*; ETI, *effector-triggered immunity*. Abbildung nach Jones & Dangl, 2006.

Mittlerweile weiss man, dass bakterielle *avr*-Gene für Typ-III-Effektoren kodieren. Obwohl seit der Aufstellung der Gen-für-Gen-Hypothese zahlreiche direkte *avr*- und *R*-Gen-Paare isoliert wurden (Mindrinos *et al.*, 1994; Salmeron *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1999; Schornack *et al.*, 2004; Römer *et al.*, 2007), sind nicht alle Interferenzen von Effektoren und *R*-Genen mit dieser Hypothese erklärbar. Daher wurden drei grundsätzliche Modelle für die Interaktion zwischen Effektoren und *R*-Genen/*R*-Proteinen aufgestellt: das Rezeptor-Ligand-Modell, das *guard*-Modell und das *decoy*-Modell.

Bei dem Rezeptor-Ligand-Modell wird davon ausgegangen, dass Effektor und *R*-Protein direkt miteinander interagieren. Beispielsweise wird durch die Interaktion des *R. solanacearum*-Effektors PopP2 mit RRS1-R aus *A. thaliana* eine Resistenzreaktion ausgelöst (Deslandes *et al.*, 2003). Die Beobachtung, dass die Resistenzreaktion, die durch AvrPto aus *P. syringae* in *S. lycopersicon* ausgelöst wird, von Pto und Prf abhängig ist, führte zum *guard*-Modell (Van der Biezen & Jones, 1998). Das Zielprotein eines Effektors (*guardee*) wird nach dieser Hypothese von einem *guard* überwacht. Eine Veränderung des *guardees*

oder ein Effekt dieser Veränderung wird von dem *guard* registriert, wodurch die HR induziert wird. Beispielsweise phosphorylieren mindestens zwei verschiedene Effektoren (AvrB1 und AvrRpm1) aus *P. syringae* RIN4 (*guard*) aus *A. thaliana*, was zur Induktion der HR durch das *guard* RPM1 führt (Mackey *et al.*, 2002; Lindeberg *et al.*, 2005; DeYoung & Innes, 2006; Chung *et al.*, 2011). Das *decoy*-Modell beschreibt eine Falle oder ein Täuschziel für einen Effektor (van der Hoorn & Kamoun, 2008). Dieser interagiert mit seinem pflanzlichen Ziel, was in suszeptiblen Pflanzen folgenlos bleibt, in resistenten Pflanzen jedoch zur Induktion einer HR führt. Der Xcv-Effektor AvrBs3 bindet in der Wirtszelle an spezifische Promotoren (*UPA-Box*) und aktiviert die Transkription von *UPA*-Genen, bei denen es sich um Virulenzgene handelt (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). In resistenten Pflanzen aktiviert AvrBs3 die Transkription des *R*-Gens *Bs3* und leitet so die HR ein (Römer *et al.*, 2007). In diesem Fall ist *Bs3* das *decoy*.

1.2.4 Effektoren als Suppressoren der spezifischen pflanzlichen Abwehr

Die Umgehung der spezifischen Abwehr durch Pflanzen ist für Pathogene essentiell, um ihre Vermehrung zu gewährleisten. Zu diesem Zweck haben verschiedene pflanzenpathogene Bakterien Effektoren evolviert, die die durch Avr-Proteine induzierte pflanzliche Abwehr supprimieren können (Abramovitch *et al.*, 2003; Axtell *et al.*, 2003; Bretz *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Jamir *et al.*, 2004; Lopez-Solanilla *et al.*, 2004).

HopAB2 aus *P. syringae* pv. *tomato* löst in resistenten Tomaten eine vom *R*-Gen *Pto* abhängige HR aus. In *pto*-Pflanzen hingegen wird durch das HopAB2-Wildtyp-Protein keine HR ausgelöst. Fehlt dem Protein die C-terminale Region, so wird in *pto*-Pflanzen eine vom *R*-Gen *Rsb* abhängige HR ausgelöst. Daraus wurde geschlossen, dass der C-terminale Bereich von HopAB2 die *Rsb*-abhängige, jedoch nicht die *Pto*-abhängige HR supprimieren kann (Abramovitch *et al.*, 2003; Abramovitch *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung der Struktur des C-terminalen Bereichs von HopAB2 wurden Similaritäten zu Ubiquitin-E3-Ligasen festgestellt (Janjusevic *et al.*, 2006).

Der Effektor XopB aus *Xanthomonas* supprimiert verschiedene durch Typ-III-Effektoren induzierte Zelltodreaktionen (Schulze *et al.*, 2012).

Im Laufe der Evolution entwickelte sich ein regelrechter Wettkampf zwischen Wirt und Pathogen. Dabei wurden in Pflanzen immer neue Abwehrmechanismen evolviert, woraufhin Bakterien Strategien entwickelten, die Abwehr zu umgehen (Abb. 1.2).

1.3 Die Gattung *Xanthomonas*

Bei *Xanthomonas* handelt es sich um eine Gattung Gram-negativer Bakterien aus der Familie der Xanthomonadaceae. Der Name leitet sich von den griechischen Wörtern *xanthos* (gelb) und *monas* (Monade, Einzeller) ab. Die oxidativ aerob wachsenden Bakterien mit meist monotricher, polarer Begeißelung zeichnen sich durch ihre typische Gelbfärbung aus. Diese ist auf Xanthomonadin-Pigmente zurückzuführen, bei denen es sich um Membran-gebundene, bromierte Arylpolyene handelt (Stephens & Starr, 1963; Starr, 1981). Ein weiteres Merkmal vieler *Xanthomonas* spp. ist die Exkretion von Xanthan, welches industriell genutzt wird um beispielsweise die Viskosität verschiedener Lösungen zu erhöhen.

Abhängig von ihren Wirtspflanzen, auf oder in denen sie leben, werden diese biotrophen Pathogene in verschiedene Pathovaren (pv.) klassifiziert. *X. campestris* pv. *campestris* ist z. B. der Erreger der Aderschwärze bei allen Kulturformen von Kohlarten. *X. axonopodis* pv. *citri* verursacht den Zitruskrebs bei Zitruspflanzen. Der Befall von Reispflanzen durch *X. oryzae* pv. *oryzae* führt zu Weißblättrigkeit (Williams, 1980; Mew, 1987; Stall & Civerolo, 1991).

1.3.1 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Bei dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Pathogen handelt es sich um *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye (*Xcv*), das auf *Capsicum annuum* (Paprika) und *Solanum lycopersicon* (Tomate) die bakterielle Fleckenkrankheit hervorruft (Abb. 1.3). Weitere Bezeichnungen für *Xcv* sind *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* oder *X. euvesicatoria*. Die Folgen des Befalls mit *Xcv* verursacht in den meist feuchtwarmen Anbaugebieten der Pflanzen beträchtliche Ernteauffälle (Jones *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2004; Agrios, 2005).

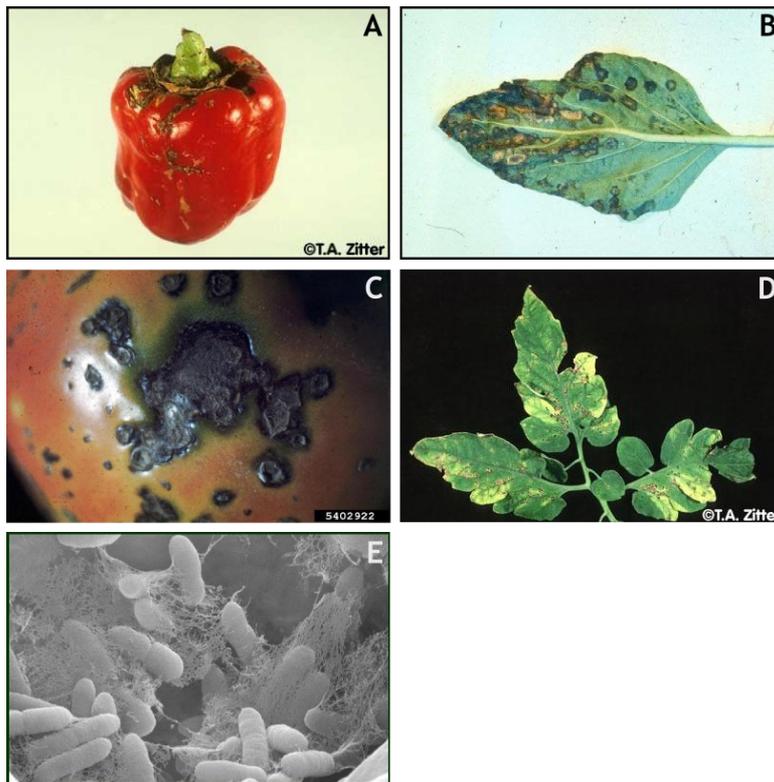


Abb. 1.3: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Früchten und Blättern von Paprika (A und B) und Tomate (C und D). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von in Xanthan eingebetteten Xcv im Apoplasten eines Paprikablattes (E).
Bildquellen: Clemson University, USDA Cooperative Extension Slide series images, www.forestryimages.org (A-D); G. Hause und D. Gürlebeck, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (E)

Die Verbreitung von Xcv erfolgt über Regen und Wind. Die Bakterien dringen über natürliche Öffnungen, wie Stomata oder Verwundungen, in den Apoplasten der Pflanze ein (Jones, 1991). Dort vermehren sie sich lokal und lösen Krankheitssymptome in Form von wässrigen Läsionen aus, welche zu späteren Zeitpunkten nekrotisch werden (Abb. 1.3). Vor einigen Jahren wurde das Genom des Xcv-Stamms 85-10 sequenziert (Thieme *et al.*, 2005), der in der Abteilung Bonas als Modellstamm dient.

1.4 Typ-III-Effektoren von Xcv

Die ersten Effektoren aus Xcv wurden auf Grund der von ihnen ausgelösten HR in Paprika und Tomate identifiziert und daher als Avr-Proteine bezeichnet (Swanson *et al.*, 1988; Whalen *et al.*, 1988; Bonas *et al.*, 1989; Kearney & Staskawicz, 1990; Minsavage *et al.*, 1990; Canteros *et al.*, 1991; Bonas *et al.*, 1993; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Astua-Monge *et al.*, 2000a). Durch Erlangung der Kenntnis über die Existenz des Typ-III-Sekretionssystems konnte festgestellt werden, dass es sich bei Avr-Proteinen aus Xcv um Typ-III-abhängig sekretierte Proteine handelt (Rossier *et al.*, 1999). Durch cDNA-AFLP-Analysen, Transposon-Typ-III-Effektor-Reporterfusionen und die bioinformatische

Untersuchung der Sequenz des *Xcv* 85-10-Genoms wurden weitere Effektoren identifiziert, welche als Xop bezeichnet werden (Noël *et al.*, 2001; Roden *et al.*, 2004b). Zusätzlich gibt es Effektorkandidaten, die durch die Auswertung der Genomsequenz vorhergesagt wurden (Thieme *et al.*, 2005). Insgesamt sind bisher etwa 30 Effektoren oder Effektorkandidaten aus verschiedenen Isolaten bekannt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Typ-III-Effektoren aus *Xcv* und ihre (potenzielle) biologische Funktion.

Effektor	Eigenschaft/Funktion	Homologe	Referenz
AvrBs1	unbekannt	AvrA ¹	Ronald & Staskawicz, 1988; O'Garro <i>et al.</i> , 1997; Escolar <i>et al.</i> , 2001
AvrBs2	Glyzerophosphoryl-Diesterase; Steigerung Wachstum & Virulenz	UgpQ ²	Swords <i>et al.</i> , 1996; Kearney & Staskawicz, 1990; Mudgett <i>et al.</i> , 2000
AvrBs3	Transkriptionsfaktor	TAL	Bonas <i>et al.</i> , 1989; Kay <i>et al.</i> , 2007
AvrBs4	Transkriptionsfaktor	TAL/AvrBs3 ³	Bonas <i>et al.</i> , 1993; Gürlebeck <i>et al.</i> , 2009
AvrBsT	Protease/Acetyltransferase	YopJ ⁴	Minsavage <i>et al.</i> , 1990; Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999; Escolar <i>et al.</i> , 2001; Szczesny <i>et al.</i> , 2010
AvrRxv	Protease/Acetyltransferase	YopJ ⁴	Whalen <i>et al.</i> , 1993; Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999; Whalen <i>et al.</i> , 2008
AvrXv3	unbekannt	HopAF1 ¹	Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a

1 EINLEITUNG

Effektor	Eigenschaft/Funktion	Homologe	Referenz
AvrXv4	Protease/Acetyltransferase	YopJ ⁴	Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000b; Roden <i>et al.</i> , 2004a
XopB	Suppression verschiedener HR	HopD1 ¹	Noël <i>et al.</i> , 2001; Schulze <i>et al.</i> , 2012
XopC	HAD-like Hydrolase; Phosphoribosyltransferase		Noël <i>et al.</i> , 2003
XopD	SUMO Cysteinprotease; EAR-Motiv	Ulp1 ⁵	Noël <i>et al.</i> , 2002; Hotson <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2008
XopE1	putative Transglutaminase; N-Myristoylierung	HopX ¹	Thieme <i>et al.</i> , 2007
XopE2	putative Transglutaminase; N-Myristoylierung	HopX ¹	Thieme <i>et al.</i> , 2007
XopF1	unbekannt	Hpa4	Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopF2	unbekannt		Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopG	Peptidase, M27-Familie (<i>Clostridium</i> -Toxin)	HopH ¹	Thieme <i>et al.</i> , 2007
XopH	putative Tyrosin-Phosphatase	HopAO1 ¹	Thieme <i>et al.</i> , 2007
XopI	F-Box-Protein		Frank Thieme, 2006
XopJ	Cysteinprotease/Acetyltransferase, N-Myristoylierung	YopJ ⁴	Noël <i>et al.</i> , 2003; Thieme <i>et al.</i> , 2007
XopK	unbekannt		unpubliziert

1 EINLEITUNG

Effektor	Eigenschaft/Funktion	Homologe	Referenz
XopL	LRR-Protein	PopC ⁶	Schulze <i>et al.</i> , 2012
XopM	unbekannt	HpaH	Schulze <i>et al.</i> , 2012
XopN	ARM/HEAT-Repeat	HopAU1 ¹	Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopO	unbekannt	HopK1 ¹	Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopP	unbekannt	Hlk	Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopQ	putative Inosin-Uridin-Nukleosid-N-Ribohydrolase	HopQ1 ¹	Noël <i>et al.</i> , 2001; Roden <i>et al.</i> , 2004b
XopR	unbekannt		Schulze <i>et al.</i> , 2012
XopS	Steigerung der Virulenz		Schulze <i>et al.</i> , 2012
XopX	Suppression von Abwehr in <i>N. benthamiana</i>	HopAE1 ¹	Metz <i>et al.</i> , 2005
HpaA	Regulation von Typ-III-Sekretion		Huguet <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 2008
Ecf	<i>early chlorosis factor</i>	HopAE1 ¹	Morales <i>et al.</i> , 2005

1, *P. syringae*; 2, *E. coli*; 3, *X. campestris*; 4, *Yersinia* spp.; 5, *Saccharomyces cerevisiae*; 6, *Ralstonia*; TAL, transcription activator-like

In ECW-10R-Pflanzen (*Capsicum annuum* cv. „Early Californian Wonder“) wird AvrBs1 erkannt und löst eine markante HR aus, welche unter Feldbedingungen nicht sichtbar ist. Werden die *Xcv* jedoch mit hohen Bakteriendichten ($> 10^7$ cfu/ml) inokuliert, ist die Ausprägung der HR bereits nach 24 h deutlich zu erkennen. *avrBs1* war das erste Typ-III-Effektorgen, das kloniert wurde (Swanson *et al.*, 1988). Das korrespondierende R-Gen (*Bs1*) konnte bisher nicht isoliert werden. *avrBs1* liegt auf dem konjugativen Plasmid pXvCul und konnte in verschiedenen *Xcv*-Stämmen wie dem Tomatenpathogen 75-3 und dem Paprikapathogen 85-10 nachgewiesen werden (Ronald & Staskawicz, 1988; Swanson *et al.*, 1988; Escolar *et al.*, 2001; Thieme *et al.*, 2005).

Ein weiterer Typ-III-Effektor aus *Xcv* ist AvrBs2, welcher als einer der Hauptvirulenzfaktoren

gilt, da er einen Effekt auf die Virulenz von *Xcv* in Paprika hat (Kearney & Staskawicz, 1990; Wichman & Bergelson, 2004). Durch die reduzierte Virulenz von *avrBs2*-Deletionsderivaten von *Xcv* können die Effekte von AvrBs3 und AvrBs4 beobachtet werden (Wichman & Bergelson, 2004). Bei diesen beiden Typ-III-Effektoren handelt es sich um zu 97 % identische Proteine.

Bei AvrBs3 handelt es sich um den am umfangreichsten charakterisierten Effektor aus *Xcv*. AvrBs3 besitzt ein Kernlokalisierungssignal und eine saure Aktivierungsdomäne, welche typische Eigenschaften von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren sind. Die durch AvrBs3 vermittelte Aktivierung von *UPA*-Genen (*upregulated by AvrBs3*), insbesondere von *UPA20*, führt zu Hypertrophie, also einer Vergrößerung von Mesophyllzellen in suszeptiblen Pflanzen (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Gürlebeck *et al.*, 2009). AvrBs3 und andere TAL (*transcription activator like*)-Effektoren aktivieren die Transkription durch die direkte, sehr spezifische Bindung zwischen der pflanzlichen Promotorsequenz und den hypervariablen As innerhalb der fast identischen *Repeats* des TAL-Effektors (Kay *et al.*, 2007; Boch *et al.*, 2009). Inzwischen werden TAL-Effektoren auch technisch genutzt, um zum Beispiel Genommanipulationen auch zur Therapie verschiedener Erkrankungen zu etablieren (Cermak *et al.*, 2011; Sun *et al.*; 2012).

XopB und XopS sind ebenfalls Typ-III-Effektoren aus *Xcv*, welche bei der Virulenz von *Xcv* mitwirken und die Basalabwehr supprimieren (Schulze *et al.*, 2012). Für beide wurde gezeigt, dass sie die Expression von *NHL10* (*NDR1/HIN1-LIKE 10*) signifikant reduzieren (Schulze *et al.*, 2012). Weiterhin induziert XopS eine schwache Nekrose in Blättern von Paprika ECW-Pflanzen, XopB jedoch eine Zelltodreaktion in Blättern von *Nicotiana benthamiana*, welche keine Wirtspflanze für *Xcv* ist (Salomon *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012). XopB ist außerdem ein Suppressor von Zelltodreaktionen, welche durch XopG in Paprika ECW bzw. *N. tabacum* und durch AvrBsT, AvrRxv oder XopJ in *N. benthamiana* ausgelöst werden (Schulze *et al.*, 2012).

Das Effektorprotein XopD ist für das Wachstum von *Xcv* in der Wirtspflanze Tomate wichtig und besitzt eine N-terminale DNA-Bindedomäne, zwei *ethylen-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression* (EAR)-Transkriptionsrepressionsmotive und eine *small ubiquitin-related modifier* (SUMO)-Protease im C-terminalen Bereich (Ohta *et al.*, 2001; Hotson *et al.*, 2003; Chosed *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). In späteren Phasen der Infektion von Tomate mit *Xcv* fungiert XopD als Transkriptionsrepressor, was zur Suppression der PTI sowie der Seneszenz-ähnlichen Prozesse führt (Kim *et al.*, 2008).

1.4.1 Der Typ-III-Effektor XopC aus *Xcv*

Das Typ-III-Effektorgen *xopC* (2505 bp) wird mit dem T3SS koreguliert und HrpG- und HrpX-abhängig exprimiert. Die Translokation des ca. 92 kDa großen XopC-Proteins konnte gezeigt werden (Büttner *et al.*, 2006), so dass XopC in die Klasse B-Effektoren, also hpaB-unabhängig, eingeordnet werden muss. Für *xopC*-Deletionsderivate von *Xcv* konnten bisher weder veränderte Pflanzenphänotypen noch ein verändertes Wachstumsverhalten in suszeptiblen Paprikapflanzen verglichen mit dem Wildtyp nachgewiesen werden (Noël *et al.*, 2003).

Im *Xcv*-Genom trägt *xopC* die Nummer XCV2435 (nt 2765069 - 2767573 des Chromosoms) und ist auf dem Minus-Strang kodiert. Stromaufwärts von *xopC* befindet sich eine PIP-BOX (nt 2767764 - 2767827). *xopC* wird beiderseits von IS-Elementen flankiert, welche sich auf dem Plus-Strang befinden.

1.5 Zielstellung

Zu Beginn dieser Arbeit galt XopC aus *Xcv* als einzigartig, woraus auf eine mögliche Bedeutung für die Wirtsspezifität von *Xcv* geschlossen wurde. Desweiteren konnte es möglich sein, durch XopC pflanzliche Ziele zu finden, die bei der Analyse anderer Effektoren verborgen bleiben würden. Daher war die Zielstellung dieser Arbeit, die molekulare und funktionelle Untersuchung von XopC in Zusammenhang mit der Virulenz von *Xcv*, sowie die Identifizierung und Charakterisierung pflanzlicher Interaktionspartner von XopC. Zu diesem Zweck sollte ein XopC-Derivat mit einer Mutation einer für die vorhergesagte *HAD* (*haloacid dehalogenase*)-like Hydrolase-Domäne essentiellen Aminosäure erstellt werden. Zudem sollte die subzelluläre Lokalisierung von XopC analysiert werden, um Hinweise auf die mögliche Funktion des Effektors zu erhalten. Des Weiteren sollte eine Hefe-Di-Hybrid-Sichtung *Capsicum annuum*-cDNA-Bibliothek durchgeführt werden.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide und Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden die in den Tabellen 2.1 bis 2.6 angegebenen Bakterien- und Hefestämme sowie Plasmide und Oligonukleotide verwendet.

Escherichia coli (*E. coli*) wurden bei 37°C in Lysogeny-Broth (LB) Medium (Miller, 1972) oder Minimalmedium (M9, Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert. Für *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) wurde Vollmedium (*Nutrient-Yeast-Glycerol*, NYG, Daniels *et al.*, 1984) oder Minimalmedium (MA) verwendet (Ausubel *et al.*, 1996). *Agrobacterium tumefaciens* wurde in YEB (*Yeast Extract Broth*)-Medium angezogen. *Saccharomyces cerevisiae* wurde in Vollmedium YPDA oder Minimalmedium SD angezogen (*Yeast Protocol Handbook*, Clontech). *Xcv* und Agrobakterien wurden bei 30°C angezogen.

Antibiotika wurden (sofern nicht anders angegeben) den Medien in folgenden Konzentrationen zugefügt: Ampicillin (Ap) 100 µg/ml; Kanamycin (Km) 50 µg/ml; Gentamycin (Gm) 15 µg/ml; Hygromycin (Hm) 50 µg/ml; Rifampicin (Rm) 100 µg/ml; Spectinomycin (Spec) 100 µg/ml.

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden erfolgte durch chemische Transformation oder Elektroporation (Sambrook *et al.*, 1989). In *Xcv* wurden Plasmide mittels triparentaler Konjugation unter Verwendung des Helferplasmids pRK2013 eingeführt (Figurski & Helinski, 1979). Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mittels Elektroporation.

Tabelle 2.1: Verwendetet *E. coli*-Stämme.

Stamm	Eigenschaften/Genotyp/Anwendung	Referenz
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1araD139 Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> Amplifikation aller pENTR/D-Konstrukte, pJET1.2/blunt-Konstrukte und pUC57- Konstrukte</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2 MATERIAL & METHODEN

Stamm	Eigenschaften/Genotyp/Anwendung	Referenz
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-, mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
BL21(DE3) pDEST17_ <i>avrbs</i> 3-356	Expression von AvrBs3	diese Arbeit
BL21(DE3) pDEST17_ <i>xopC</i> <i>D693A</i>	Expression von XopC _{D693A}	diese Arbeit
HMS174 (DE3)	F- <i>recA1 hsdR</i> (rK12- mK12+) (DE3) (Rif R)	Merck4Biosciences, Nottingham, UK
NK3	<i>AtrpE5 leu-6 thi rbs+ hsdR hsdM+ cysK- cysM-</i>	Hulanicka <i>et al.</i> , 1986
NK3 pET28a_ <i>AtSAT</i> 5	Negativkontrolle für OAS-TL- <i>in vivo</i> -Aktivität	diese Arbeit
NK3 pET3d_ <i>AtOAS-TLA</i>	Positivkontrolle für OAS-TL- <i>in vivo</i> -Aktivität	diese Arbeit
NK3 pET3d_ <i>CaOAS-TL</i>	OAS-TL- <i>in vivo</i> -Aktivitätsstudien	diese Arbeit
Rosetta (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (RB- mB-) <i>gal dcm</i> λ(DE3) pLysSRARE (CamR)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
Rosetta (DE3) pLysS pDEST17_ <i>xopC</i>	Expression von XopC	diese Arbeit
DH5α (λpir)	<i>recA hsdR17</i> (rK- mK+) φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 [λpir]; Klonierung von pOK-Derivaten	Ménard <i>et al.</i> , 1993
DH5α (λpir) pOK_dC(lF+rF)	Generierung eines Kontrukts zur Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i>	diese Arbeit

2 MATERIAL & METHODEN

Stamm	Eigenschaften/Genotyp/Anwendung	Referenz
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für die Konjugation; enthält Plasmid mit tra-Funktion	Boyer und Roulland- Dussoix, 1969
DB3.1	F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> ; Quelle von pGWB6, pK7FWG2, pK7WGF2, pGADT7, pGWB20, pGWB14, pGBST7, jeweils Leervektoren)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.2: Verwendete *A. tumefaciens*-Stämme.

Stamm	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
GV3101	Gm ^r , Rp ^r	Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974
GV3101 pGWB17	Kontrollstamm für transiente Expression von <i>XopC</i> <i>in planta</i>	diese Arbeit
GV3101 pGWB18	Kontrollstamm für transiente Expression von <i>XopC</i> <i>in planta</i>	diese Arbeit
GV3101 pGWB17_ <i>xopC</i>	transiente Expression von <i>XopC</i> <i>in planta</i>	diese Arbeit
GV3101 pGWB18_ <i>xopC</i>	transiente Expression von <i>XopC</i> <i>in planta</i>	diese Arbeit
GV3101 pGWB14_ <i>xopC</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
GV3101 pGWB20_ <i>xopC</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
GV3101 pGWB14_ <i>Caoas-tl</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
GV3101 pGWB20_ <i>Caoas-tl</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit

2 MATERIAL & METHODEN

Stamm	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
GV3101 pK7 WGF2_xopC	Lokalisierungsstudien von XopC	diese Arbeit
GV3101 pK7 FWG2_xopC	Lokalisierungsstudien von XopC	diese Arbeit
GV3101 pK7 WGF2_Caoas-tl	Lokalisierungsstudien von CaOAS-TL	diese Arbeit
GV3101 pK7 FWG2_Caoas-tl	Lokalisierungsstudien von CaOAS-TL	diese Arbeit
GV3101 pSPYNE_xopC	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pSPYNE_Caoas-tl	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pSPYNE_laminC	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pGWB735.1_xopC	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pGWB735.1_Caoas-tl	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pGWB735.1_laminC	BiFC-Studien	diese Arbeit
GV3101 pYL279Amp_Caoas-tl	VIGS	diese Arbeit
GV3101 pYL279Amp_gfp	VIGS	diese Arbeit

Tabelle 2.3: Verwendete Xcv-Stämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
85-10	avrBs1; Rpr	Bonas <i>et al.</i> , 1989

2 MATERIAL & METHODEN

Stamm	Eigenschaften	Referenz
85-10 $\Delta xopC_{1-541}$	Derivat von 85-10, Deletion von der nt 1-541 von <i>xopC</i>	Diplomarbeit J. Gäbler, 2002
85-10 $\Delta hrcN$	Derivat von 85-10, Deletion von <i>hrcN</i>	Dissertation C. Lorenz, 2009
85-10 $\Delta xopC$	Derivat von 85-10, Deletion von der nt 1-2505 von <i>xopC</i>	diese Arbeit
85-10 $\Delta xopC$ (<i>xopC</i>)	Derivat von $\Delta xopC$, <i>xopC</i> reintegriert über pLAND	diese Arbeit
85-10 $\Delta xopC$ (<i>xopC_{D693A}</i>)	Derivat von $\Delta xopC$, <i>xopC_{D693A}</i> integriert über pLAND	diese Arbeit

Tabelle 2.4: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>MEL1</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
Y148	<i>MATalpha</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	Clontech

Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
pRK2013	TraRK2+ ; Mob+ ; ColE1-Replicon; Km ^r	Figurski & Helinski, 1979
pENTR/D-TOPO	"Entry"-Vektor für GATEWAY®-Klonierungen; attL-Rekombinationssequenzen; Km ^r	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pENTR/D_ <i>xopC</i>	Ausgangsvektor für GATEWAY®-Klonierungen von <i>xopC</i>	Daniela

2 MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
pENTR/D_ <i>oas-tl</i>	Ausgangsvektor für GATEWAY®-Klonierungen von <i>CaOAS-TL</i>	diese Arbeit
pENTR/D_ <i>laminC</i>	Ausgangsvektor für GATEWAY®-Klonierungen von <i>avrBs3</i>	diese Arbeit
pENTR/D_ <i>avrbs3-356</i>	Ausgangsvektor für GATEWAY®-Klonierungen von <i>laminC</i>	Doreen Gürlebeck
pK7FWG2	35S-Promotor; C-terminale Fusion von eGFP; attR-Rekombinationssequenzen; Spec ^r	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pK7FWG2_ <i>xopC</i>	Lokalisierungsstudien von XopC	diese Arbeit
pK7FWG2_ <i>oas-tl</i>	Lokalisierungsstudien von <i>CaOAS-TL</i>	diese Arbeit
pK7WGF2	35S-Promotor; N-terminale Fusion von eGFP; attR-Rekombinationssequenzen; Spec ^r	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pK7WGF2	Lokalisierungsstudien von XopC	diese Arbeit
pK7WGF2	Lokalisierungsstudien von <i>CaOAS-TL</i>	diese Arbeit
pGWB14	attR-Rekombinationssequenzen; C-terminale 3 x HA-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB14_ <i>xopC</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
pGWB14_ <i>oas-tl</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
pGWB20	attR-Rekombinationssequenzen; C-terminale 10 x c-Myc-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB20_ <i>xopC</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
pGWB20_ <i>oas-tl</i>	Koimmunopräzipitationsstudien	diese Arbeit
pGWB17	attR-Rekombinationssequenzen; C-terminale 4 x c-Myc-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB17_ <i>xopC</i>	transiente Expression von XopC <i>in planta</i>	diese Arbeit
pGWB18	attR-Rekombinationssequenzen; N-	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007

2 MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
	terminale 4 x c-Myc-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	
pGWB18_ <i>xopC</i>	transiente Expression von <i>XopC</i> in <i>planta</i>	diese Arbeit
pGWB14	attR-Rekombinationssequenzen; C-terminale HA-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB20	attR-Rekombinationssequenzen; C-terminale c-Myc-Fusion; Km ^r ; Hm ^r	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pJET1.2/blunt	Ap ^r	Fermentas
pJET1.2/blunt_IF	linkes Fragment zur Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> , BamHI/HindIII	diese Arbeit
pJET1.2/blunt_rF	rechtes Fragment zur Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> , HindIII/XbaI	diese Arbeit
pOK1	<i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i> ; Spec ^r	Huguet <i>et al.</i> , 1998
pOK1_dC(lF+rF)	Fusion von rechtem und linkem Fragment zur Deletion von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i> , BamHI/XbaI	diese Arbeit
pET28a	Km ^r	Novagen
pET28a_ <i>AtSAT5</i>	Expression von <i>AtSAT5</i>	Markus Wirtz, COS, Heidelberg
pET3d	Amp ^r	Novagen
pET3d_ <i>AtOAS-TL</i>	Expression von <i>AtOAS-TL</i>	Markus Wirtz, COS, Heidelberg
pET3d_ <i>CaOAS-TL</i>	Expression von <i>CaOAS-TL</i> , klassische Klonierung NcoI/BamHI	diese Arbeit
pDEST17	GATEWAY [®] -Destinationsvektor; Amp ^r	Invitrogen
pDEST17_ <i>avrbs3-356</i>	Expression von <i>AvrBs3</i> in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pDEST17_ <i>xopC</i>	Expression von <i>XopC</i> in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pDEST17_ <i>xopC</i> _{D693A}	Expression von <i>XopC</i> _{D693A} in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGBST7	Y2H-Ködervektor; Derivat von pGBKT7	O. Kirchner & U. Bonas,

2 MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
	(Clontech); attR-Rekombinationssequenzen; Spec ^r ; N-terminale GAL4-Bindedomäne	unpubliziert
pGBST7_xopC	Ködervektor für Hefe-Di-Hybrid-Sichtung; Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pGBST7_oas-tl	Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pGBST7_laminC	Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pGADT7	Y2H-Beutevektor; attR-Rekombinationssequenzen; Ap ^r ; N-terminale GAL4-Aktivierungsdomäne	Clontech
pGADT7_xopC	Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pGADT7_oas-tl	Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pGADT7_laminC	Proteininteraktionsstudien in Hefe	diese Arbeit
pSPYNE	attR-Rekombinationssequenzen; Km ^r , BiFC-Vektor, N-terminaler Teil von YFP	
pSPYNE_xopC	BiFC-Studien	diese Arbeit
pSPYNE_oas-TL	BiFC-Studien	diese Arbeit
pSPYNE_laminC	BiFC-Studien	diese Arbeit
pGWB735.1	Km ^r ; Hmr, BiFC-Vektor, C-terminaler Teil von YFP	
pTRV1	Km ^r , VIGS	Liu <i>et al.</i> 2002
pTRV2a	Ap ^r , VIGS	T. Lahaye, P. Römer, unpubliziert
pYL279Amp	Derivat von pTRV2a, Ap ^r	R. Szczesny, unpubliziert
pYL279Amp_oas-tl	<i>Silencing</i> von CaOAS-TL (nt 484-975 des ORF)	diese Arbeit
pYL279Amp_gfp	<i>Silencing</i> -Kontrollkonstrukt (nt 1-714)	diese Arbeit

2 MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Eigenschaften/Anwendung	Referenz
pUC57w/oBsal_ <i>xopC</i>	<i>xopC</i> -Konstrukt mit Bsal- Restriktionsschnittstellen zur GoldenGate- Klonierung	diese Arbeit
pUC57w/oBsal_ <i>xC_{D693A}</i>	<i>xopC_{D693}</i> -Konstrukt mit Bsal- Restriktionsschnittstellen zur GoldenGate- Klonierung	diese Arbeit
pLAND	Spec ^r , Intergration von Sequenzen zwischen <i>hpaG</i> und <i>hpaF</i> in <i>Xcv</i> mit <i>cMYC</i> - <i>tag</i> ; GoldenGate-Klonierung	D. Büttner, unpubliziert
pLAND_ <i>xopC</i>	Integration von <i>xopC</i> in <i>Xcv</i>	diese Arbeit
pLAND_ <i>xopC_{D693A}</i>	Integration von <i>xopC_{D693A}</i> in <i>Xcv</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung	Schmelztemperatur (°C)
M13fwd	TTGTAAAACGACGGCCAG	Standardoligonukleotid	54
M13rev	ACACAGGAAACAGCTATGACC	Standardoligonukleotid	62
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Standardoligonukleotid	56
T7terminator	GTTATGCTAGTTATTGCTCAG CGG	Standardoligonukleotid	70
pGBST7rev	TCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC	spezifisches Oligonukleotid für pGBST7	56
pGADT7rev	AGATGGTGCACGATGCACAG	spezifisches Oligonukleotid für pGADT7	62
CACC-OAS-TLfwd	CACCATGGCAGCAGAAAAGA ATGGA	Generierung des pENTR/D- <i>Caoas-tl</i> -Konstrukts	60
OAS-TLrev	AGGCTCCACGGTCATGTTCT C	Generierung des pENTR/D- <i>Caoas-tl</i> -Konstrukts	66
dlCfwd	ggatccCGGCATCAGTCGATCG TG	linkes Fragment für <i>xopC</i> - Deletion	58
dlCrev	aagcttTTGGGCAGAGGCTCG AAAC	linkes Fragment für <i>xopC</i> - Deletion	60
drCfwd	aagcttCATGATTCCTCCTATT GATTAAATACC	rechtes Fragment für <i>xopC</i> - Deletion	74

2 MATERIAL & METHODEN

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung	Schmelztemperatur (°C)
drCrev	tctagaCGAGCAATCCAGTCCT GCA	rechtes Fragment für <i>xopC</i> - Deletion	60
Bsal-xopCfwd	aaaggtctcttATGAAACAAGT AGTGC	Generierung von <i>xopC</i> - Konstrukten für GoldenGate-Klonierung	76
Bsal-xopCrev	aaaggtctctcaccAAGTTCCGT	Generierung von <i>xopC</i> - Konstrukten für GoldenGate-Klonierung	68
qbetafwd	GGATAAATTCGCCTTTGCTCG	Amplifikation von <i>1,3-β</i> - <i>Glucanase</i>	62
qbetarev	GACTACCCCTTCTAACATGCT G	Amplifikation von <i>1,3-β</i> - <i>Glucanase</i>	66
qEFfwd	TTACAACCCTGACAAGATCCC	Amplifikation von <i>EF-1a</i>	62
qEFrev	GTTTGAGGCAACATAACCACG	Amplifikation von <i>EF-1a</i>	62
NcoI-OAS-TLfwd	ccATGGCAGCAGAAAAGAATG	Klonierung von <i>Caoas-tl</i> in pET3d	62
BamHI-OAS-TLrev	ggatccTCAAGGCTCCACGGT CATGTTCTC	Klonierung von <i>Caoas-tl</i> in pET3d	74
OAS-TLquiet1fwd	GGAACAGGAGGCACAATAAC AGG	Amplifikation von <i>Caoas-tl</i> (Effizienz von VIGS)	70
OAS-TLquiet1rev	GGCCTTATTTTCATCGGAAGG G	Amplifikation von <i>Caoas-tl</i> (Effizienz von VIGS)	66
xopCD693Afwd	CTACTTTGcCGTGGTGTCCG G	Generierung von <i>xopC_{D693A}</i> via SOE-PCR	68
xopCD693Arev	GACACCACgGCAAAGTAGTG CATC	Generierung von <i>xopC_{D693A}</i> via SOE-PCR	74

2.2 Pflanzenmaterial

Nicotiana benthamiana, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *S. americanum*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, *Physalis peruviana* und *P. alkekengi* wurden wie in durch Marois *et al.* 2002 beschrieben kultiviert. Bei *S. lycopersicum* handelt es sich um die Kultivarietät (cv.) Moneymaker.

Paprika (*Capsicum annuum*) der Kultivarietäten „Early Californian Wonder“ (ECW), ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R und ECW-123 (Kousik & Ritchie, 1999; Minsavage *et al.*, 1990) wurden bei 26 °C, relativer Luftfeuchte von 60-70 % und einer Lichtperiode von 16 Stunden

kultiviert (Bonas *et al.*, 1991). Die fünf nahezu isogenen Linien unterscheiden sich vor allem in den Resistenzgenen: ECW-10R trägt das Bs1-Gen, ECW-20R das Bs2-Gen, ECW-30R das Bs3-Gen und ECW-123 jedes der drei genannten Resistenzgene. ECW besitzt keines der Resistenzgene.

2.3 Pflanzeninfektionsexperimente

2.3.1 Inokulation von Agrobakterien

Agrobacterium-Stämme wurden für zwei Tage auf YEB-Agar-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum kultiviert. Nach Resuspendieren in *Agrobacterium*-Inokulationsmedium (AIM: 5 mM MES pH 5,3, 10 mM MgCl₂, 150 µM Acetosyringon) wurde die gewünschte Zelldichte eingestellt und die Bakterien mittels einer nadellosen Spritze in die Unterseite der Pflanzenblätter inokuliert. Die Pflanzen wurden in eine Phytokammer (Series 101, Percival Scientific; 25°C, 65 % relative Luftfeuchte, 16 Stunden Licht) überführt und die Reaktion der Pflanzen beobachtet und fotografisch dokumentiert. Abhängig von der Fragestellung wurden Proben zur Mikroskopie und zur Immunoblotanalyse genommen.

2.3.2 Inokulation von Xcv

Nach Anzucht von Xcv auf NYG-Agar-Medium wurden diese in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und in der Konzentration von 10⁸ Zellen/ml (OD₆₀₀ = 0,1) mit einer nadellosen Spritze in die Unterseite von Paprika- oder Tomatenblättern inokuliert. Die Pflanzen wurden in eine Phytokammer (Series 101, Percival Scientific; 26°C, 80 % relative Luftfeuchte, 16 Stunden Licht) überführt und die Reaktion der Pflanzen beobachtet und fotografisch dokumentiert. Abhängig von der Fragestellung wurden Proben zur Immunoblotanalyse genommen.

2.3.3 electrolyte leakage-Messungen

Zur Quantifizierung der HR wurde das Verhältnis von Elektrolytemission in wässriges Milieu durch absterbendes Pflanzengewebe zur Totalelektrolytmenge bestimmt. Die Totalelektrolytmenge wird nach vollständigem Gewebekollaps ermittelt.

Fünf Blattscheiben (Korkbohrergröße 5) werden ausgestanzt und in einem 15 ml-Gefäß mit 7 ml ddH₂O versetzt. Nach Entfernung der Luft in den Blattstücken durch Anlegen von Unterdruck, wurde die Leitfähigkeit des umgebenden Wassers mittels Konduktometer 703

(Knick, Berlin) bestimmt. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubation im 100°C-Wasserbad, wurde die maximale Leitfähigkeit (Totalelektrolytmenge) gemessen und die prozentuale Konduktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{prozentuale Leitfähigkeit} = \frac{\text{Leitfähigkeit}}{\text{maximale Leitfähigkeit}} \times 100$$

2.3.4 Wachstumskurven von *Xcv in planta*

Die Wachstumskurve wurde nach Bonas *et al.*, 1991 durchgeführt. Die *Xcv*-Stämme wurden in 1 mM MgCl₂ auf 10⁴ Zellen/ml eingestellt. Die Xanthomonaden wurden in 3 Wochen alte *C. annuum* cv. ECW-Pflanzen inokuliert. Zur Probennahme wurden Blattscheiben aus den inokulierten Blattbereichen ausgestanzt. Die KBE (Kolonie-bildende Einheiten) wurden relativ zur Blattfläche bestimmt.

2.4 Hefe-Dihybrid-Sichtung

Bei der Sichtung der Paprika-cDNA-Bibliothek wurde das MATCHMAKER-GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System nach Angaben des Herstellers (Clontech) verwendet.

Die Bibliothek befindet sich als pGADT7_cDNA im Stamm *S. cerevisiae* Y148 des Paarungstyps *MATalpha*, die resultierenden Proteine wurden als Fusion mit der GAL4-Bindedomäne (BD) synthetisiert. Das Köderplasmid pGBST7_xopC wurde in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 des Paarungstyps *MATa* transformiert, so dass XopC als Fusionsprotein mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) synthetisiert wurde. Das Sediment der Übernachtskultur von AH109 (pGBST7_xopC) wurde mit 500 µl Y148 (pGADT7_cDNA) in 50 ml 2 x YPDA resuspendiert. Die Paarung erfolgte für 24 h bei 30°C. Die diploiden Zellen wurden auf SD-Medium, welches kein Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan enthielt (-THAL), ausplattiert. Der Vektor pGBST7 enthält das Reportergen *TRP1*, der Vektor pGADT7 das Reportergen *LEU2*. Der Stamm AH109 enthält die Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ*. Die Aktivierung der Reportergene erfolgt für *TRP1* und *LEU2* bei Anwesenheit des jeweiligen Plasmids, für *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* bei Interaktion der resultierenden Proteine, welche zur Interaktion von GAL4-AD und -BD führt, so dass die Hefezellen wachsen können. Zusätzlich wurde dem Medium 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-alpha-D-Galactopyranosid (X-α-Gal) zugesetzt.

Für die Spezifitätstestung mittels gezielter Hefe-Interaktionsstudien wurde *S. cerevisiae*

AH109 mit den jeweiligen zu untersuchenden Konstrukten frisch kotransformiert.

2.4.1 Paprika-cDNA-Bibliothek

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Paprika-cDNA-Bibliothek wurden *C. annuum*-Pflanzen des Kultivars ECW-10R mit *Xcv* 85-10 (AvrBs1) und ECW-30R mit *Xcv* 85-10pDS400 (AvrBST) und *Xcv* 85-10pDSF300 (AvrBs3) inokuliert. Aus einer Mischung aus diesen und unbehandelten ECW-10R und -30R-Pflanzen wurde RNA präpariert. Die Firma Invitrogen™ konstruierte die cDNA-Bibliothek (Szczesny *et al.*, 2010).

2.4.2 Datenbanken

Für die Suche nach Homologen und zusätzlicher Sequenzinformation von Kandidaten aus den Y2H-Sichtungen wurden folgende Datenbanken benutzt:

SOLGene Solanaceae Gene Indices

(<http://210.218.199.240/SOL/index.php>), Plant Diversity Research Center

sol genomics network

(<http://solgenomics.net/>) Sol Genomics Network, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY 14853

TIGR Solanaceae Genomics Resource

(<http://www.jcvi.org/potato/>), The J. Craig Venter Institute

The Gene Index Project

(<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>) Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02215

Gene Pool

(<http://genepool.kribb.re.kr/new/index.php>) Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

NCBI BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD 20894

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 RNA-Isolierung

Es wurden drei Blattscheiben (Korkbohrergröße 5) aus den Blättern gestanzt, was etwa 60 - 70 mg Material entspricht. Das Homogenisieren des gefrorenen Blattmaterials erfolgte durch Metallmörser. Die RNA aus dem homogenisierten Blattmaterial wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Bei Paprikamaterial wurde auf Grund des hohen Stärkegehalts der Blätter auf den Inkubationsschritt bei 65°C verzichtet. Unter Verwendung des Qiagen RNase-free DNase Kits wurde ein *on column*-DNase Verdau durchgeführt. Durchschnittlich wurden etwa 6 µg RNA pro Präparation erhalten.

2.5.2 cDNA-Synthese

Unter Verwendung des mitgelieferten oligo(dT)-Oligonukleotids wurde mit Hilfe des Fermentas RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) cDNA synthetisiert. Für die reverse Transkription wurden 1,5 µg RNA eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde für PCR-Ansätze im Verhältnis 1:50 verdünnt.

2.5.3 Quantitative real-time PCR

Durchgeführt wurde die PCR im iCycler IQ der Firma BioRad. Zur Verfolgung der PCR diente der SYBR Green-Farbstoff des Fast SYBR® Green Master Mix. Die pro Zyklus gemessenen Fluoreszenzwerte werden als Ordinate gegen die entsprechende Zyklenzahl auf der Abszissenachse aufgetragen, sodass eine Verlaufskurve entsteht. Im Fall der Amplifikation eines Fragments ist ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz ab einem bestimmten Zyklus zu beobachten. Alle Daten wurden unter Beachtung der gängigen technischen Vorgehensweise, des 'Schwellenzyklus' und der Effizienz einer Normalisierung gegen das Transkript des Elongationsfaktors 1α unterzogen (Details der Berechnung siehe Dissertation Robert Szczesny, 2009).

2.6 Klonierung

2.6.1 Das GATEWAY®-System

Das pENTR/D-TOPO Directional TOPO Cloning Kit der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) ermöglicht eine Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor

pENTR/D-TOPO. Die direkte Klonierung doppelsträngiger DNA basiert auf einem GTGG-Überhang des linearisierten Vektors, welcher mit dem komplementären 5'-Ende des PCR-Produktes verknüpft wird.

Die attL-Rekombinationsstellen, welche sich rechts und links der Klonierungsstelle befinden, ermöglichen die lokalisationspezifische Klonierung in andere GATEWAY®-Vektoren.

Die in den pENTR/D-TOPO enthaltenen PCR-Produkte wurden durch gerichtete Rekombination mit Hilfe des Gateway® LR Clonase Enzyme Mix' (Invitrogen) von den *Entry*- in die Zielvektoren übertragen. Das System basiert auf der Eigenschaft des Bakteriophagen Lambda zur lokalisationspezifischen Rekombination der Sequenzen zwischen den attL-Abschnitten des *Entry*-Vektors und den attR-Stellen des Zielvektors (Nunes-Düby *et al.*, 1989).

2.6.2 GoldenGate-Klonierung

Für Klonierungen mittels des GoldenGate-Verfahrens werden an das 5'- und 3'-Ende der zu klonierenden PCR-Produkte über die Konzeptionierung der Oligonukleotide Erkennungssequenzen für Typ II-Restriktionsendonukleasen angefügt. Durch die spezifischen Überhänge, welche durch die Restriktion der PCR-Produkte entstehen, können diese direkt in die Zielvektoren kloniert werden. Dies wird in einem *cut-ligation*-Ansatz durchgeführt (Engler *et al.*, 2008).

2.6.3 Klassische Klonierung

Die klassische Klonierung erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Die Enzyme und Puffer wurden nach Angabe des jeweiligen Herstellers (NEB, Fermentas) eingesetzt.

2.7 Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)

In dieser Arbeit wurde das *tobacco rattle virus* (TRV)-VIGS verwendet (Liu *et al.*, 2002). Um pTRV2 besser selektieren zu können, wurde eine Ampicillin-Resistenzkassette eingeführt und dieses Derivat pTRV2a genannt (T. Lahaye, P. Römer, unveröffentlicht). Dieses wurde wiederum von R. Szczesny modifiziert und als pYL279Amp bezeichnet. In diesen wurden die Zielfragmente mittels GATEWAY®-Rekombination eingeführt.

2.7.1 *Silencing*-Konstrukte

Das Fragment für das *CaOAS-TL-Silencing* hatte eine Größe von 486 bp (nt 489 - 975 des ORF), das Kontrollfragment bestand aus der Sequenz des kompletten ORF von eGFP mit einer Größe von 714 bp. Mit Hilfe der durch PCR angehängten Basen (CACC) wurden die Fragmente jeweils gerichtet in pENTR/D-TOPO kloniert. Diese Plasmide wurden in *E. coli* amplifiziert und reisoliert. Mittels LR-Rekombination wurden die Fragmente jeweils in pYL279Amp eingeführt und die entstandenen Konstrukte in *A. tumefaciens* transformiert.

Es wurden *A. tumefaciens* mit pTRV1 und *A. tumefaciens* mit pYL279Amp_*gfp* bzw. pYL279Amp_*oas-tl* zu gleichen Teilen gemischt jeweils eine Mischung mittels Vakuuminfiltration in junge ECW-10R-Pflanzen inokuliert. Die OD₆₀₀ der einzelnen Stämme der Mischung betrug 0,1, und es wurden 0,02 % Silwet L77 (Union Carbide) zugesetzt.

In den Pflanzen integrierte die T-DNA in die Pflanzen-DNA, wodurch Viruskomponenten repliziert und synthetisiert wurden. Dies führte zur Assemblierung von TRV, wodurch eine systemische Ausbreitung des Virus' in den Pflanzen möglich wurde.

Durch die Transkription des *Silencing*-Fragments wurde posttranskriptionelles Gen-*Silencing* ausgelöst.

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

2.8.1 GFP-Fluoreszenzmikroskopie für Lokalisationsstudien

Die zu analysierenden Proteine wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* synthetisiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden Proben entnommen. Zur Visualisierung von eGFP-Fusionsproteinen wurde das *Laser-Scanning*-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. EGFP wurde mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und mit einem 505-530 nm Bandpassfilter detektiert.

2.8.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation für *in planta*-Interaktionsstudien

Für die Analyse der Interaktion von Proteinen mittels BiFC wurde YFP in eine C- (Aminosäuren 1-154) und eine N-terminale (Aminosäuren 155-239) Domäne geteilt (Walter *et al.*, 2004). Jeweils ein Teil von YFP wurde als Fusionprotein mit einem der Interaktoren *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden Proben entnommen und mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena,

Deutschland) analysiert. YFP wurde mit Licht der Wellenlänge 480 nm angeregt und mit einem 535 - 565 Bandpassfilter detektiert.

2.9 Koimmunopräzipitation (KoIP)

Die auf Interaktion zu untersuchenden Proteine wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden sechs Blattscheiben (Korkbohrer Größe 4) geerntet und in flüssigem N₂ eingefroren. Nach Zugabe einer Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon wurde das Blattmaterial gemörsert und in 1 ml KoIP-Puffer (25 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 5 mM DTT, 40 µl Protease-Inhibitor Mix (Complete, Roche)) aufgenommen. Nach gründlicher Vermengung und Sedimentation wurde der Überstand mit Nonidet-P40 und 20 µl Protein G-Agarose versetzt. Nach einstündiger, über Kopf rotierender Inkubation bei 4°C wurde erneut sedimentiert. Dem Überstand wurden 30 µl Protein G-Agarose und 2 µl Antikörper zugefügt. Zur Bindung der Proteine an die Matrix wurde die Mischung über Nacht erneut über Kopf rotierend bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit KoIP-Puffer wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 1 x Laemmli-Probenpuffer eluiert und mittels Immunoblot analysiert. Dazu wurden anti-HA- bzw. anti-c-Myc-Antikörper verwendet.

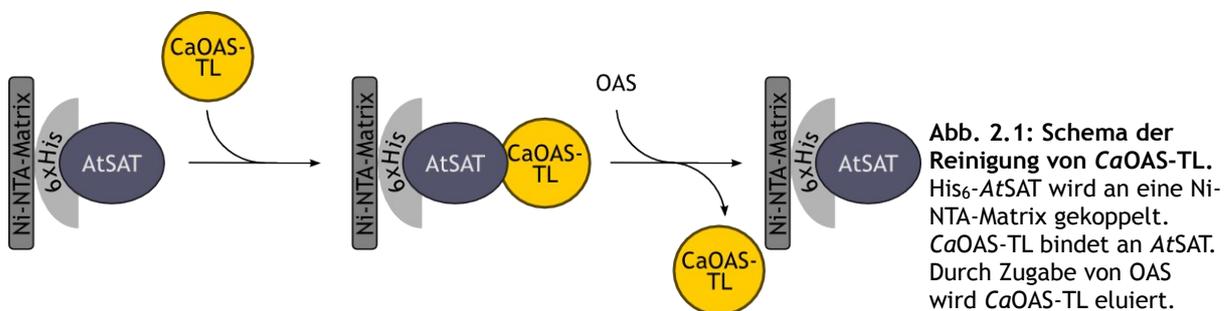
2.10 Heterologe Überexpression und Reinigung von CaOAS-TL

Da N- oder C-terminale Fusionen von AtOAS-TL zu einer Funktionseinschränkung führen (Markus Wirtz, COS Heidelberg, persönliche Mitteilung), wurde bei CaOAS-TL auf eine solche Fusion verzichtet. Die Reinigung der CaOAS-TL erfolgte durch die heterologe Interaktion mit einer Serin-Acetyltransferase aus *A. thaliana* (AtSAT).

In vivo bilden AtOAS-TL und AtSAT Heterooligomere. Dies kann bei der Reinigung von AtOAS-TL nutzbar gemacht werden, indem AtSAT an eine Matrix gekoppelt wird und AtOAS-TL an AtSAT bindet. Durch Zugabe von OAS kommt es zu einer Dissoziation von AtSAT und AtOAS-TL (Heeg *et al.*, 2008). Auf Grund der Homologie zwischen AtOAS-TL und CaOAS-TL, wurde angenommen, dass sich CaOAS-TL durch die heterologe Interaktion mit AtSAT reinigen lässt.

Aus diesem Grund wurde AtSAT N-terminal mit einem His₆-Epitop (Vektor: pET28a) fusioniert und in *E. coli* HMS174 (DE3) exprimiert. Eine HiTrap-Säule (GE Healthcare, Freiburg) wurde mit NiCl₂ beladen. Das *E. coli*-Lysat mit der AtSAT wurde für 2 h über die

Säule zirkuliert und diese anschließend mit Puffer (50 mM TrisHCl (pH 8) , 250 mM NaCl , 80 mM Imidazol) gewaschen. Im Anschluss wurde das BL21 (DE3) *E. coli*-Lysat mit der CaOAS-TL (Vektor: pET3d) durch Zirkulation für 2 h über die Säule an AtSAT gebunden und nach dem Waschen mit Puffer durch Zugabe von OAS (50 mM TrisHCl (pH 8) , 250 mM NaCl , 80 mM Imidazol, 10 mM OAS) eluiert. Das Eluat hatte eine gelbe Färbung, was vermuten lässt, dass der Kofaktor PLP gebunden war (Tantaleán *et al.*; 2003). Eine schematische Darstellung der Reinigung von CaOAS-TL ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Elution der AtSAT erfolgte durch Zugabe von Imidazol (50 mM TrisHCl (pH 8) , 250 mM NaCl , 400 mM Imidazol). Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.



2.11 Heterologe Überexpression und Reinigung von XopC und AvrBs3

XopC, XopC_{D693A} und AvrBs3 wurden jeweils in den Vektor pDEST17 rekombiniert. Dieser erlaubt die Expression des Zielproteins mit N-terminaler His₆-Fusion. Die Proteine wurden in BL21 (DE3) (AvrBs3 und XopC_{D693A}) bzw. Rosetta (DE3) pLysS (XopC) exprimiert. Die *E. coli*-Lysate wurden jeweils auf einer mit NiCl₂ beladenen HiTrap-Säule für 2 h zirkuliert und die Säule anschließend mit Puffer (50 mM TrisHCl (pH 8) , 250 mM NaCl , 80 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte mittels Imidazol (50 mM TrisHCl (pH 8) , 250 mM NaCl , 400 mM Imidazol). Alle Schritte erfolgten auf Eis.

2.12 OAS-TL-Aktivitätsbestimmung

Grundlage des Aktivitätstests ist die Synthese von Cystein aus O-Acetylserin (OAS) und Na₂S durch OAS-TL. Nach Fällung der Proteine durch Zugabe von 20 %iger Trichloressigsäure (TCA), bildet das entstandene Cystein mit dem zugebenen Ninhydrin einen Komplex, welcher sich photometrisch (OD₅₆₀) quantifizieren lässt (Gaitonde, 1967).

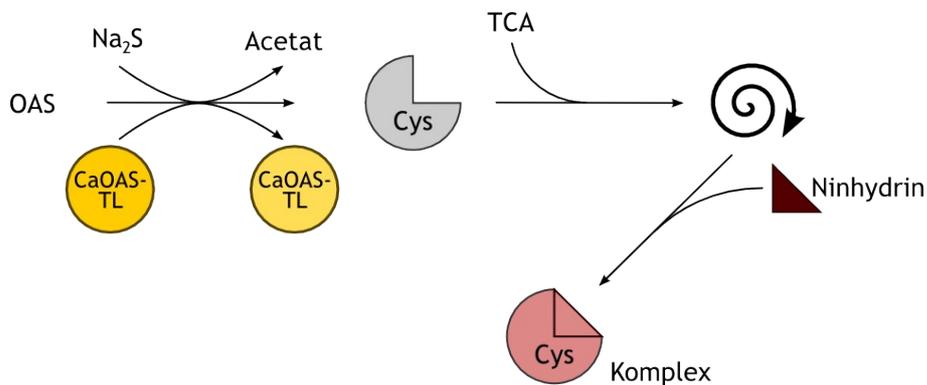


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der OAS-TL-Aktivitätsbestimmung.

Durch die Formel

$$\text{gemessene OD} * 36,6 = \text{nmol Cystein} / \text{OD}_{560=1}$$

lässt sich die Menge synthetisierten Cysteins berechnen. 36,6 ist dabei der Extinktionskoeffizient des Cystein-Ninhydrin-Komplexes.

Durch die Formel

$$\text{gemessene OD} * 36.6 / \text{ng eingesetzte OAS-TL} / \text{Zeit in min}$$

wird die spezifische Aktivität von OAS-TL beschrieben.

Für jeden Ansatz wurden alle Komponenten außer OAS des Assays (50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM Na₂S, 5 mM DTT, 2 ng CaOAS-TL, entsprechende Menge XopC bzw. Kontrollprotein) vorgelegt und mit H₂O auf 90 µl aufgefüllt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 µl OAS (Endkonzentration 10 mM). Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Reaktionen durch Zugabe von 50 µl 20 %iger TCA abgestoppt. Nach der Sedimentation wurden die Überstände quantitativ abgenommen und bei 100°C mit jeweils 200 µl Ninhydrin-Lösung (6,25 g Ninhydrin, 125 ml konzentrierte Salzsäure, 375 ml 100%ige Essigsäure)/100 µl 100%iger Essigsäure für 10 min inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach der Verdünnung mit je 550 µl absolutem Ethanol wurde die OD bei 560 nm gemessen. Als Blindwert diente ein Ansatz, in dem schon zu Beginn TCA vorlag.

2.13 1,3- β -Glucanase-Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität der 1,3- β -Glucanase im Pflanzenextrakt wurde ein Aktivitätstest nach Abeles & Forrence, 1970 und Miller, 1959 durchgeführt. Dieser beruht auf der Fähigkeit von 1,3- β -Glucanase, einzelne Glukosemoleküle von langkettigen, (1 \rightarrow 3)- β -D-verknüpften Oligozuckern abzuspalten. Reduzierende Monozucker reduzieren Dinitrosalizylsäure (DNS) zu 3-Amino-5-nitrosalizylsäure, welche optisch aktiv ist und photometrisch bei OD₅₄₀ quantifiziert werden kann. Als Substrat für 1,3- β -Glucanase wurde Laminarin, ein (1 \rightarrow 3)- β -D-Glukan, verwendet. Ein Glukosestandard diente zu Erstellung einer Eichreihe.

2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotanalysen

Proteine wurden mittels SDS-PAGE in 10 %igen Gelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zur Färbung der Proteine im Gel wurde eine Mischung aus Coomassie R-250 und G-250 verwendet. Für Immunoblotanalysen wurden die Proteine auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) übertragen und unter Verwendung entsprechender primärer und sekundärer Antikörper (Tab. 2.7) markiert. Die Detektion erfolgte durch das Verfahren der verstärkten Chemilumineszenz (ECL, GE Healthcare) mittels der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP).

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Organismus	Referenz
anti-cMyc	Maus	Roche, Mannheim
anti-HA	Ratte	Roche, Mannheim
anti-GFP	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe
anti-His ₅	Maus	Qiagen, Hilden
anti-OAS-TL	Kaninchen	Markus Wirtz, COS, Heidelberg
HRP-gekoppelt anti-ratIgG	Ziege	Sigma, St. Louis, USA
HRP-gekoppelt anti-rabbitIgG	Esel	GE Healthcare, Freiburg
HRP-gekoppelt anti-mouseIgG	Schaf	GE Healthcare, Freiburg

2.15 Nicht-polare Mutagenese in *Xcv*

2.15.1 Deletion des *xopC*-ORFs in *Xcv* 85-10

Es wurden per PCR zwei Fragmente erstellt. Das erste Fragment umfasst 1397 bp aufwärts von *xopC* und wurde 5' mit einer BamHI- sowie 3' mit einer HindIII-Restriktionsschnittstelle versehen. Das zweite Fragment umfasst 1408 bp abwärts von *xopC* und wurde 5' mit einer HindIII- sowie 3' mit einer XbaI-Restriktionsschnittstelle versehen. Beide Fragmente wurden in den Vektor pJET1.2/blunt zwischenkloniert. Ausgehend von diesen zwei Konstrukten erfolgte der Verdau der Fragmente mit anschließender Ligation beider Fragmente in dem Vektor pOK1. Das resultierende Konstrukt pOK1 Δ *xopC* wurde mittels triparentaler Konjugation in den *Xcv*-Stamm 85-10 eingeführt. Im Anschluss wurden die Doppelrekombinationsereignisse, welche zu einer *xopC*-Deletion führten, selektiert (Huguet *et al.*, 1998).

2.15.2 Reintegration von *xopC* in das Genom von *Xcv* 85-10 Δ *xopC*

Der Vektor pLAND, bei dem es sich um ein Derivat des pOK1-Vektors handelt, ermöglicht die Integration von Zielsequenzen in das Genom von *Xcv* zwischen den Genen *hpaF* und *hpaG* (Lorenz & Büttner, unveröffentlicht). Der ORF von *xopC* wurde mittels GoldenGate-Klonierung in pLAND eingeführt. Das resultierende Konstrukt pLAND_*xopC* wurde wie in 2.15.1 beschrieben in *Xcv* 85-10 Δ *xopC* eingeführt. Da pLAND einen *lac*-Promotor und eine Sequenz für die C-terminale c-Myc-Epitopmarkierung des Zielproteins mitbringt, konnte die erfolgreiche Reintegration mittels Immunoblotanalyse überprüft werden.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Untersuchung von XopC

Um eine Vorstellung von der Funktion eines Proteins zu bekommen, können homologe Proteine bzw. funktionell wichtige Sequenzen aus anderen Organismen ein guter Ansatzpunkt sein, vor allem, wenn deren Funktion bekannt ist.

Durch bioinformatische Analysen (*InterproScan*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) wurde eine Phosphoribosyltransferase-Domäne für die As 297 bis 340 sowie eine *haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase-superfamily*-Domäne für die As 506 bis 795 von XopC vorhergesagt. Daher wurde die Sequenz der As 506 bis 795 von XopC in zwei unabhängigen Programmen zur Strukturmodellierung analysiert.

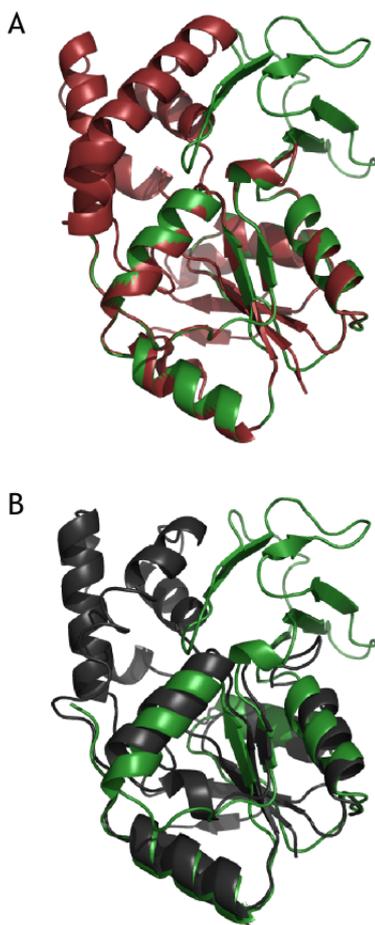


Abb. 3.1: XopC lässt sich auf *HAD-like* Hydrolasen modellieren.

A, Überlagerung der bekannten Struktur einer *HAD-like*-Hydrolase aus *Bacteroides fragilis* (3D6J.pdb, rot) mit der modellierten Struktur von XopC (As 506-795, grün); B, Überlagerung der bekannten Struktur einer Phosphoglycolat-Phosphatase aus *Aquifex aeolicus* (2YY6.pdb, grau) mit der modellierten Struktur von XopC (As 506-795, grün).

Modell: SwissModel; Bild: Pymol

3 ERGEBNISSE

Die Strukturmodellierung der As 506 bis 795 (*SwissModel*; Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Peitsch, 1995; *I-TASSER*; Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010) zeigte, dass nicht nur Sequenz-, sondern auch Strukturhomologie vorliegt. Eine Übereinstimmung mit der potenziellen *HAD-like*-Hydrolase aus *Bacteroides fragilis* (3D6J.pdb) konnte vorhergesagt werden (Abb. 3.1A). Die modellierte Struktur von XopC und die bekannte Struktur einer Phosphoglycolat-Phosphatase aus *Aquifex aeolicus* (2YY6.pdb), welche zur *HAD-like*-Hydrolase-Superfamilie gehört, zeigten trotz einiger Unterschiede eine ähnliche Struktur (Abb. 3.1B). Eine Strukturmodellierung für die As 297 bis 340 von XopC, für die eine Phosphoribosyltransferase-Domäne vorhergesagt wurde, blieb ergebnislos.

Weiterhin wurden zu XopC homologe Proteine gesucht. Im Laufe der Arbeiten an XopC wurden mittels einer Datenbank-gestützten Sequenzsuche von *BLASTP* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Proteine mit Homologie zu XopC, welches bislang als einzigartig galt, in *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (*Xcm*), *Ralstonia* (*R.*) *solanacearum*, *Xanthomonas campestris* (*X.c.*) pv. *campestris*, *X.c.* pv. *vitians* sowie dem Protozoon *Trichomonas* (*T.*) *vaginalis* gefunden (Abb.3.2). XopC aus *Xcm* ist zu 100% homolog zu XopC aus *Xcv* (nicht gezeigt), jedoch ist über dessen Funktion in *Xcm* nichts bekannt. Bei den anderen zu XopC homologen Proteinen wurde eine starke Sequenzidentität der As im C-terminalen Bereich von As 503 bis 772 von XopC aus *Xcv* mit den Homologen aus anderen *Xanthomonas* spp. festgestellt (Abb.3.2). Bei drei Homologen (*X.c.* pv. , *X.c.* pv. *vitians*, *T. vaginalis*) fehlen die ersten 495 As, bei dem Homolog aus *R. solanacearum* die ersten 491 As von XopC aus *Xcv*. Somit beschränken sich die Homologien auf den C-terminalen Bereich von XopC. Die Sequenzidentität zwischen dem C-terminalen Bereich von XopC und den homologen, partiellen Proteinen aus *X.c.* pv. *campestris* und aus *X.c.* pv. *vitians* beträgt 96 bzw. 99%. Der zu XopC homologe, potenzielle Typ-III-Effektor (RCFBP_mp20032 bzw. Rsp 1239) aus *R. solanacearum* weist eine Aminosäureidentität von 65% zu den As 503 bis 780 von XopC auf. Ein weiteres Homolog zu XopC, welches nicht aus der Familie der Pflanzenpathogene stammt, sondern aus dem Protozoon *T. vaginalis*, gehört zur Familie der *haloacid dehalogenase* (*HAD*)-*like* Hydrolasen. Hierbei konnten Ähnlichkeiten der As 506 bis 795 von XopC zur *HAD-like hydrolase* aus *T. vaginalis* (UniProt A2EVG6; Carlton *et al.*, 2007) ermittelt werden.

Daraus wurde geschlussfolgert, dass zumindest ein partielles XopC in einigen *Xanthomonas* spp. konserviert ist, sich diese Konservierung allerdings auf den C-terminalen Bereich des Proteins beschränkt. XopC und homologe Proteine besitzen eine potenzielle *HAD-like* Hydrolase-Domäne.

3 ERGEBNISSE

<i>X.c. vesicatoria</i>	4 9 6	S R S S I Q A S E V K Q V V V L D W D D C L R D E K G L N Y K L M H N A L A I T A R E H A S T L P E L G D A V
<i>X.c. campestris</i>	1	----- - E V K Q V V V L D W D D C L R D E K G L N Y K L M H N A L A I A A R E H A S T L P E L G D A V
<i>X.c. vitians</i>	1	----- - S E V K Q V V V L D W D D C L R D E K G L N Y K L M H N A L A I T A R E H A S T L P E L G D A V
<i>Ralstonia</i>	9 4	A K A A P N A S D V K P V V V L D W D D C L R Y E K G M N Y Q L V H N A L V I A A R M H A Q S L P E L A E A V
<i>HAD-like</i>	1	----- - M A K V W F P Y P -----
consensus	4 9 6 *
<i>X.c. vesicatoria</i>	5 5 1	A V L H S K L N G A E P V D E E A P L L M K N O K D F S S Y L M G R O S I Y K R H I I E D F V R K M L P G I S
<i>X.c. campestris</i>	4 8	A V L H S K L N D A G P V D D E A P L L M K N O K D F S S Y L M G R P S I Y K R H I I E D F V R K M L P G I S
<i>X.c. vitians</i>	4 9	A V L H S K L N D A E P V D E E A P L L M K N O K D F S S Y L M G R O S I Y K R H I I E D F V R K M L P G I S
<i>Ralstonia</i>	1 4 9	D R L H A R M Q R G E Q P G D G D P L T M K S Q E D C E N Y L A A N S G I Y K R G L V Q D F V R T M L P D I D
<i>HAD-like</i>	9	----- - I K A A V F D C D G V L L D T I P T Y R K V N S I I I G E E Y P D W F
consensus	5 5 1 *
<i>X.c. vesicatoria</i>	6 0 6	E H K A A S I N N A V Y S N F V R E Y K M L V K P E V S K K N Y S R D V P F P D I E L S L L P G A K E I L E K
<i>X.c. campestris</i>	1 0 3	E H K A A S I N N A V Y S N F V R E Y K R L V K P E S K K N Y S R D V P F P D I E L S L L P G A K E I L E K
<i>X.c. vitians</i>	1 0 4	E H K A A S I N N A V Y S N F V R E Y K M L V K P E V S K K N Y S R D V P F P D I E L S L L P G A K E I L E K
<i>Ralstonia</i>	2 0 4	S S M A E A I T D A A Y T Q C A L E Y N R L M A A P D Q K E S W R Q D L P F P D V R I A L M P G A R E L L D T
<i>HAD-like</i>	4 5	N L N N G R T D I E S C R N I I N H Y K I N L T P E E M V K L R F Q Y D K M F P E C S L V P G V E R I V K T
consensus	6 0 6 *
<i>X.c. vesicatoria</i>	6 6 1	S R N A N S R V I L I S N R G H G D L E N E I N - H L G M M H Y F D V V S G A E E V T L E K S H L P P S O M P
<i>X.c. campestris</i>	1 5 8	S R N A N S R V I L I S N R G H G D L E N E I N - H L G M M H Y F D V V S G A E E V T L E K S H F P P S O M P
<i>X.c. vitians</i>	1 5 9	S R N A N S R V I L I S N R G H G D L E N E I N - H L G M M H Y F D V V S G A E E V T L E K S H L P P S O M P
<i>Ralstonia</i>	2 5 9	S R A E G S P V I L I S N R A H S D L Q K E V R - Y L G M Q Q D F D V V S G A P T I T D K K S K T T P S P M P
<i>HAD-like</i>	1 0 0	L K Q I G L K I G I A T S S L R H D Y E N K I Q N H R D F E K Y F D Y L C G D E V S H A K P D P -----
consensus	6 6 1 *
<i>X.c. vesicatoria</i>	7 1 5	E D L O K R L I N S L N G S D E E A L R A T L S E A A I Y A H P D S T T I E R I D K K P D S T R L A E S L E R
<i>X.c. campestris</i>	2 1 2	E D L O K R L I N S L N G S D E E A L R A T L S E T A I Y A H P D S T A I G R I D K K P D S T R L A E S L E R
<i>X.c. vitians</i>	2 1 3	E D L O K R L I N S L N G S D E E A L R A T L S E A A I Y A H P D S T T I E R I D K K P D S T R L A E S L E R
<i>Ralstonia</i>	3 1 3	Q T L E Q Q L I A A L K G D D D G A L R T A L E A A S P Y A H P N T T S V K Q T D H K E R D T R L L N G L E R
<i>HAD-like</i>	1 4 9	- F Q K A A A H I C D F P P E N V L V F E D A A S G I K A A N S A N M P S V L L W R Q V K P D E S L N K
consensus	7 1 6 *
<i>X.c. vesicatoria</i>	7 7 0	L S V Q P N V P I T S Y G D Q P S D I K Q L K S V A E P K S R V L K G V I V N A Q R D D V G R E I D V D G V P
<i>X.c. campestris</i>	2 6 7	L S V -----
<i>X.c. vitians</i>	2 6 8	L S V -----
<i>Ralstonia</i>	3 6 8	L S V P S D A P I V L Y G D Q E S D I S Q A A T L A A A G R H V E G - V L I D P G R D D V G Q Q I G I Q G I P
<i>HAD-like</i>	2 0 3	L E A K P T L I I N S E D D F N F E S F D F E T K -----
consensus	7 7 1	*

Abb. 3.2: XopC hat Homologe in *Xanthomonas* spp., *R. solanacearum* und *T. vaginalis*.

XopC-Homologe aus *X.c. pv. campestris* und *X.c. pv. vitians* haben im gezeigten Bereich des Proteins 96% bzw. 99% Identität mit der Sequenz von XopC. Für Rsp 1239 aus *R. solanacearum* beträgt die As-Identität 65%. Die *HAD-like* Hydrolase aus *T. vaginalis* zeigt Ähnlichkeit zu XopC. Xc, XopC(-Homolog) aus *Xanthomonas campestris* pv.; *Ralstonia*, Rsp1239 aus *R. solanacearum*; *HAD-like*, *HAD-like* Hydrolase aus *T. vaginalis*. Zahlen kennzeichnen die As-Position bezogen auf das Volllängenprotein. X, identische As; X, ähnliche As. ClustalW, Bild: BoxShade.

3.2 XopC lokalisiert im Zytoplasma und im Nukleus der Pflanzenzelle

Um Hinweise auf die mögliche Funktion von XopC zu erhalten, wurden zunächst Lokalisierungsstudien von XopC als N- und C-terminales Fusionsprotein mit eGFP in pflanzlichen Zellen durchgeführt. XopC hat keine vorhergesagte Kernlokalisierungssequenz oder organellspezifische Transitpeptide.

Die Konstrukte für XopC-eGFP-Fusionsproteine wurden *Agrobacterium*-vermittelt unter der Kontrolle des CaMV (*cauliflower mosaic virus*)-35S-Promotors transient in Blättern der Modellpflanze *N. benthamiana* exprimiert, in der die Transformationseffizienz deutlich höher ist als in einer der Wirtspflanzen von *Xcv*, bislang aber keine Unterschiede zur Lokalisierung von Proteinen in Paprikazellen bekannt sind. Als Kontrollprotein diente eGFP.

3 ERGEBNISSE

48 Stunden nach Inokulation mit *Agrobacterium* wurden Proben entnommen und mit dem Laser Scanning-Mikroskop (LSM) analysiert.

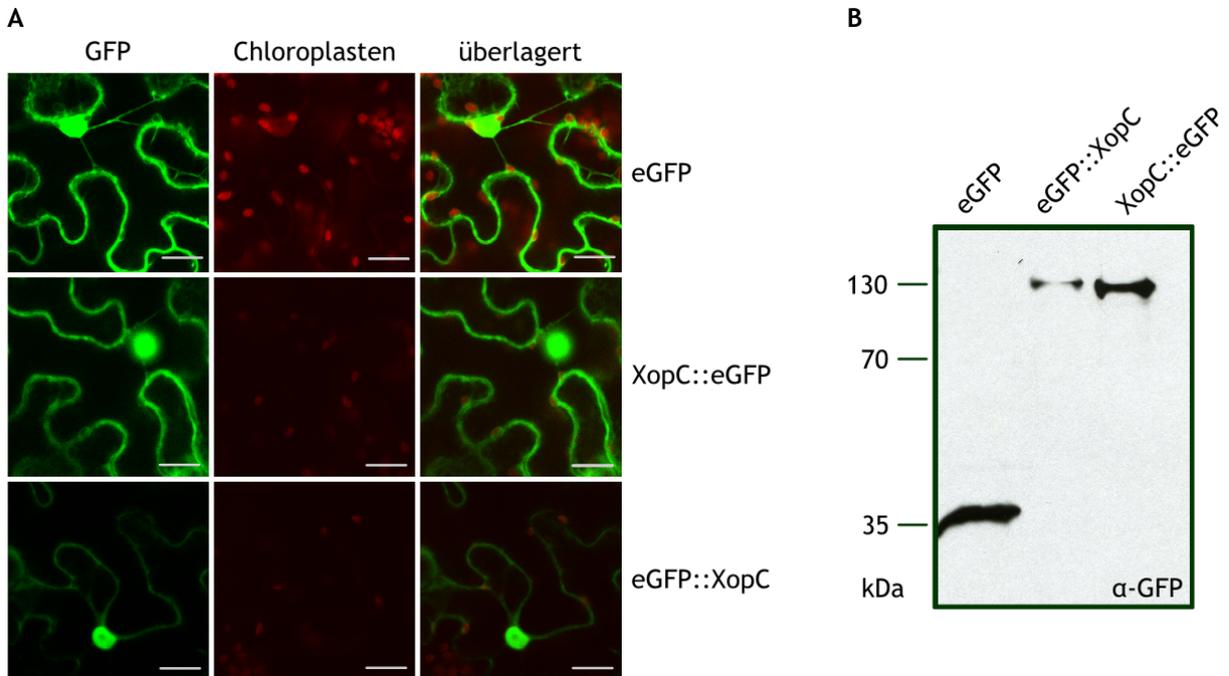


Abb. 3.3: XopC lokalisiert im Zytoplasma und dem Nucleus von *N. benthamiana*.

A, *Agrobacterium*-Stämme mit pK7WGF2, pK7FWG2_xopC oder pK7WGF2_xopC wurden in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert (10^9 Zellen/ml). Die Proben wurden 48 hpi analysiert. GFP, eGFP; XopC::GFP, XopC mit C-terminalem eGFP; GFP::XopC, XopC mit N-terminalem eGFP. Der Größenstandard beträgt 20 μ m.

B, Nachweis der XopC-eGFP-Fusionsproteine mittels Immunoblot mit GFP-spezifischen Antikörpern in Proteinextrakten aus inokuliertem Pflanzenmaterial (48 hpi).

Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten gezeigt.

Wie die Abbildung 3.3A zeigt, ist die Fluoreszenz von eGFP wie erwartet im Zytoplasma und dem Nucleus detektierbar (Abb. 3.3A oben). Beide eGFP-Fusionsproteine von XopC wurden ebenfalls sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus detektiert (Abb. 3.3A). In allen Proben sind zytoplasmatische Stränge zu erkennen.

Anhand des Immunoblots (Abb. 3.3B) lässt sich sagen, dass die XopC-eGFP-Fusionsproteine stabil waren und die detektierten Signale demnach nicht auf der Abspaltung von eGFP beruhten. Die geringere Fluoreszenz des eGFP::XopC-Fusionsproteins im Vergleich zu den eGFP- und XopC::eGFP-Proben korreliert mit dem in der Immunoblotanalyse beobachteten schwächeren Signalintensität.

3 ERGEBNISSE

3.3 Verschiedene Pflanzen zeigen keine Reaktion auf die transiente Expression von XopC

Um mögliche Virulenz- und Avirulenzaktivitäten von XopC zu identifizieren, wurde untersucht, ob XopC HR, Nekrose oder Chlorose in Pflanzen auslösen kann. Um dies zu testen, wurde XopC jeweils als C- (XopC::c-Myc) und N-terminales (c-Myc::XopC) Fusionsprotein mit einem vierfachen c-Myc-Epitop in Blättern von verschiedenen Pflanzen unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors transient exprimiert. Als Kontrollen dienten die jeweiligen Leervektoren (pGWB17 bzw. pGWB18). Untersucht wurden *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *S. americanum*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, *Physalis peruviana* und *S. alkekengi* sowie in *Capsicum annuum* ECW, ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R und ECW-123, weil es sich um Wirtspflanzen von *Xcv*, Solanaceen oder Pflanzen handelte, in denen schon Effekte von transient exprimierten Typ-III-Effektoren beobachtet wurden.

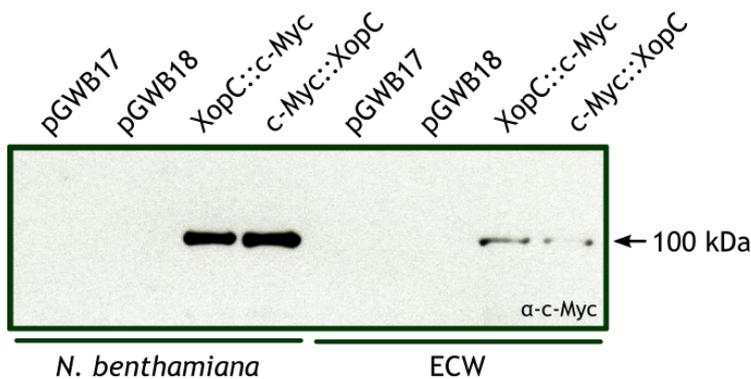


Abb. 3.4: XopC-cMyc-Fusionsproteine werden synthetisiert. Immunoblot mit c-Myc-spezifischen Antikörpern von Proteinextrakten aus mit *Agrobacterium*-inokulierten (4×10^9 Zellen/ml) Blättern (*N. benthamiana* bzw. *C. annuum* ECW, 2 dpi). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Zunächst wurde die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression der Konstrukte überprüft. Im Immunoblot wurde die c-Myc-Fusionsproteine von XopC unter Verwendung von c-Myc-spezifischen, polyklonalen Antikörpern zwei Tage nach der Transformation der Pflanzen mit *Agrobacterium* nachgewiesen. Die Synthese der XopC-c-Myc-Fusionsprotein wurde in allen untersuchten Pflanzen nachgewiesen, wofür in der Abb. 3.4 exemplarisch ein Immunoblot der Proben aus *N. benthamiana* und Paprika ECW-Pflanzen dargestellt ist.

Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde in keinem der analysierten Pflanzenblättern eine Reaktion festgestellt, die spezifisch auf XopC und nicht auf eine Reaktion der Pflanzen

3 ERGEBNISSE

auf die Infektion mit *Agrobacterium* zurückzuführen war. Dies ist hier exemplarisch für *N. benthamiana* und Paprika ECW-Pflanzen, sowie für *N. tabacum* gezeigt (Abb. 3.5).

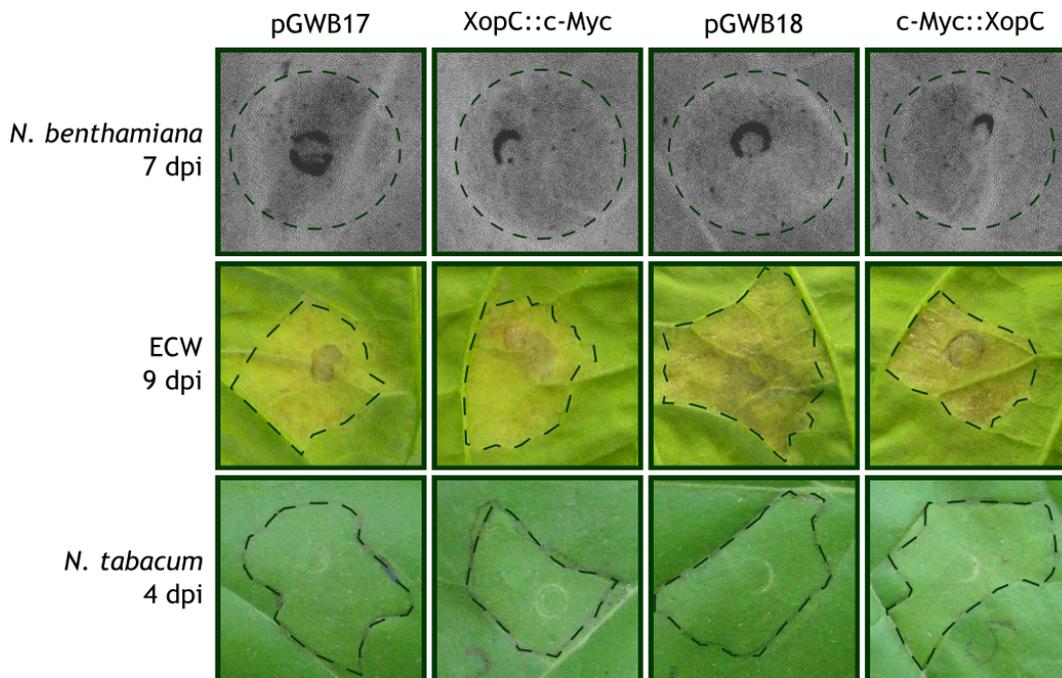


Abb. 3.5: *N. benthamiana*, Paprika ECW und *N. tabacum* reagieren nicht auf die Inokulation von *Agrobacterium*-Stämme mit den XopC-c-Myc-Fusionskonstrukten.

Agrobacterium-Stämme mit pGWB17, pGWB17_xopC, pGWB18 und pGWB18_xopC wurden in Blätter inokuliert (10^9 cfu/ml). Die Reaktionen der Pflanzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert. Die Linien markieren die inokulierten Bereiche. XopC::c-Myc, XopC mit C-terminalem c-Myc; c-Myc::XopC, XopC mit N-terminalem c-Myc. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

3.4 Die Deletion von *xopC* in *Xcv* 85-10 führt zu einer beschleunigten AvrBs1-HR in Paprika ECW-10R

Da keine spezifische Reaktion durch die transiente Expression von XopC der untersuchten Pflanzen beobachtet wurde, wurde untersucht, ob die Deletion von *xopC* in *Xcv* 85-10 einen Einfluss auf die Infektion von Paprika und Tomate hat. Hierfür stand aus vorangegangenen Arbeiten eine Deletionsmutante von *xopC* in *Xcv* 85-10 zur Verfügung (J. Gäbler, 2002). Die Überprüfung der Mutante zeigte, dass, anders als in der Diplomarbeit angegeben, die ersten 541 bp des 2505 bp ORFs von *xopC* und 459 bp *upstream* des ORFs, also im Bereich eines IS-Elements, deletiert waren. Somit war die Deletion von *xopC* unvollständig. Diese *xopC*-Deletionsmutante wird im Folgenden als *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁

3 ERGEBNISSE

bezeichnet. Für diese Mutante konnte im Rahmen der Diplomarbeit von Jana Gäbler keine veränderte Induktion der AvrBs1-abhängige HR von resistenten Paprikapflanzen (ECW-10R) im Vergleich zu *Xcv* 85-10 festgestellt werden. Es wurde auch kein Unterschied in der Ausprägung der Krankheitssymptome suszeptibler Paprikapflanzen (ECW) nach Inokulation mit *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁ beobachtet. Dies wurde zunächst in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁ in der Lage ist, die HR in Paprika ECW-10R-Pflanzen ca. zwölf Stunden früher zu induzieren als *Xcv* 85-10 (Abb. 3.6), wenn die Pflanzen Stress ausgesetzt wurden. Im vorliegenden Fall wurden die Pflanzen nicht unter optimalen Licht-, Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen inkubiert, sondern in einem verhältnismäßig kühlen und dunklen Labor.

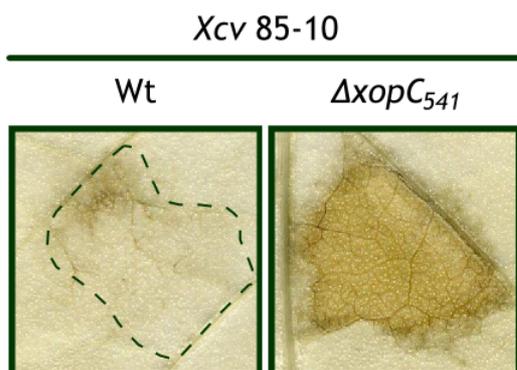


Abb. 3.6: *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁ löst die HR in Blätter von Paprika ECW-10R früher aus als *Xcv* 85-10. *Xcv* wurden mit einer Zelldichte von 10⁸ cfu/ml in die Blätter inokuliert und die Pflanzen im Labor inkubiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 dpi in Ethanol gebleicht. Die Linien markieren die inokulierten Bereiche. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten

Da bei der Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁ die Synthese eines partiellen XopC vom *Xcv* 85-10 Δ *xopC*₅₄₁-Locus nicht ausgeschlossen werden konnte, war es erforderlich, eine vollständige *xopC*-Deletion in *Xcv* 85-10 zu erstellen. Die Generierung einer *xopC*-Deletionsmutante wurde wie in Kapitel 2.15.1 beschrieben erstellt und mittels PCR-Analyse bestätigt. Es wurden vier unabhängige *Xcv* 85-10 *xopC*-Deletionsstämme erhalten, die im Folgenden als *Xcv* 85-10 Δ *xopC* bezeichnet werden.

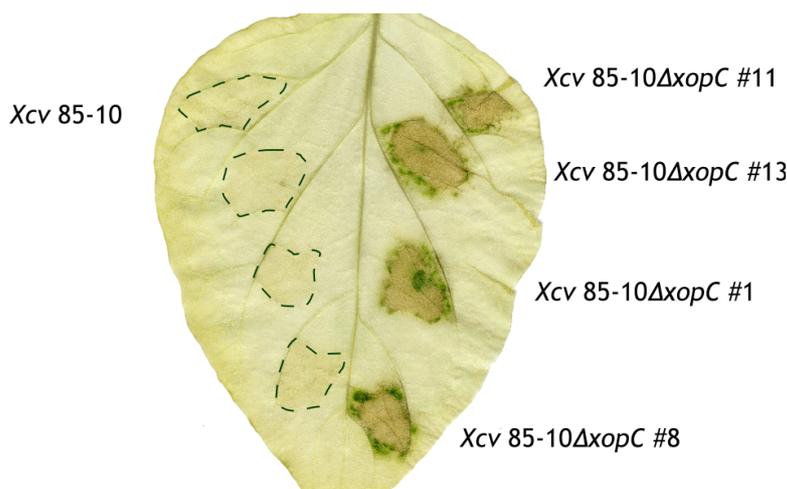


Abb. 3.7: *Xcv 85-10ΔxopC* #1, 8, 11 und 13 (rechts) lösen die HR in Blätter von Paprika ECW-10R früher aus als *Xcv 85-10* (links). *Xcv* wurden mit einer Zelldichte von 10^8 cfu/ml (OD 0,1) in die Blätter inokuliert und die Pflanzen im Labor zwei Tage inkubiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter in Ethanol gebleicht. Die Linien markieren die inokulierten Bereiche. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Alle vier generierten *Xcv 85-10ΔxopC* wurden in verschiedenen Zellsuspensionen unterschiedlicher optischer Dichte (0,05 bis 0,4) in ECW-10R inokuliert und auf die Fähigkeit untersucht, eine HR auf resistenten Paprikapflanzen auszulösen. Für alle vier $\Delta xopC$ -Mutanten konnte 2 dpi bei inokulierten Zelldichten von 10^8 cfu/ml, wie schon zuvor für $\Delta xopC_{541}$, die HR ca. zwölf Stunden früher in Abhängigkeit von der Inkubation der Pflanzen im Labor im Vergleich zu *Xcv 85-10* beobachtet werden (Abb. 3.7). Alle weiteren Experimente wurden mit *Xcv 85-10ΔxopC* #11 durchgeführt.

Zur Komplementation der Deletion von *xopC* in *Xcv 85-10* wurde der Vektor pLAND benutzt (C. Lorenz & D. Büttner, unveröffentlicht), der die Expression des Zielgens unter der Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors sowie die translationelle Fusion eines c-Myc-Epitops am C-Terminus des Zielproteins und die Integration des Zielgens, in diesem Fall *xopC*, in das Genom von *Xcv 85-10* zwischen *hpaF* und *hpaG* ermöglicht (Kapitel 2.15.2). Über dieselbe Strategie wurde ein *xopC*-Derivat, welches eine Punktmutation in der Sequenz für die potenzielle Hydrolase-Domäne trug, in *Xcv 85-10ΔxopC* eingeführt.

Für die Aktivität von *HAD-like*-Hydrolasen ist ein Aspartat innerhalb von Motiv I essentiell (Collet *et al.*, 1998). Dieses Motiv ist auch in XopC vorhanden, sodass eine potentielle Aktivität von diesem abhängig sein könnte. Im Hefesystem wurde gezeigt, dass dieses Aspartat für die Funktion von XopC eine Rolle spielt (Salomon *et al.*, 2011). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das entsprechende Aspartat an Position 693 von XopC gegen Alanin ausgetauscht. Dieses Derivat wird im Folgenden XopC_{D693A} genannt.

Die Integration von *xopC* bzw. *xopC_{D693A}* in das Genom von *Xcv 85-10ΔxopC* wurde per PCR überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3 ERGEBNISSE

Der *Xcv* 85-10-Stamm, welcher eine Deletion von *xopC* am Ursprungslocus trägt und in dessen Genom *xopC* zwischen *hpaF* und *hpaG* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors reintegriert wurde, wird im Folgenden *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*) genannt, jener, der das *xopC*-Derivat trägt, wird als *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*_{D693A}) bezeichnet. Die Abbildung 3.8 zeigt ein Schema der relevanten genomischen Abschnitte in den verwendeten *Xcv* 85-10-Derivaten.

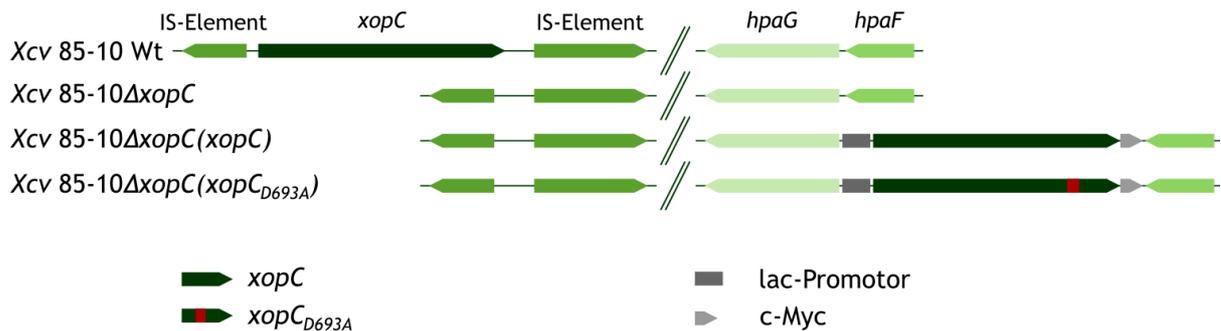


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der relevanten Bereiche des *Xcv* 85-10-Genoms und der generierten Derivate.

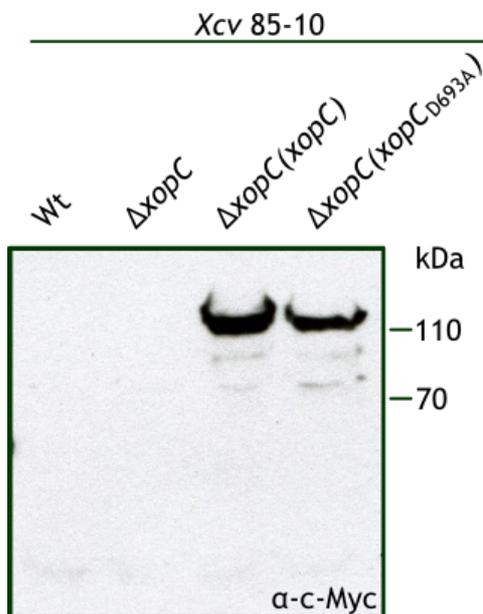


Abb. 3.9: XopC::c-Myc wird in *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*) und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*_{D693A}), jedoch nicht in 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *xopC* synthetisiert.

Die Sedimente von Flüssigkulturen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels spezifischer c-Myc-Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Die Synthese von XopC in *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*) bzw. XopC_{D693A} in *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*_{D693A}) wurde durch Immunoblotanalysen überprüft (Abb. 3.9). In den Proben

3 ERGEBNISSE

von *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*) und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*_{D693A}) wurde jeweils ein Signal für das jeweilige c-Myc-Fusionsprotein detektiert, erwartungsgemäß jedoch nicht in *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*.

3.4.1 Die Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC* induziert die HR in resistenten Paprikapflanzen früher als *Xcv* 85-10

Die Inkubation von infizierten Pflanzen im Labor stellte auf Grund schwankender Umgebungsfaktoren (Licht, Temperatur, etc.) keine reproduzierbare Stresssituation für die Pflanzen dar. Um reproduzierbare Stressbedingungen für die Pflanzen zu erzeugen, wurden Kältestress, Trockenstress, Dunkelstress und verschiedene Kombinationen dieser Bedingungen, sowie die Inokulation von *Xcv* mit bekannten Pflanzenhormonen (Salizylsäure bzw. Jasmonat) in Klimakammern und dem Gewächshaus getestet. Dabei konnten die unterschiedlichen Phänotypen nach Inokulation von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* jedoch nur unzureichend dargestellt werden.

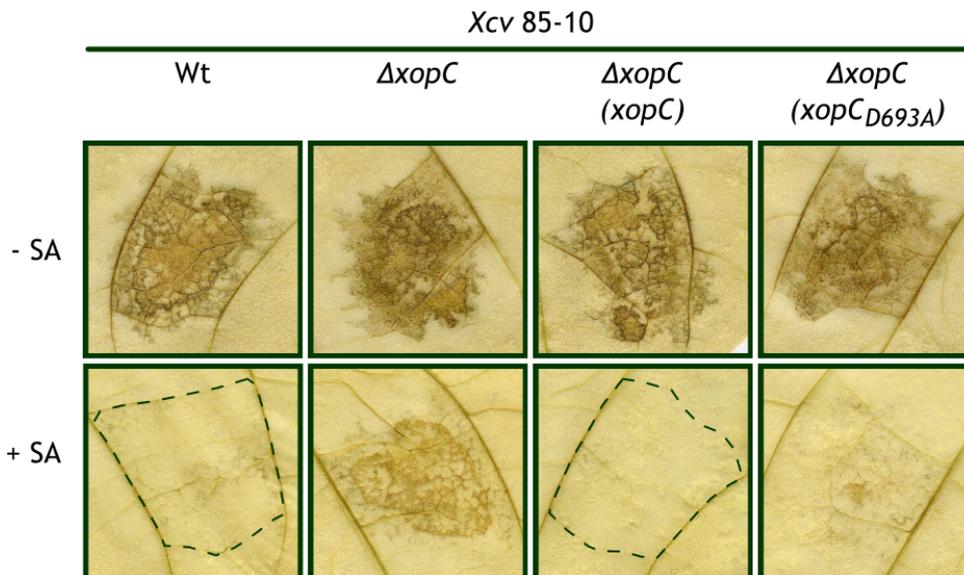


Abb. 3.10: *Xcv* 85-10 Δ *xopC* und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* (*xopC*_{D693A}) lösen die HR in Blättern von Paprika ECW-10R früher aus als *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*). *Xcv* wurden mit einer

Zelldichte von 10^8 cfu/ml in die Blätter inokuliert. Im Anschluss wurden die Pflanzen 20 h in einer Phytokammer (Percival) bei 16 h Licht, 26 °C inkubiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 1 dpi in Ethanol gebleicht. Die Linien markieren die inokulierten Bereiche. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zehn Experimenten.

-SA, ohne SA im Inokulationsmedium; +SA, 50 μ M SA im Inokulationsmedium

3 ERGEBNISSE

Die Inokulation von *Xcv* mit 50 μM Salizylsäure (SA) mit anschließender Inkubation der Pflanzen in einer Klimakammer unter Standardbedingungen erwies sich als geeignet, um den von XopC abhängigen Phänotyp der Paprika ECW-10R-Pflanzen als Reaktion auf *Xcv* verfolgen zu können. Wurde die Reaktion von Paprika ECW-10R-Pflanzen nach Inokulation mit *Xcv* ohne SA verfolgt, war kein Unterschied zwischen *Xcv* 85-10- und *Xcv* 85-10 Δ xopC-induzierter HR zu erkennen. In Anwesenheit von SA war dagegen die zuvor beschriebene Beschleunigung der HR in Abhängigkeit von XopC zu beobachten. Dieses konnte durch XopC (*Xcv* 85-10 Δ xopC(*xopC*)), jedoch nur partiell durch XopC_{D693A} (*Xcv* 85-10 Δ xopC(*xopC*_{D693A})) komplementiert werden (Abb. 3.10).

Um die beobachteten HR-Unterschiede in Paprika ECW-10R-Pflanzen quantifizieren zu können, wurden *electrolyte leakage*-Messungen (Kapitel 2.3.3) durchgeführt. Dabei wird die Leitfähigkeit als prozentualer Wert der maximalen Leitfähigkeit des Blattmaterials dargestellt. Dies repräsentiert den Fortschritt der HR, da im Verlauf des PCD tote Zellen Ionen freisetzen (Goodman & Novacky, 1994). Die ermittelten Leitfähigkeiten des mit MgCl₂ sowie mit *Xcv*-Stämmen behandelten Blattmaterials wurden 13 hpi (*hours post inoculation*) bestimmt (Abb. 3.11).

Als Kontrolle diente ein *Xcv*-Stamm, in dem *hrcN* deletiert wurde (*Xcv* 85-10 Δ *hrcN*). *HrcN* ist eine essentielle Komponente des T3SS, sodass die Deletion des Gens zu einem Pathogenitätsverlust führt (Lorenz & Büttner, 2009).

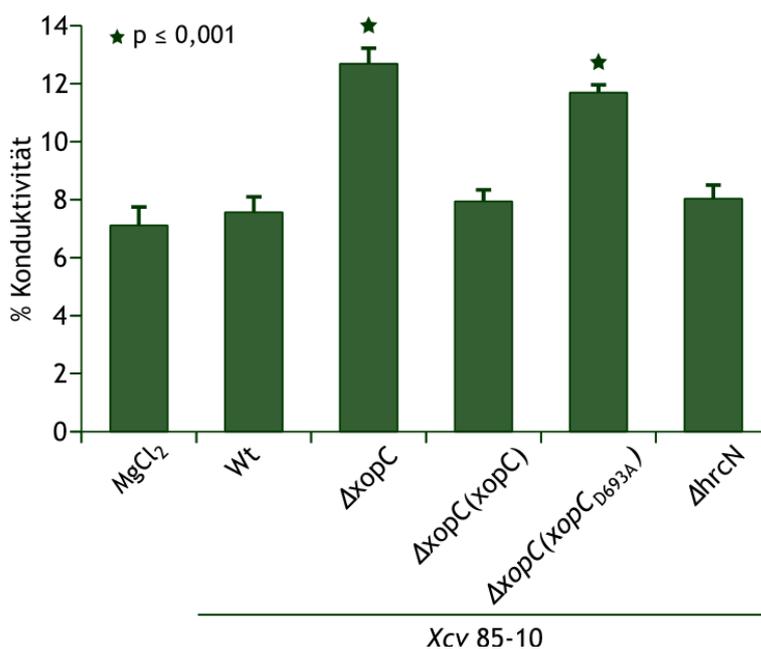


Abb. 3.11: *Xcv* 85-10 Δ *xopC* und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*_{D693A}), nicht jedoch *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC*(*xopC*) führen 13 hpi in Blättern von Paprika ECW-10R zu einem beginnenden Gewebekollaps.

Xcv wurden unter Zugabe von 50 μM SA mit einer Zelldichte von 10⁸ cfu/ml in die Blätter inokuliert. 13 hpi wurden Proben genommen und die Konduktivität des inokulierten Materials im Verhältnis zur Gesamtkonduktivität ermittelt. *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* dient als Negativkontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Für mit *Xcv* 85-10 inokulierte Blätter konnte eine Konduktivität vergleichbar mit der des mit $MgCl_2$ infiltrierten bzw. der Negativkontrolle *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* inokulierten Blattmaterials bestimmt werden. Dagegen wurde für die mit der Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokulierten Blätter eine signifikant höhere Konduktivität ermittelt. Dies konnte mit *XopC*, jedoch nicht mit *XopC*_{D693A} komplementiert werden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass 13 hpi nach der Inokulation mit *Xcv* das Absterben des mit *Xcv* 85-10 Δ *xopC* bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopC(xopC*_{D693A}) inokulierten Gewebes bereits begann. Das mit $MgCl_2$ infiltrierte bzw. mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* inokulierte Gewebe zeigte noch keine Hinweise auf eine beginnenden HR.

Die makroskopisch sichtbaren Unterschiede in der HR-Auslösung auf ECW-10R zwischen *Xcv* 85-10 und der Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC* sowie den Komplementationsderivaten korrelieren demnach mit den Ergebnissen der *electrolyte leakage*-Messungen. Demnach verzögert *XopC* die AvrBs1-abhängige HR.

3.4.2 Die Deletion von *xopC* hat keinen Einfluss auf die Reaktion suszeptibler Paprikapflanzen auf *Xcv* 85-10

Da *XopC* die Ausprägung der AvrBs1-abhängigen HR in Paprika ECW-10R beeinflusst, wurde auch der Effekt der *xopC*-Deletion in *Xcv* 85-10 bezüglich der Auslösung von wässrigen Läsionen in Blättern von suszeptiblen Paprika ECW-Pflanzen analysiert. Die Krankheitssymptome, die in Paprika ECW als Reaktion auf *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *xopC*, *Xcv* 85-10 Δ *xopC(xopC)* und *Xcv* 85-10 Δ *xopC(xopC*_{D693A}) zu beobachten waren, unterschieden sich jedoch zu keinem Zeitpunkt. Die Inokulation von *Xcv* mit Salicylsäure führte ebenfalls nicht zu einer Veränderung des Phänotyps (Abb. 3.12).

3 ERGEBNISSE

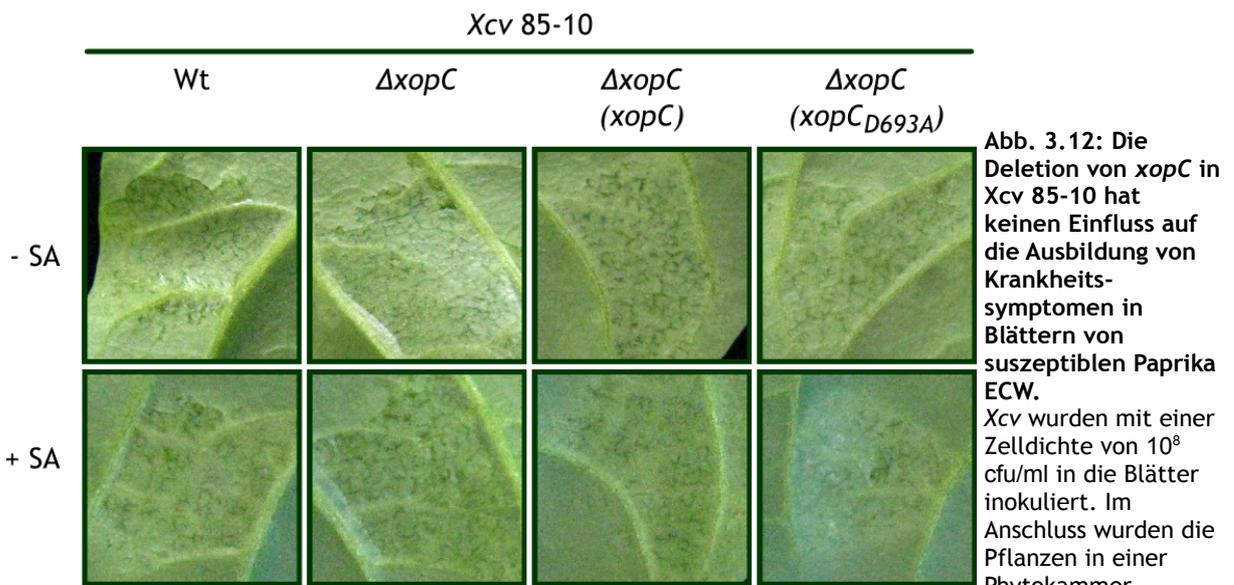


Abb. 3.12: Die Deletion von *xopC* in *Xcv* 85-10 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung von Krankheitssymptomen in Blättern von suszeptiblen Paprika ECW.

Xcv wurden mit einer Zelldichte von 10^8 cfu/ml in die Blätter inokuliert. Im Anschluss wurden die Pflanzen in einer Phytokammer

(Percival) bei 16 h Licht, 26°C inkubiert. Die Krankheitssymptome wurden 5 dpi dokumentiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

-SA, ohne SA im Inokulationsmedium; +SA, 50 µM SA im Inokulationsmedium

3.4.3 *XopC* verzögert die Ausbildung von Krankheitssymptomen in Tomate

Da *Xcv* 85-10 in der Lage ist, in Tomate (*Solanum lycopersicon*) Krankheitssymptome auszulösen, stellte sich die Frage, inwiefern die Deletion von *xopC* darauf einen Einfluss hat.

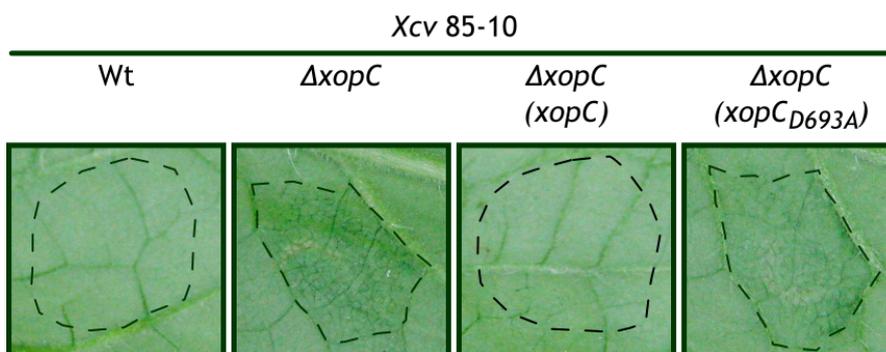


Abb. 3.13: *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$ und *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$ (*xopC*_{D693A}) lösen Krankheitssymptome in Blättern von Tomate Moneymaker früher aus als *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$ (*xopC*).

Xcv wurden mit einer Zelldichte von 10^8 cfu/ml in die Blätter inokuliert. Im Anschluss wurden die Pflanzen im Gewächshaus bei 16 h Licht, 25°C, 65% Luftfeuchte inkubiert. Die Krankheitssymptome wurden 5 dpi dokumentiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

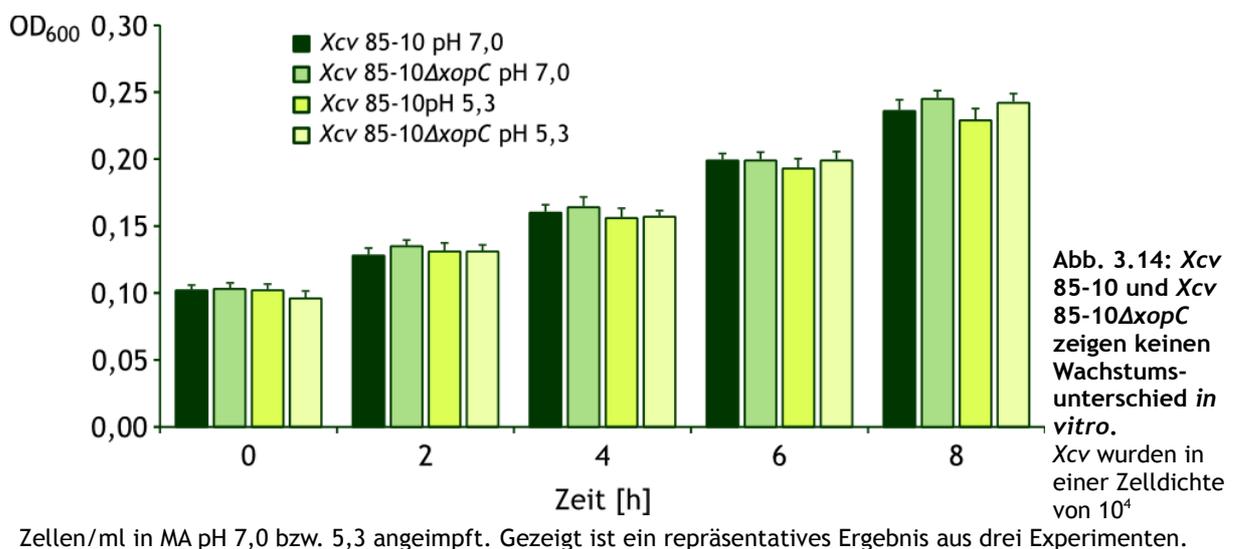
3 ERGEBNISSE

Nach der Inokulation von Blättern von *S. lycopersicon* cv. Moneymaker mit *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *xopC*, *Xcv* 85-10 Δ *xopC(xopC)* und *Xcv* 85-10 Δ *xopC(xopC_{D693A})* konnten unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden. Während die Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC* bereits fünf Tage nach Inokulation Symptome auslöste, waren diese für *Xcv* 85-10 erst sieben Tage nach Inokulation zu beobachten (Abb. 3.13). Dies wurde mit *XopC*, jedoch nicht mit *XopC_{D693A}* komplementiert.

Die Inokulation von *Xcv* mit SA führte bei den getesteten Tomatenpflanzen zu nekrotischen Flecken (Daten nicht gezeigt), sodass diese Bedingungen nicht getestet werden konnten.

3.5 Die Deletion von *xopC* führt nicht zu einer veränderten Wachstumsrate von *Xcv* 85-10

Wie im Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde ein Unterschied in der Ausbildung der HR bei der Inokulation von *Xcv* 85-10 und der Mutante *Xcv* 85-10 Δ *xopC* in Blätter von Paprika ECW-10R-Pflanzen beobachtet. Um zu prüfen, ob diese Unterschiede auf allgemeine Wachstumsunterschiede oder unterschiedliche Wachstumsraten der Stämme *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* *in planta* zurückzuführen waren, wurden Wachstumskurven dieser Stämme angefertigt.



3 ERGEBNISSE

Zunächst wurden *in vitro*-Wachstumskurven in Minimalmedium (MA) unter nicht-*hrp*-induzierenden (pH 7,0) und *hrp*-induzierenden (pH 5,3) Bedingungen aufgenommen. Es konnte in keinem Experiment ein deutlicher Wachstumsunterschied zwischen den beiden *Xcv*-Stämmen beobachtet werden (Abb. 3.14).

Um die *in planta*-Wachstumsraten der *Xcv*-Stämme zu bestimmen, wurden *in planta*-Wachstumskurven aufgenommen. Als Kontrolle diente wie bei den *electrolyte leakage*-Messungen ein *Xcv*-Stamm ohne funktionelles Typ-III-Sekretionssystem (*Xcv* 85-10 Δ *hrcN*), welcher nicht mehr pathogen ist. Das *in planta*-Wachstum von Δ *hrcN* ist stark reduziert (Dissertation C. Lorenz, 2009).

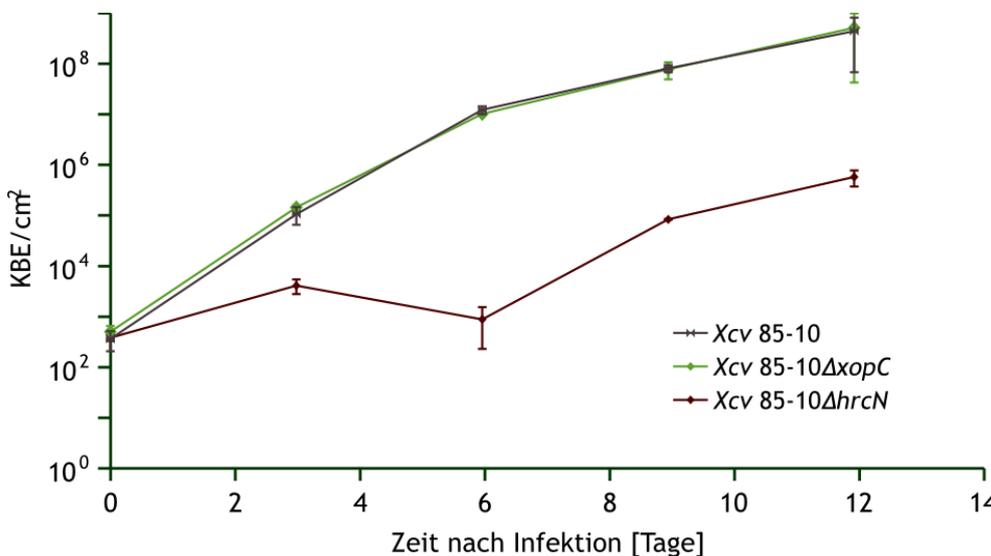


Abb. 3.15: *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* zeigen keinen Wachstumsunterschied *in planta*. *Xcv* wurden mit Zelldichten von 4×10^4 Zellen/ml in suszeptible ECW inokuliert. Das bakterielle Wachstum wurde über zwölf

Tagen analysiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Proben aus drei verschiedenen Pflanzen. KBE, Kolonie-bildende Einheit. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Auch *in planta* wurden keine Unterschiede im Wachstum der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *xopC* detektiert (Abb. 3.15). Anhand dieser Daten konnte ein allgemeiner Wachstumsvorteil von *Xcv* 85-10 Δ *xopC* gegenüber *Xcv* 85-10 ausgeschlossen werden.

3.6 XopC induziert die Expression von 1,3- β -Glucanase

Auf Grund der Fähigkeit zur Verzögerung der AvrBs1-HR scheint XopC die Abwehrmechanismen der Pflanze modulieren zu können. Um dies genauer zu untersuchen, wurden

3 ERGEBNISSE

die Transkriptakkumulationen verschiedener *PR* (*pathogenesis related*)-Gene während der Infektion von Paprika ECW-10R-Pflanzen mit den Stämmen *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* analysiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte (-), mit $MgCl_2$ infiltrierte sowie mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* inokulierte Blätter. Es wurden die Transkriptakkumulationen von insgesamt fünf verschiedenen *PR*-Genen (*PR1a*, *PR4*, *PR10*, *SGT1* und *1,3-B-Glucanase*) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion der Pflanzen mit *Xcv* mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert, wobei die Transkriptakkumulation des Elongationsfaktors 1 α (*EF-1a*) als Normierung dienten. Die Expression des *1,3-B-Glucanase*-Gens wurde 6 hpi reproduzierbar durch *Xcv* 85-10, nicht aber durch *Xcv* 85-10 Δ *xopC* induziert (Abb. 3.16A). Für die Markergene *PR1a*, *PR4*, *PR10* und *SGT1* waren die Analysen nicht auswertbar, da die Resultate in den biologischen Replikaten zu große Schwankungen zeigten.

Um die Transkriptakkumulationen zu quantifizieren, wurden qPCR-Analysen durchgeführt, wobei der *EF-1a* ebenfalls als Normierungsfragment diente. Mit $MgCl_2$ infiltriertes Pflanzenmaterial ($MgCl_2$) diente als Referenz für die Quantifizierung der Unterschiede in der Transkriptakkumulation der *1,3-B-Glucanase* in den Proben (Abb. 3.16B). Die ermittelten Transkriptmengen des *1,3-B-Glucanase*-kodierenden Gens waren für *Xcv* 85-10 Δ *xopC* und *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* kleiner als der Referenzwert. Dagegen konnte für *Xcv* 85-10 eine um den Faktor 300 höhere Expressionsrate im Vergleich zur Referenz und eine um den Faktor 1000 höhere Expressionsrate im Vergleich zu dem mit *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokulierten Blattmaterial bestimmt werden (Abb. 3.15B). Dies galt jedoch nur für Proben, die 4 oder 6 hpi der Pflanzen mit *Xcv* genommen wurden. Zu früheren (2 hpi) oder späteren (8 oder 12 hpi) Zeitpunkten ließ sich kein Unterschied in der Transkriptmenge der *1,3-B-Glucanase* zwischen mit *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokuliertem Blattmaterial nachweisen (Daten nicht gezeigt).

3 ERGEBNISSE

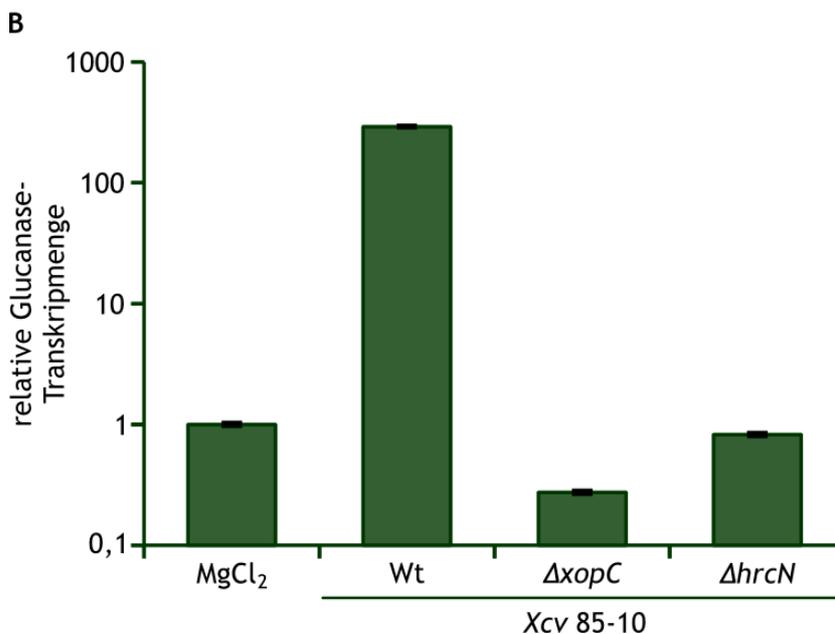
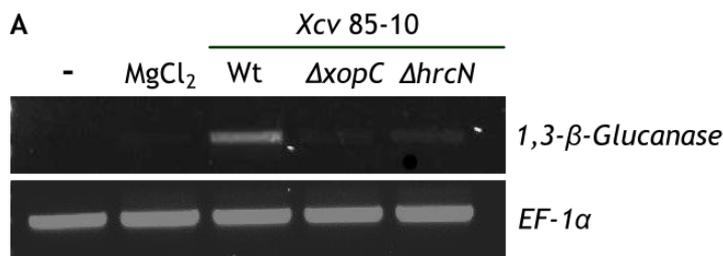


Abb. 3.16: 1,3- β -Glucanase-Transkripte akkumulieren 4 hpi von Paprika ECW-10R-Pflanzen mit Xcv 85-10, jedoch nicht nach Inokulation mit Xcv 85-10 $\Delta xopC$.

A, Semiquantitative RT-PCR. EF-1 α wurde als Kontrolle für identische RNA-Mengen benutzt. B, Quantitative real-timePCR. Die Transkriptmenge der 1,3- β -Glucanase in mit MgCl₂ inokuliertem Blattmaterial wurde 1 gesetzt. MgCl₂, mit Puffer infiltriertes Blattmaterial; 85-10, mit Xcv 85-10 inokuliertes Blattmaterial; $\Delta xopC$, mit Xcv 85-10 $\Delta xopC$ inokuliertes Blattmaterial; $\Delta hrcN$, mit Xcv 85-10 $\Delta hrcN$ inokuliertes Blattmaterial. Die Standardabweichungen sind angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Da durch die semiquantitative RT-PCR ein stärkeres Signal für mit Xcv 85-10 inokuliertes Material als für alle anderen analysierten Proben detektiert wurde und in der qPCR eine deutlich erhöhte Transkriptmenge für diese Probe im Vergleich mit den Kontrollen ermittelt wurde, kann geschlossen werden, dass die Anwesenheit von *xopC* in Xcv zu einer erhöhten Transkriptmenge der 1,3- β -Glucanase in den infizierten Pflanzen zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion führt.

Weiterführend wurde analysiert, ob die Steigerung der Transkriptmenge der 1,3- β -Glucanase zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms in den inokulierten Pflanzen führt, indem die Aktivitäten der 1,3- β -Glucanase der mit den Stämmen Xcv 85-10, Xcv 85-10 $\Delta xopC$ und Xcv 85-10 $\Delta hrcN$ behandelten Pflanzenproben gemessen wurden. Als Referenz diente hier ebenfalls mit MgCl₂ infiltriertes Blattmaterial. Zunächst wurde ein Aktivitätstest zur Bestimmung der 1,3- β -Glucanase-Aktivität etabliert. Dabei wird die Glukosemenge gemessen, die durch die 1,3- β -Glucanase *in vitro* von langkettigen Glukanen

3 ERGEBNISSE

abgespalten wird. Die 1,3-B-Glucanase des Extrakts aus mit $MgCl_2$ infiltriertem Blattmaterial hatte eine Gesamtaktivität, die nahezu identisch mit den Werten in mit *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$ bzw. *Xcv* 85-10 $\Delta hrcN$ infizierten Blättern war. Hingegen war die Gesamtaktivität der 1,3-B-Glucanase in mit *Xcv* 85-10 infizierten Blättern um den Faktor 1,7 erhöht (Abb. 3.17).

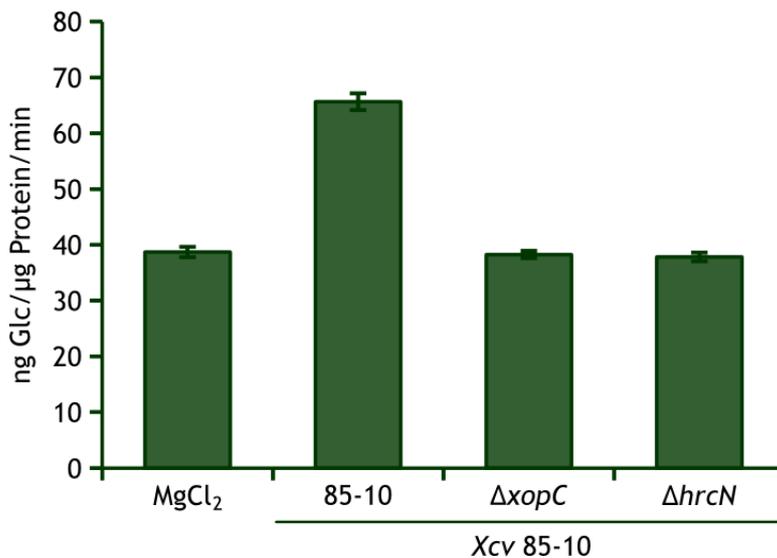


Abb. 3.17: Die 1,3-B-Glucanase-Aktivität in Proteinextrakten aus Paprika ECW-10R-Blättern 6 hpi mit *Xcv* 85-10 ist höher als 6 hpi mit *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$. 6 hpi wurden Proteinextrakte aus inokuliertem Blattmaterial gewonnen und auf 1,3-B-Glucanase-Aktivität untersucht. Es sind die Mittelwerte aus Triplikaten dargestellt, die Standardabweichungen sind angegeben. $MgCl_2$, mit $MgCl_2$ infiltriertes Blattmaterial; 85-10, mit *Xcv* 85-10 inokuliertes Blattmaterial; $\Delta xopC$, mit *Xcv* 85-10 $\Delta xopC$ inokuliertes Blattmaterial; $\Delta hrcN$, mit *Xcv* 85-10 $\Delta hrcN$ inokuliertes Blattmaterial. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die relative mRNA-Menge des 1,3-B-Glucanase-Gens sowie die Enzymaktivität der 1,3-B-Glucanase in Abhängigkeit von *xopC* in mit *Xcv* 85-10 infizierten Pflanzen erhöht werden.

3.7 Identifizierung von pflanzlichen XopC-Interaktoren

Für Effektoren wird im Allgemeinen angenommen, dass sie den pflanzlichen Metabolismus modulieren. Das legt die Vermutung nahe, dass zumindest einige Effektorproteine mit pflanzlichen Proteinen interagieren können, um diese direkt oder indirekt zu beeinflussen. Da XopC die AvrBs1-abhängige HR verzögert, wurde nach Wirtsproteinen gesucht, die mit XopC interagieren.

3.7.1 Hefe-Di-Hybrid-Analysen identifizieren einen XopC-Interaktor aus *C. annuum*

Zur Identifizierung von pflanzlichen Proteinen, die mit XopC interagieren, wurde eine Hefe-Dihybrid-Sichtung durchgeführt. Dabei diente XopC als Köder und eine Paprika-cDNA-Bibliothek als Beute (Kapitel 2.4). Der Reporterstamm wurde mit dem GAL4-AD::XopC-Fusionskonstrukt transformiert und zeigte keine Autoaktivierung. Die Paarung von Köder- und Beutestamm ergab $8,7 \times 10^6$ diploide Zellen. Nach sechs bis acht Tagen wurden 92 Kolonien isoliert, die auf Selektivmedium wuchsen. Aus diesen 92 Kolonien wurden die Beuteplasmide isoliert und die korrespondierenden Proteine gerichtet auf spezifische Interaktion mit XopC untersucht. Dazu wurde der Hefestamm AH109 mit dem GAL4-AD::XopC-Fusionskonstrukt und jeweils einem der Beuteplasmide kotransformiert. Als Kontrolle für die Spezifität wurde jeweils ein GAL4-AD::LaminC-Fusionskonstrukt mit jedem der 92 Beuteplasmide in AH109 kotransformiert. 80 Kandidaten zeigten bei Koexpression mit LaminC Reporteraktivität und galten somit als unspezifisch. Zwölf der identifizierten potenziellen XopC-Interaktoren zeigten bei Koexpression mit LaminC kein Wachstum auf Selektivmedium und galten somit als spezifisch. Die DNA-Fragmente der zwölf Beuteplasmide, welche die cDNAs der spezifischen Interaktoren trugen, wurden sequenziert. Auf Basis der Sequenzanalysen wurde in *C. annuum*-EST-Datenbanken (SolGene) nach annotierten *expressed sequence tags* (EST) gesucht. Dabei konnten alle zwölf Sequenzen, von denen einige identisch waren, der *consensusID* cacn7895 zugeordnet werden, welche einen ORF (*open reading frame*) von 978 bp beinhaltet (Abb. 3.18).

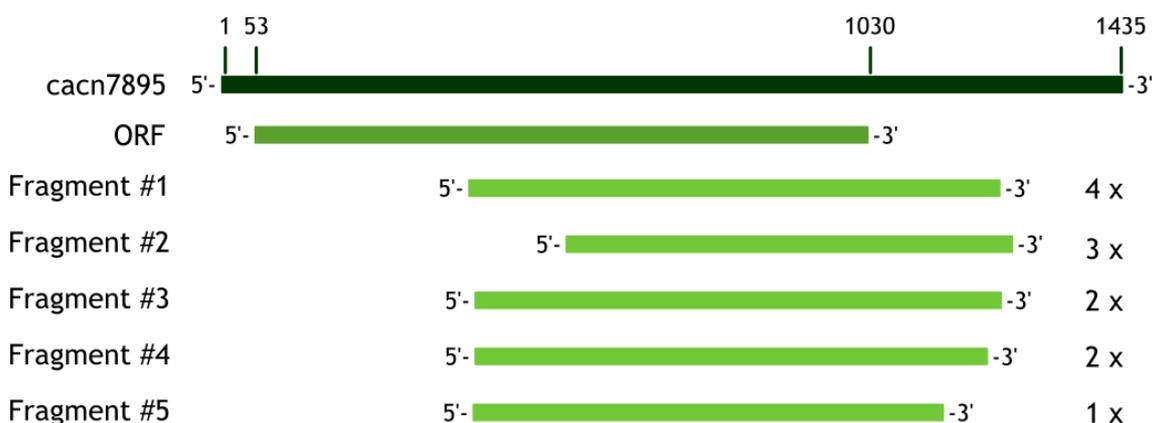


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der Fragmente der in der Hefe-Dihybrid-Sichtung gefundenen Beuteplasmide im Verhältnis zu cacn7895 und dem ORF.
Die Zahlen rechts zeigen die Häufigkeit des jeweiligen Fragmentes unter den zwölf spezifischen Interaktionspartnern.

3 ERGEBNISSE

In *BLASTN*-Analysen wurde neben einer nicht näher beschriebenen Tomaten-mRNA Homologie des ORFs aus *cacn7895* zum vollständigen ORF einer zytosolischen *O*-Acetylserin(thiol)lyase (OAS-TL) aus *S. tuberosum* gefunden.

Die GenBank-Akzessionsnummer der mRNA der cytosolischen *O*-Acetylserin(thiol)lyase aus *S. tuberosum* (*StOAS-TL*) lautet AB023951.2, die der resultierenden ORF, welche 978 bp enthält, BAB20861.1. In der Protein Knowledgebase (UniProtKB) findet man das *StOAS-TL*-Protein unter dem Namen Q9FS27_SOLTU.

Der in *cacn7895* enthaltene ORF enthält 978 bp und hat 94,4 % Nukleotidentität mit dem ORF der *StOAS-TL*. Das resultierende Protein aus dem in *cacn7895* enthaltenen ORF hat 96% Aa-Identität mit *StOAS-TL*.

Anhand dieser Information wurden Oligonukleotide für die Amplifikation des vollständigen ORFs aus *cacn7895* aus *C. annuum* cDNA abgeleitet. Der ORF, welcher vorläufig *Capsicum annuum OAS-TL* (*CaOAS-TL*) genannt wurde, wurde amplifiziert und in den Beutevektor des Hefe-Dihybrid-Systems kloniert.

Das resultierende Protein *CaOAS-TL* wurde auf Interaktion mit XopC in Hefe getestet.

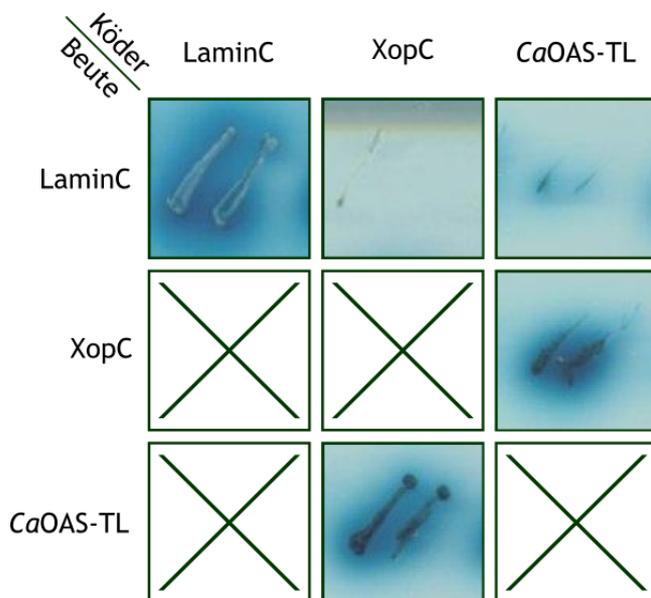


Abb. 3.19: Die Interaktion von XopC und CaOAS-TL in Hefe ist spezifisch.

Es wurden die Sequenzen von *laminC*, *xopC* und *CaOAS-TL* in den Ködervektor und in den Beutevektor eingeführt. Die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Hefen wurden auf Wachstum auf vierfach Selektivmedium und Reporteraktivität untersucht. LaminC diente als Positivkontrolle für das System und als Spezifitätskontrolle für die Interaktion zwischen XopC und CaOAS-TL. X, nicht getestet. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

LaminC diente in diesem Ansatz sowohl als Negativkontrolle für die Interaktion mit XopC und CaOAS-TL als auch als Positivkontrolle, da bekannt ist, dass LaminC dimerisiert (Havre & Evans, 1983). Wird der Reporterstamm AH109 mit einem GAL4-AD::LaminC- und einem GAL4-BD::LaminC-Fusionskonstrukt kotransformiert, ist die Hefe in der Lage, auf vierfach

3 ERGEBNISSE

Selektivmedium zu wachsen. Kotransformation mit GAL4-AD::*XopC*- bzw. GAL4-AD::*CaOAS-TL*-Fusionskonstrukten und GAL4-BD::*LaminC* führte nicht zum Wachstum von AH109. Koexpression von GAL4-AD::*XopC* und GAL4-BD::*CaOAS-TL* bzw. GAL4-AD::*CaOAS-TL* und GAL4-BD::*XopC* führte zum Wachstum der Hefe auf Selektivmedium. Somit konnte bestätigt werden, dass *XopC* und *CaOAS-TL* in Hefe spezifisch interagieren (Abb 3.19).

3.7.2 *CaOAS-TL* hat Homologie zu pflanzlichen, zytosolischen *O*-Acetylserin-(thiol)lyasen

Mittels *BLASTP* wurden zu dem vorhergesagten Proteins *CaOAS-TL* homologe Proteine identifiziert. *CaOAS-TL* zeigt Homologie zu mehreren zytosolischen *O*-Acetylserin(thiol)lyasen (*OAS-TL*) aus verschiedenen Pflanzen.

Tabelle 3.1: Pflanzliche, zytosolische *OAS-TLs* sind hochkonserviert.

Name	Organismus	Sequenzidentität
<i>StOAS-TL</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	96%
<i>OAS-TL</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	95%
<i>OAS-TL</i>	<i>Sesamum indicum</i>	89%
<i>OAS-TL</i>	<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i>	89%
<i>AtOAS-TLA</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87%
<i>OAS-TL</i>	<i>Citrullus lanatus</i> subsp. <i>vulgaris</i>	87%
<i>GsOAS-TL</i>	<i>Glycine soja</i>	85%
<i>OAS-TL</i>	<i>Triticum aestivum</i>	84%
<i>OAS-TL</i>	<i>Oryza sativa Japonica</i>	83%

Die Aminosäureidentität von *CaOAS-TL* mit pflanzlichen, zytosolischen *OAS-TLs* liegt im Allgemeinen bei über 80% (Tabelle 3.1).

3 ERGEBNISSE

CaOAS-TL	1	MAAEKNGLIAKDVTFLIGNTFLVYLNIVDGCVGRVAAKLESMLEPCSSV	KDRIGYSMLTDA	
AtOAS-TLA	1	MAISR--LAKDVTFLIGNTFLVYLNIVAGCVGRVAAKLEMMLEPCSSV	KDRIGYSMLTDA	
CaOAS-TL	61	EKGLIKPGESVLTLEPTSGNITGVGLAEMAAKGYKLITITMPESSMSL	FERRILLRAFGAELV	
AtOAS-TLA	58	EKGLIKPGESVLTLEPTSGNITGVGLAEMTAAKGYKLITITMPEASMSL	FERRILLRAFGAELV	
CaOAS-TL	121	LTDPKGMKGAISKAEETKAKTENSYLLOOFENPANPKLIHYETLGPETW	KGSNGKVDALV	
AtOAS-TLA	118	LTDPKGMKGAISKAEETLAKTENGYNLLOOFENPANPKLIHYETLGPETW	KGTGGKIDGFV	
CaOAS-TL	181	SGITGGTITGSCKYLRONPNIKLYGVPEPVESATLISGGKFGPHKLOGIG	AGFVPGVLEW	
AtOAS-TLA	178	SGITGGTITGAGKYLRONANVKLYGVPEPVESATLISGGKFGPHKLOGIG	AGFVPSVLEW	
CaOAS-TL	241	NLIDEVVQVSSPEESTEMAKLLAMKEGLLVGILSGAAAAAALKAKRPEN	SGKLFVVFPEPS	
AtOAS-TLA	238	DLIDEVVQVSSPEESIDMARQLALKEGLLVGILSGAAAAAALKLAKRPEN	AGKLFVALEPS	
CaOAS-TL	301	FGERYLSTVLEFDSVREAEENMIVPEP		⊠ Bildung der Schiff'schen Base
AtOAS-TLA	298	FGERYLSTVLEFDTAKREAEAMTFEIA		⊠ Interaktion mit PLP
				⊠ Interaktion mit dem Substrat

Abb. 3.20: CaOAS-TL hat typische Eigenschaften von OAS-TLs.

Weißes Zeichen auf rotem Grund, Bildung der Schiff'schen Base; weißes Zeichen auf blauem Grund, mit Pyridoxalphosphat interagierende Aminosäuren; weißes Zeichen auf grünem Grund, mit dem Substrat interagierende As; Schwarze Boxen, identische Aminosäuren; graue Boxen, Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften. AtOAS-TL, zytosolische OAS-TL aus *A. thaliana*; CaOAS-TL, zytosolische OAS-TL aus *C. annuum*. ClustalW, Bild: BoxShade.

OAS-TLs haben typische Eigenschaften, die auch bei CaOAS-TL zu finden sind. Dazu zählen eine Interaktionsstelle für den Kofaktor Pyridoxalphosphat (PLP), eine Interaktionsstelle für das Substrat *O*-Acetylserin sowie ein Lysin zur Bildung einer Schiff'schen Base mit dem Substrat während dessen Umsatz (Abb. 3.20).

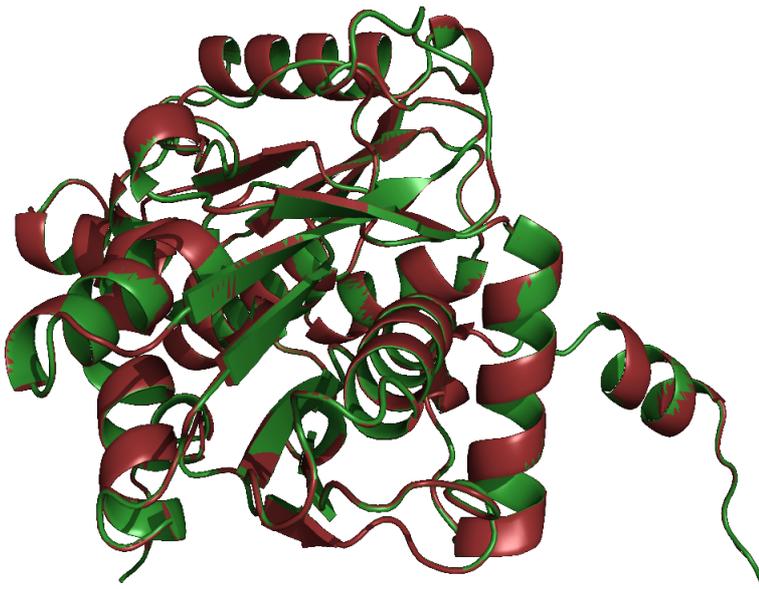


Abb. 3.21: CaOAS-TL lässt sich auf eine OAS-TL modellieren. Überlagerung der bekannten Struktur der zytosolischen OAS-TL aus *A. thaliana* (1Z7W .pdb, grün) mit der modellierten Struktur von CaOAS-TL (rot).

Bild: Pymol

CaOAS-TL konnte via SwissModel auf die Röntgenkristallstrukturen bekannter OAS-TLs modelliert werden, wie in der Abbildung 3.21 am Beispiel der gut untersuchten zytosolische OAS-TL aus *A. thaliana* (AtOAS-TL A; 1Z7W.pdb) dargestellt ist. Unterschiede zwischen beiden Molekülen sind nicht zu erkennen.

3.7.3 CaOAS-TL lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus

Auf Grund der Homologie von CaOAS-TL zu zytosolischen OAS-TLs aus anderen Pflanzenspezies und der Vermutung, dass es sich bei dem ermittelten Interaktionspartner von XopC (Kapitel 3.7.1) um ein zytosolisches Protein handelt, wurde die subzelluläre Lokalisierung von CaOAS-TL analysiert. Zu diesem Zweck wurde CaOAS-TL translationell C- bzw. N-terminal mit eGFP fusioniert. Die Konstrukte für CaOAS-TL-eGFP-Fusionsproteine wurden *Agrobacterium*-vermittelt unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors transient in der Modellpflanze *N. benthamiana* exprimiert. Als Kontrollprotein diente eGFP. 48 Stunden nach Inokulation mit *Agrobacterium* wurden Proben entnommen und mit dem LSM analysiert.

Wie Abb. 3.22A zeigt, ist die Fluoreszenz von eGFP wie erwartet im Zytoplasma und dem Nukleus der Pflanzenzellen detektierbar (Abb. 3.22A oben). Beide eGFP-Fusionsproteine von CaOAS-TL wurden ebenfalls sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus detektiert (Abb. 3.22A). In allen Proben sind zytoplasmatische Stränge zu erkennen. Anhand des Immunoblots (Abb. 3.22B) lässt sich sagen, dass die CaOAS-TL-eGFP-Fusionsproteine stabil waren und die detektierten Signale demnach nicht auf Abspaltung von eGFP beruhen.

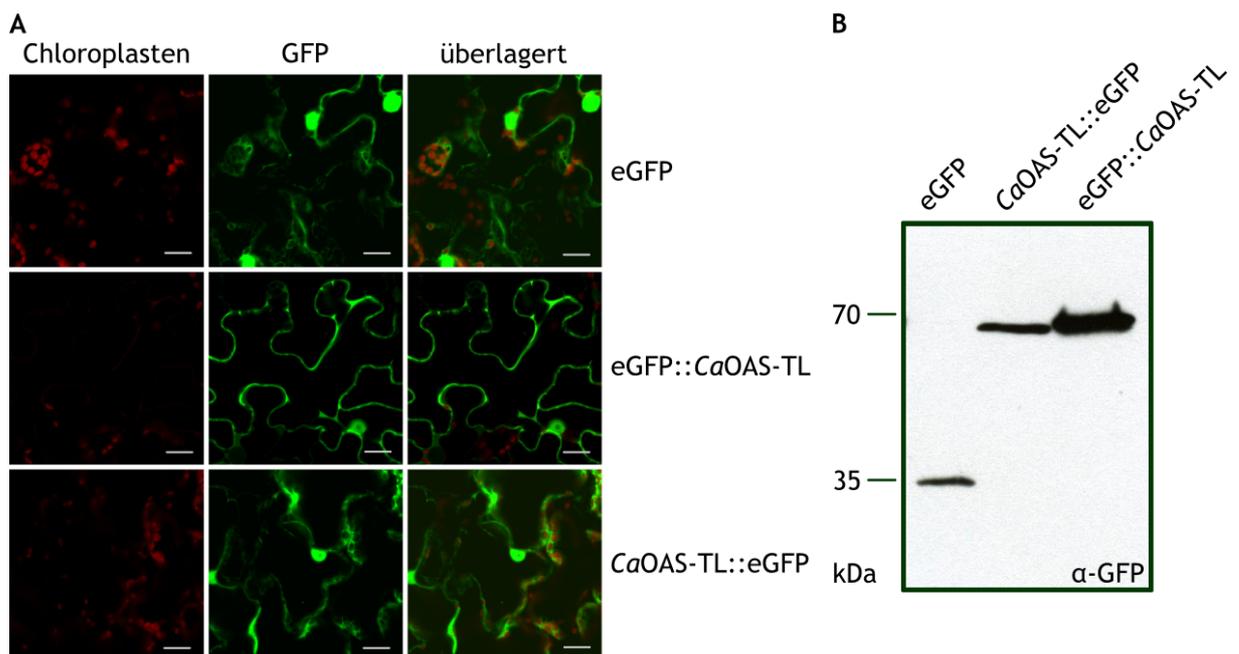


Abb. 3.22: *CaOAS-TL* lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus von *N. benthamiana*.
 A, *Agrobacterium*-Stämme mit *pK7WGF2*, *pK7FWG2_CaOAS-TL* oder *pK7WGF2_CaOAS-TL* wurden in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert (10^9 Zellen/ml). Die Proben wurden 48 hpi analysiert. GFP, eGFP; *CaOAS-TL::GFP*, *CaOAS-TL* mit C-terminalem eGFP; *GFP::CaOAS-TL*, *CaOAS-TL* mit N-terminalem eGFP. Der Größenstandard beträgt 20 μ m.
 B, Nachweis der *CaOAS-TL*-eGFP-Fusionsproteine mittels Immunoblot mit GFP-spezifischen Antikörpern in Proteinextrakten aus inokuliertem Pflanzenmaterial. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Die mikroskopischen Studien zeigten, dass *XopC* und *CaOAS-TL* die gleiche subzelluläre Lokalisation im Zytoplasma und dem Zellkern aufweisen.

3.8 *XopC* und *CaOAS-TL* interagieren *in planta*

Um die Interaktion von *XopC* und *CaOAS-TL* *in planta* zu verifizieren, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, die Koimmunopräzipitation und die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).

3.8.1 Koimmunopräzipitationsanalysen zeigen eine Interaktion von *XopC* und *CaOAS-TL*

Bei der Koimmunopräzipitation (KoIP) kann durch die Immobilisierung des einen Interaktionspartners über einen Epitop-spezifischen Antikörper an eine IgG-Matrix der zweite Interaktionspartner kopräzipitiert und detektiert werden. In diesem Fall *XopC* über einen HA-Epitop-spezifischen Antikörper immobilisiert und *CaOAS-TL* über ein c-Myc-Epitop

3 ERGEBNISSE

detektiert, zum anderen wurde *CaOAS-TL* über einen HA-Epitop-spezifischen Antikörper immobilisiert und XopC über ein c-Myc-Epitop detektiert. Die entsprechenden Konstrukte wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert und 48 hpi analysiert. Durch Immunoblotanalysen des Pflanzenextraktes (TE) konnte die erfolgreiche Expression aller Fusionproteine *in planta* nachgewiesen werden (Abb. 3.23 links).

Weiterhin zeigte sich, dass das c-Myc-Fusionsprotein von *CaOAS-TL* mit dem HA-Fusionprotein von XopC kopräzipitiert wurde. Eine schwächere Kopräzipitation von XopC durch *CaOAS-TL* war nachweisbar (Abb. 3.23 oben).

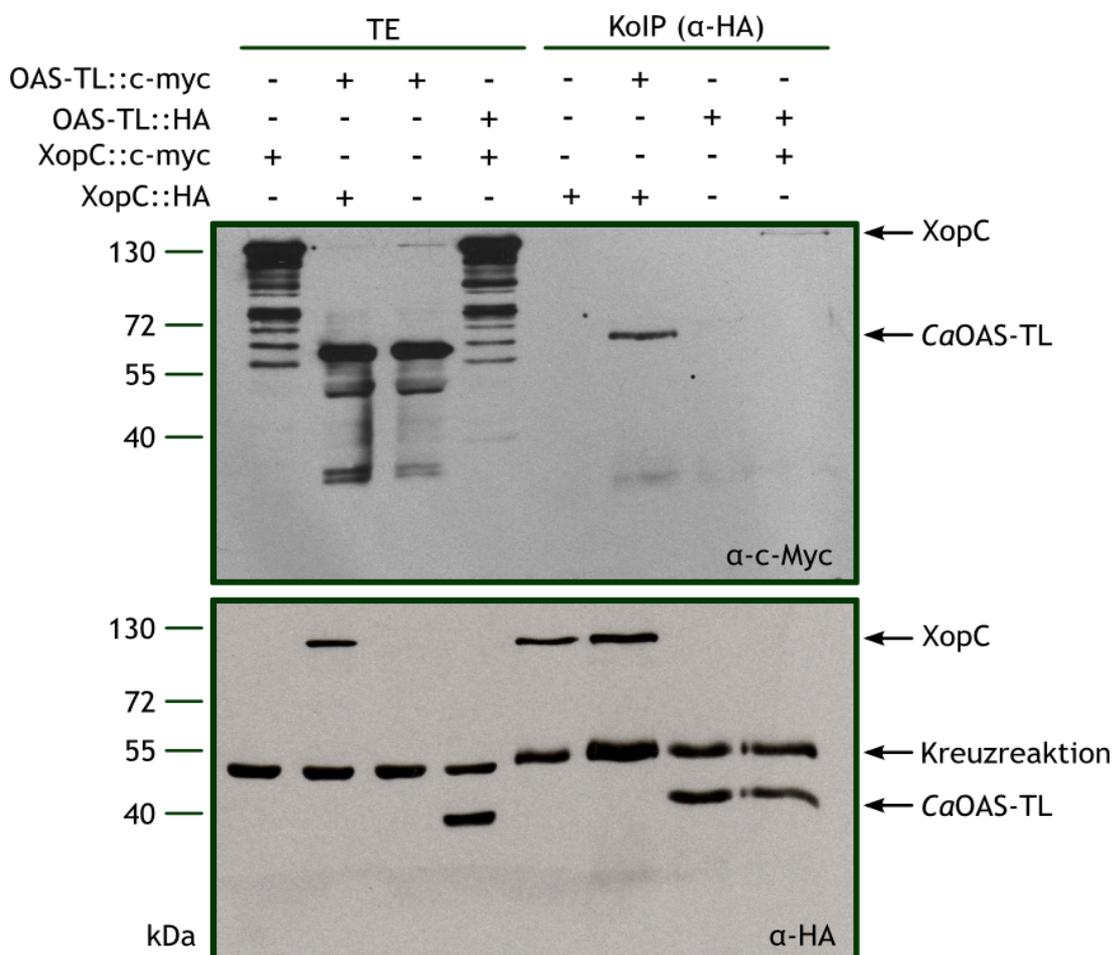


Abb. 3.23: XopC und *CaOAS-TL* koimmunopräzipitieren.

Für Koimmunopräzipitationsexperimente wurden die Proteine *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. Gesamtproteinextrakte (TE) wurden auf Expression der Proteine untersucht. Koimmunopräzipitate (Ko-IP) wurden auf Bindung der HA-Epitop-markierten Proteine an die Beads (unten) und koimmunopräzipitierte, cMyc-Epitop-markierte Proteine (oben) getestet. Das als "Kreuzreaktion" bezeichnete Signal lässt sich vermutlich auf die Detektion der leichten Kette des c-Myc-spezifischen Antikörpers zurückführen, welcher zu Präzipitation verwendet wurde. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

3.8.2 XopC und CaOAS-TL interagieren in BiFC-Analysen

Bei der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation werden zwei potenzielle Interaktionspartner mit dem C- bzw. dem N-terminalen Teil von YFP (*yellow fluorescent protein*) fusioniert. Diese Konstrukte werden *Agrobacterium*-vermittelt transient in *N. benthamiana* koexprimiert. Interagieren die Zielproteine miteinander, gelangen beide Teile des YFP in räumliche Nähe, was zu einer Fluoreszenz führt, welche mittels LSM detektiert werden kann (Walter *et al.*, 2004).

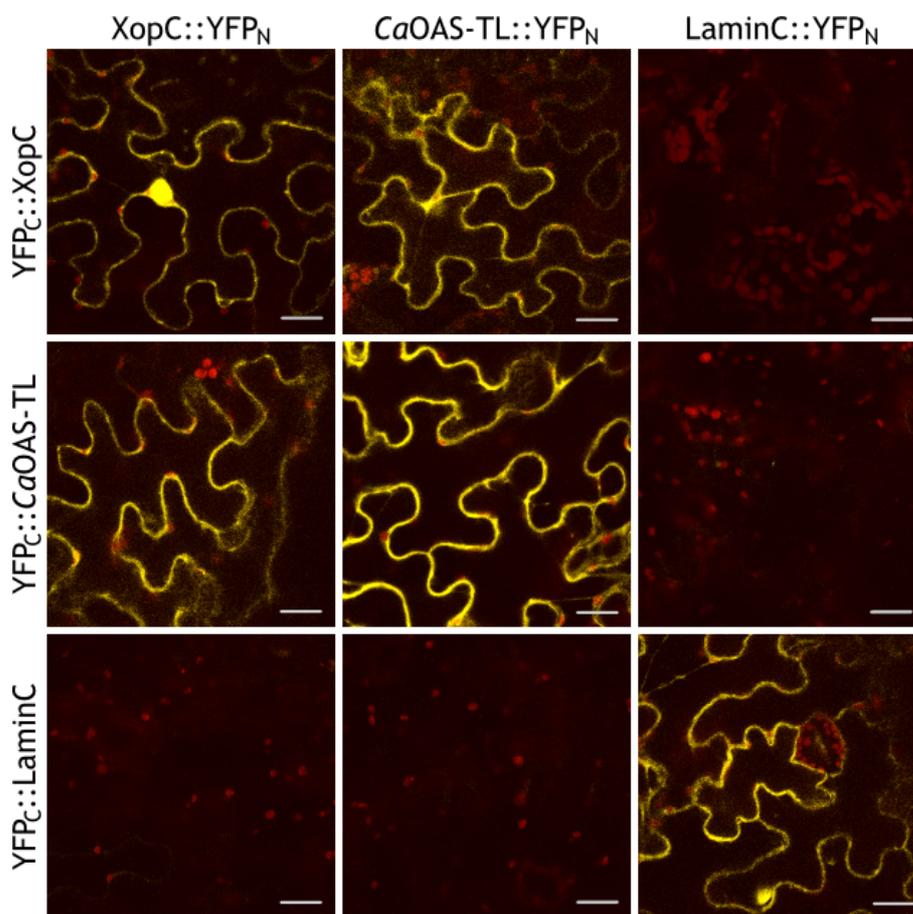


Abb. 3.24: XopC und CaOAS-TL interagieren in BiFC-Analysen. *Agrobacterium*-Stämme mit pSPYNE bzw. pGWB735.1 mit den entsprechenden Konstrukten wurden in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert (10^9 Zellen/ml) und 48 hpi mittels LSM analysiert. Der Größenstandard beträgt 20 μ m. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

XopC, CaOAS-TL und das Kontrollprotein LaminC wurden jeweils mit dem C- und mit dem N-terminalen Teil von YFP fusioniert. Diese Konstrukte wurden in unterschiedlichen Kombinationen transient in *N. benthamiana* exprimiert und die Pflanzenzellen auf Fluoreszenz untersucht.

3 ERGEBNISSE

Die Koexpression von XopC oder *CaOAS*-TL mit LaminC zeigte keine Fluoreszenz, sodass keine Interaktion eines der beiden untersuchten Proteine mit LaminC nachzuweisen war. Bei der Koexpression beider LaminC-Konstrukte konnte dagegen Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.24), da LaminC dimerisiert (siehe Y2H). Die Koexpression der beiden *CaOAS*-TL-Konstrukte führte zu Fluoreszenz (Abb. 3.24), was auf die bekannte Dimerisierung von *OAS*-TLs zurückzuführen ist (Hell *et al.*, 2002). Wurden XopC und *CaOAS*-TL koexprimiert, konnte in beiden Kombinationen von YFP_N- und YFP_C-Konstrukten Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.24). Dies lässt den Schluss zu, dass XopC und *CaOAS*-TL *in planta* interagieren. Bei der Koexpression beider XopC-Konstrukte konnte ebenfalls Fluoreszenz detektiert werden, was bedeutet, dass XopC offensichtlich mit sich selbst interagiert. Dies konnte durch vorläufige Gelfiltrationsanalysen bestätigt werden, welche auf XopC-Oktamere hindeuten (Daten nicht gezeigt). Alle detektierten Signale befanden sich im Zytoplasma oder dem Nukleus, was mit den Lokalisierungsstudien von XopC und *CaOAS*-TL korreliert.

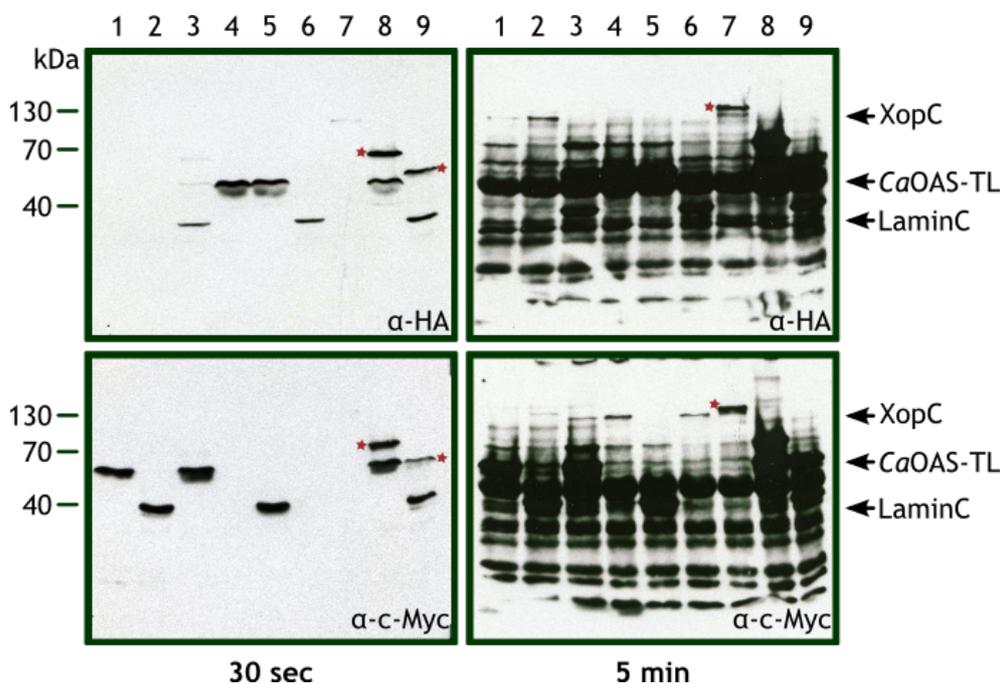


Abb. 3.25: Nachweis der in der BiFC verwendeten Proteine.

Zwei Filme wurden durch dieselbe Membran 30 Sekunden bzw. fünf Minuten belichtet.

1, *CaOAS*TL::YFP_N/YFP_C::XopC; 2, LaminC::YFP_N/YFP_C::XopC; 3, *CaOAS*-TL::YFP_N/YFP_C::LaminC; 4, XopC::YFP_N/YFP_C::*CaOAS*-TL; 5, LaminC::YFP_N/YFP_C::*CaOAS*-TL; 6, XopC::YFP_N/YFP_C::LaminC; 7, XopC::YFP_N/YFP_C::XopC; 8, *CaOAS*-TL::YFP_N/YFP_C::*CaOAS*-TL; 9, LaminC::YFP_N/YFP_C::LaminC. *, Dimer. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus den drei Experimenten, deren Proben ebenfalls für die LSM-Analysen verwendet wurden.

In Immunoblotanalysen des Pflanzenmaterials mit HA- bzw. c-Myc-spezifische Antikörper konnten alle Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die Signalintensität der einzelnen Proteinbanden war unterschiedlich, was auf unterschiedlich effiziente Expression der Fusionsproteine hinwies (Abb. 3.25). Desweiteren wurden für alle drei Proteine Dimere detektiert.

Zusammenfassend konnte die *in planta*-Interaktion von XopC und CaOAS-TL mittels Koimmunopräzipitation und BiFC bestätigt werden.

3.9 Charakterisierung der CaOAS-TL

In der Literatur gibt es bisher keine Information zu dem hier identifizierten XopC-Interaktor CaOAS-TL, sondern ausschließlich zu Homologen aus anderen Pflanzenspezies. Daher wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um die vermutete Funktion des Enzyms näher zu charakterisieren.

3.9.1 CaOAS-TL hat *in vitro*-Aktivität

Sowohl die Sequenz- als auch die Strukturhomologie zwischen AtOAS-TLA und CaOAS-TL lassen vermuten, dass es sich bei dem Protein um eine funktionelle, zytosolische OAS-TL aus *C. annuum* handelt. Für die Untersuchung der CaOAS-TL auf *in vitro*-Aktivität, wurde ein Zwei-Komponenten-OAS-TL-Aktivitätstest nach Gaitonde (Kapitel 2.12) verwendet. Die Grundlage dieses Aktivitätstests ist die Synthese von Cystein aus O-Acetylserin (OAS) und Na₂S.

Um die Enzymaktivität der rekombinanten CaOAS-TL analysieren zu können, wurde CaOAS-TL heterolog in *E. coli* überexprimiert und durch die native Interaktion mit AtSAT gereinigt. Die effiziente Reinigung von AtSAT und vor allem CaOAS-TL wurde durch eine SDS-PAGE und im Immunoblot mittels His₆- und AtOAS-TL-spezifischen, polyklonalen Antikörpern verifiziert (Abb. 3.26).

Für CaOAS-TL konnte ein Molekulargewicht von 34,4 kDa berechnet werden, das Molekulargewicht von His₆::AtSAT beträgt 33,5 kDa (Uniprot Database). Die korrespondierenden Signale im Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel (Abb. 3.26A) und dem Immunoblot liegen etwa bei den erwarteten Größen (Abb. 3.26), wobei das apparente Molekulargewicht der AtSAT größer ist.

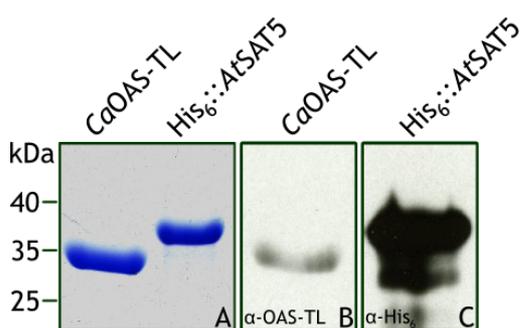


Abb. 3.25: Verifizierung der Reinheit und Identität von rekombinanter CaOAS-TL und AtSAT5.
 CaOAS-TL (A links, B) und His₆::AtSAT5 (A rechts, C)
 A, Coomassie-gefärbte SDS-PAGE; B, Immunoblot (OAS-TL-spezifische Antikörper); C, Immunoblot (His₆-spezifische Antikörper). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Als Negativkontrolle und Referenzwert des OAS-TL-Aktivitätstests diente eine Probe, bei der der Start der Reaktion inhibiert wurde. Mit der gereinigten CaOAS-TL wurde der OAS-TL-Aktivitätstest durchgeführt, wobei *in vitro*-Aktivität von CaOAS-TL nachgewiesen wurde. Auf Grund des Aktivitätstests konnten katalytische Konstanten für CaOAS-TL bestimmt werden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Katalytische Konstanten verschiedener OAS-TLs.

OAS-TL	K _m (Na ₂ S)	K _m (OAS)
CaOAS-TL	317 µM	1,88 mM
AtOAS-TL	3-6 µM	0,3-0,7 mM
OAS-TL aus <i>Citrullus lanatus</i>	-	1,5 mM
OAS-TL aus <i>Pisum sativum</i>	-	2,1 mM
OAS-TL aus <i>Spinacia oleracea</i>	-	2,9 mM

CaOAS-TL: diese Arbeit (gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten), andere Daten: Wirtz & Hell, 2006; <http://www.brenda-enzymes.org>

Die für CaOAS-TL ermittelte Michaelis-Menten-Konstante für OAS liegt im Bereich anderer pflanzlicher OAS-TLs (Wirtz & Hell, 2006; <http://www.brenda-enzymes.org>), die K_m für Na₂S erscheint jedoch höher als die anderer pflanzlicher OAS-TLs.

3.9.2 CaOAS-TL zeigt *in vivo*-Aktivität

In dem *E. coli*-Stamm NK3 liegt eine Punktmutation des bakteriellen OAS-TL-Gens vor, welche zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt (Hulanicka *et al.*, 1986). Aus diesem

3 ERGEBNISSE

Grund ist der Stamm NK3 auxotroph für Cystein und nicht in der Lage, auf Minimal (M9)-Medium zu wachsen, welches kein Cystein enthält. Wird die OAS-TL aus *E. coli* (*EcOAS-TL*) ektopisch in *E. coli* NK3 exprimiert, wird dieser Wachstumsverlust komplementiert (Hulanicka *et al.*, 1986).

Eine Komplementation kann ebenso mit der ektopischen Expression pflanzlicher OAS-TLs erzielt werden (Noji *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2008). Mit diesem System kann folglich die *in vivo*-Aktivität der *CaOAS-TL* überprüft werden. Die Proteine wurden dazu unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors synthetisiert.

Als Negativkontrolle diente *AtSAT*, als Positivkontrolle wurde *AtOAS-TL* verwendet.

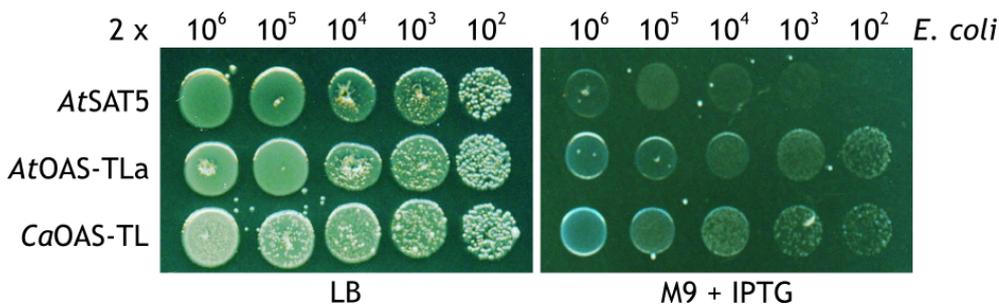


Abb. 3.27: *CaOAS-TL* hat *in vivo*-Aktivität.

CaOAS-TL komplementiert den Cystein-auxotrophen *E. coli*-Stamm NK3 (*cysK*- *cysM*-). *E. coli* NK3 wurde mit pET3d-*CaOAS-TL*, pET3d-*AtOAS-TL* (Positivkontrolle) bzw. pET28a-*AtSAT5* (Negativkontrolle) transformiert. Verdünnungsreihen der Bakterien wurden auf LB-Medium (links) und M9-Minimalmedium ohne Cystein (rechts) getropft. Dem Minimalmedium wurde 1mM IPTG zugefügt, da alle Proteine von einem induzierbaren T7-Promotor exprimiert wurden. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Während alle transformierten NK3-Zellen in der Lage waren, auf Vollmedium (LB) zu wachsen, waren nur die NK3-Zellen in der Lage, auf Minimalmedium zu wachsen, die entweder *CaOAS-TL* oder die Positivkontrolle ektopisch exprimierten (Abb. 3.27). Die exprimierten Proteine wurden mittels Immunoblot nachgewiesen. Die Detektion der OAS-TLs erfolgte mittels eines *AtOAS-TL*-spezifischen Antikörpers, die der *AtSAT* mittels eines His₆-Antikörpers (Daten nicht gezeigt).

Daraus wird geschlussfolgert, dass *CaOAS-TL* auch eine *in vivo* funktionelle OAS-TL ist.

3.10 XopC, jedoch nicht XopC_{D693A}, fördert die Aktivität der CaOAS-TL *in vitro*

Auf Grund der Interaktion zwischen XopC und CaOAS-TL, stellte sich die Frage, ob XopC einen direkten Einfluss auf die CaOAS-TL-Aktivität nimmt. Daher wurde der Zwei-Komponenten-OAS-TL-Aktivitätstest in Anwesenheit von XopC bzw. XopC_{D693A} durchgeführt. Als Kontrollproteine wurden BSA und AvrBs3 verwendet. Für *in vitro*-Analysen wurden His₆-Fusionsproteine von XopC, dem Derivat XopC_{D693A} und eines Kontrollproteins (AvrBs3) heterolog in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatografie gereinigt. Identität und Reinheit der Proteine wurde durch eine SDS-PAGE und im Immunoblot analysiert. Neben den Signalen, die dem Vollängenprotein entsprechen (ca. 112 kDa), waren Signale bei ca. 60 kDa zu erkennen. Die Immunoblotanalyse (Abb. 3.28B) bestätigte, dass es sich um Degradationsfragmente von XopC bzw. XopC_{D693A} handelte. Da diese in beiden Derivaten identisch waren, wurden die Proteine für den OAS-TL-Aktivitätstest eingesetzt. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel von AvrBs3 (Abb. 3.28C) konnten neben dem dem Vollängenprotein entsprechenden Signal mehrere Degradationsfragmente detektiert werden, deren Identität im Immunoblot nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28D).

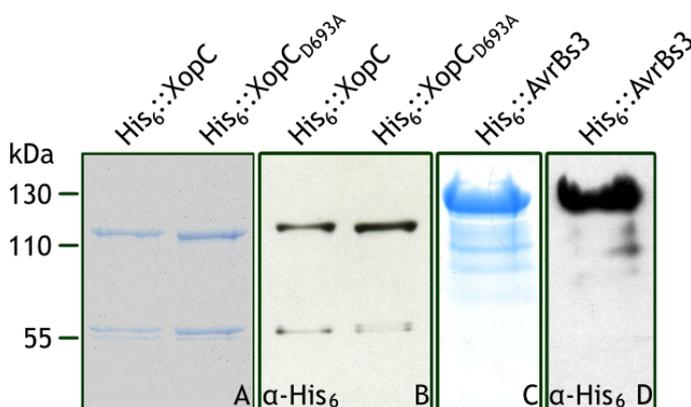


Abb. 3.28: Verifizierung der Reinheit und Identität von rekombinantem XopC und AvrBs3.

His₆::XopC (A, B links), His₆::XopC_{D693A} (A, B rechts) und His₆::AvrBs3 (C, D). A, C, Coomassie-gefärbte SDS-PAGE; B, D, Immunoblot (His₆-spezifischer Antikörper). Die Proben wurden auf dasselbe SDS-PAA-Gel aufgetragen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Im Aktivitätstest wurden jeweils 2 ng der rekombinanten, gereinigten CaOAS-TL eingesetzt. Bei der Durchführung des Assays wurden XopC, XopC_{D693A} bzw. die Kontrollproteine AvrBs3 und BSA (*New England Biolabs*) den Ansätzen in steigendem Mengenüberschuss zugegeben. AvrBs3 wurde ausgewählt, weil es sich ebenfalls um ein Effektorprotein aus *Xcv* handelt, der keinen bekannten Einfluss auf den pflanzlichen Schwefelstoffwechsel hat. In der Abbildung 3.29 sind die relativen Aktivitäten von CaOAS-TL unter Zugabe der verschiedenen Proteine dargestellt. 100% Aktivität entspricht dabei dem jeweiligen Ansatz ohne Zugabe

3 ERGEBNISSE

eines Proteins.

Bei 1:1 und 1:5-Mischungen von CaOAS-TL und XopC konnten bereits erhöhte Aktivitäten von CaOAS-TL detektiert werden. Wurde XopC dem Ansatz in mindestens 10fachem Mengenüberschuss (20 ng) zugegeben, konnten erhöhte Aktivitäten von CaOAS-TL nachgewiesen werden, welche statistisch signifikant sind ($p \leq 0,05$). Bei 50fachem Mengenüberschuss von XopC wurde eine Erhöhung der CaOAS-TL-Aktivität um mehr als 20% verglichen mit dem Ansatz ohne XopC erreicht. Dies galt nicht für die Zugabe von XopC_{D693A} oder der Kontrollproteine BSA und AvrBs3 (Abb. 3.29).

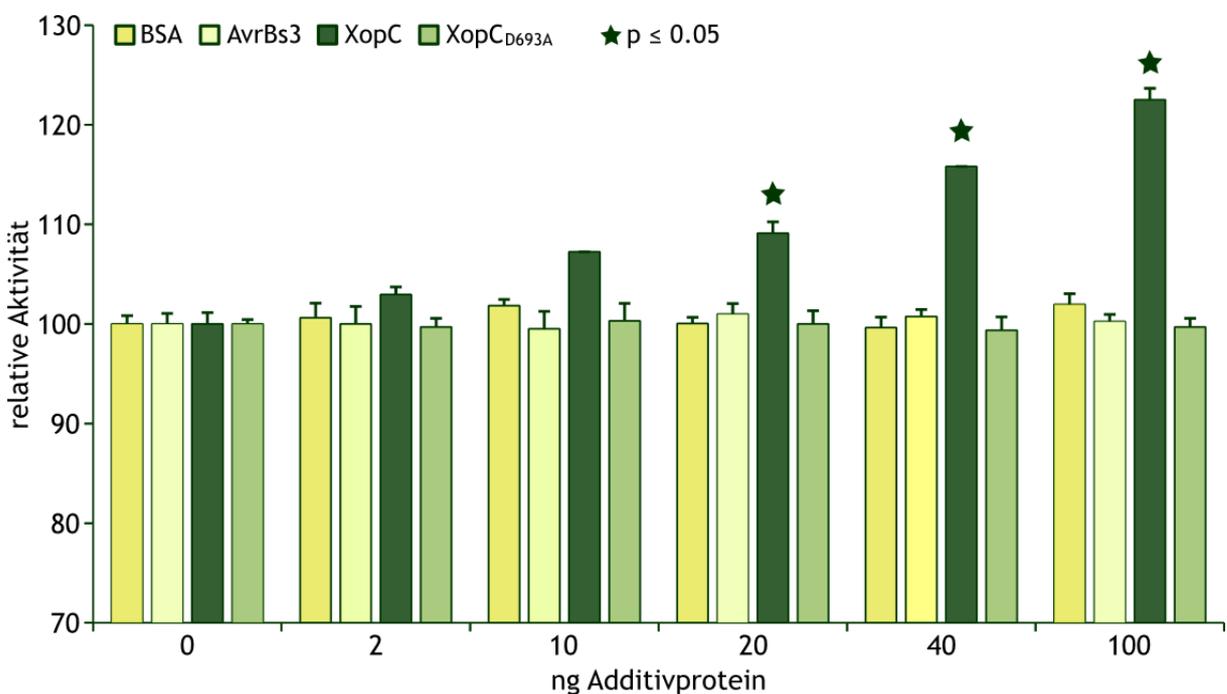


Abb. 3.29: XopC, jedoch nicht XopC_{D693A}, fördert die Aktivität der CaOAS-TL *in vitro*.

BSA, AvrBs3 (Kontrollen), XopC and XopC_{D693A} wurden in steigenden Mengen einem Zwei-Komponenten-OAS-TL-Aktivitätstest zugefügt. Die Zugabe von XopC, jedoch nicht von XopC_{D693A} oder der Kontrollproteine führte zu einer steigenden OAS-TL-Aktivität. Die Ergebnisse von Doppelbestimmungen sowie die Standardabweichungen sind gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Daraus konnte geschlossen werden, dass XopC allein spezifisch die Aktivität von CaOAS-TL *in vitro* erhöht und dieser Effekt abhängig von der potenziellen HAD-like-Hydrolase-Domäne von XopC ist.

3.11 Virus-induziertes Gen-Silencing der CaOAS-TL in ECW-10R supprimiert die XopC-abhängige Verzögerung der AvrBs1-vermittelten HR von Paprika ECW-10R

Da XopC *in vivo* mit CaOAS-TL interagiert und deren Aktivität *in vitro* positiv beeinflusst, wurde untersucht, ob die CaOAS-TL für die Verzögerung der AvrBs1-vermittelten HR durch XopC erforderlich ist. Aus diesem Grund wurde Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) der zytosolischen CaOAS-TL in Paprika ECW-10R-Pflanzen auf Basis des *tobacco rattle virus* (TRV) durchgeführt.

Die Nukleotide 490 bis 978 des ORFs der zytosolischen CaOAS-TL wurden in den *Silencing*-Vektor pYL279Amp kloniert und dessen T-DNA *Agrobacterium*-vermittelt zusammen mit der T-DNA von pTRV1 in die Pflanze gebracht. Beide Vektoren zusammen ermöglichen die Assemblierung und systemische Vermehrung des TRV (Liu *et al.*, 2002). Das prozessierte Transkript des *Inserts* in pYL279Amp bildet mit der entsprechenden mRNA der CaOAS-TL Duplexe, welche durch den RISC (RNA-induzierter *silencing* Komplex) abgebaut werden (Fire *et al.*, 1998; McManus & Scharp, 2002). Somit wird die effiziente Translation der zytosolischer CaOAS-TL verhindert. Als Kontrolle wurde der *eGFP*-ORF in pYL279Amp kloniert. Die Reduktion der CaOAS-TL-mRNA-Menge in den entsprechenden *Silencing*-Pflanzen im Vergleich zu *GFP-Silencing*-Kontrollpflanzen bzw. Wildtyp-ECW-10R wurde mittels quantitativer real-time PCR überprüft (Abb. 3.30A). Eine Kontrolle ohne die Zugabe von reverser Transkriptase zeigte, dass keine Kontaminationen durch genomische DNA in der cDNA vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Als Normierung für die cDNA-Mengen diente *EF-1a*.

Für die Amplifikation der CaOAS-TL-mRNA wurde eine Oligonukleotidkombination gewählt, die eine Amplifikation eines 478 bp großen Fragments erlaubt, welches 49 nt der 5'-UTR (untranslatierte Region) beinhaltet. Da dieses Fragment auch einen Teil der UTR umfasst, wurde die Wahrscheinlichkeit für eine Amplifikation der mRNA einer der Isoformen der OAS-TL aus Chloroplasten oder Mitochondrien verringert. In Pflanzen gibt es drei Isoformen der OAS-TL (zytoplasmatisch, mitochondriell, chloroplastidär; Jost *et al.*, 2000). In der quantitativen real-time PCR (Abb. 3.30A) konnten für die Proben aus Wildtyp-ECW-10R- und *siGFP*-Pflanzen vergleichbare Mengen von CaOAS-TL-mRNA detektiert werden. Die mRNA-Menge von CaOAS-TL in der Probe der *siCaOAS-TL*-Pflanzen betrug etwa 10% verglichen mit den Kontrollen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Expression der CaOAS-TL um ca. 90% verringert wurde.

3 ERGEBNISSE

Die *Silencing*-Pflanzen wurden auf ihre Reaktion auf die Inokulation von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* in Anwesenheit von 50 μ M SA untersucht, um den Einfluss der Reduktion *CaOAS-TL*-Transkripte auf die Phänotypen der Pflanzen zu analysieren.

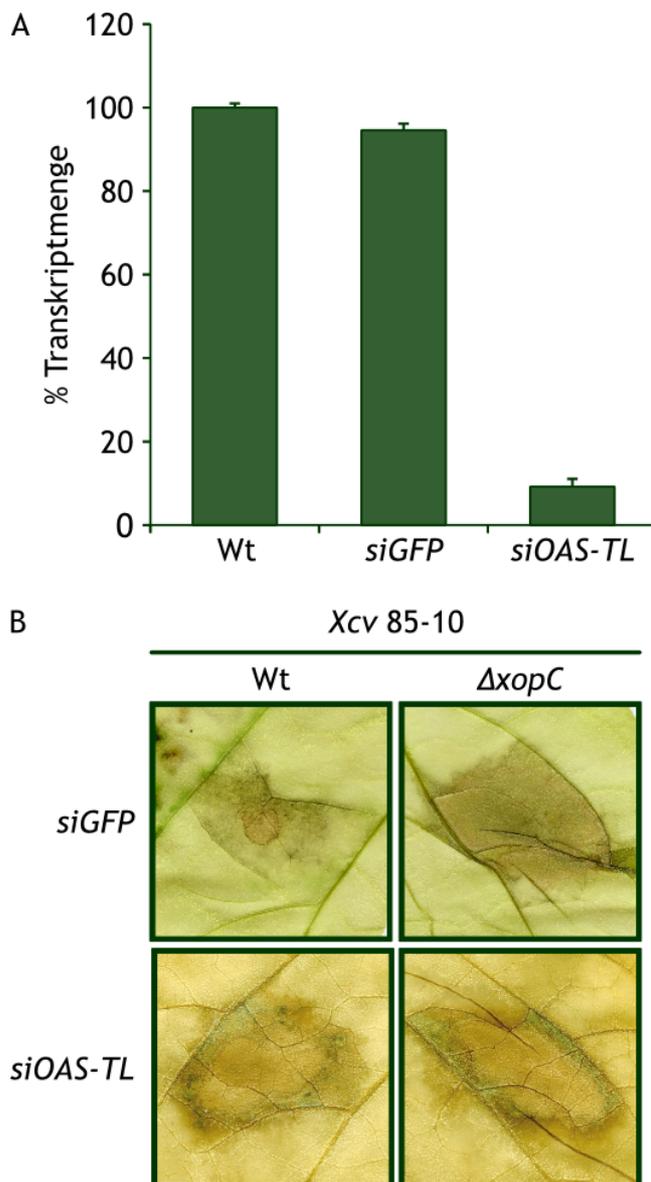


Abb. 3.30: *CaOAS-TL* ist für die *XopC*-abhängige Verzögerung der *AvrBs1*-vermittelten HR erforderlich.

A, Quantitative real-time PCR von *CaOAS-TL*-Transkripten. Die mRNA aus Blättern von Wildtyp-ECW-10R-Pflanzen, *gfp-silencing* Kontrollpflanzen und *CaOAS-TL-silencing* Pflanzen wurden analysiert. Die Standardabweichungen sind angegeben. B, Inokulation von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* in *gfp-silencing* Kontrollpflanze und *CaOAS-TL-Silencing*-Pflanze. *Xcv* wurden mit einer Zelldichte von 10^8 cfu/ml und 50 μ M SA in die Blätter inokuliert. Im Anschluss wurden die Pflanzen 3 Tage im Gewächshaus bei 16 h Licht, 26 °C inkubiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter in Ethanol gebleicht. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Wie Abbildung 3.30 zeigt, konnte in *CaOAS-TL-Silencing*-Pflanzen keinerlei Unterschied zwischen den mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokulierten Bereichen festgestellt werden. Die HR ist in beiden Fällen gut zu erkennen. Dagegen kann in den Kontrollpflanzen die typische Verzögerung der AvrBs1-abhängigen HR durch XopC beobachtet werden.

Daraus kann geschlossen werden, dass der Virulenzeffekt von XopC in Form von Verzögerung der AvrBs1-vermittelten HR von ausreichender Expression der *CaOAS-TL* abhängig ist.

4 Diskussion

4.1 Die Anwesenheit von *xopC* in *Xcv* 85-10 verzögert die AvrBs1-vermittelte HR in *C. annuum* in Abhängigkeit von SA-Stress

Wird XopC transient in verschiedenen Solanaceen oder Nicht-Solanaceen exprimiert, kann keine Reaktion der Pflanzen auf XopC festgestellt werden (Kapitel 3.3). Das lässt den Schluss zu, dass XopC unter den getesteten Bedingungen nicht in der Lage ist, Zelltod, Chlorose, Nekrose oder andere mit Pathogenität in Zusammenhang stehende Reaktionen auszulösen. Diese entstehen häufig bei Befall von Pflanzen mit Pathogenen, um diesen die Lebensgrundlage zu entziehen und können beispielsweise durch XopE, XopB, XopG, XopM und XopS in verschiedenen Solanaceen ausgelöst werden (Thieme *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2012).

Der Fortschritt der AvrBs1-vermittelten HR nach Inokulation mit *Xcv* 85-10 in resistenten Paprikapflanzen unter Stressbedingungen (SA) wurde durch die Anwesenheit von *xopC* in den Bakterien verzögert (3.4.1). Dieses Phänomen lässt sich offensichtlich nicht auf die Auslösung von Krankheitssymptomen durch *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopC* auf suszeptiblen Paprikapflanzen übertragen (3.4.2). Dies ist möglicherweise durch die unterschiedlichen Reaktionen der Pflanzen bezüglich der ROS-Produktion während kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen mit Pathogenen zu erklären, welche von der SA-Konzentration abhängt (Chen *et al.*, 1993). Bei der Interaktion von *S. lycopersicon* mit *R. solanacearum* konnte gezeigt werden, dass es bei der kompatiblen Interaktion nur zu einem ROS-Peak kommt, bei der inkompatiblen Interaktion jedoch mindestens zwei, zeitlich versetzte Peaks zu beobachten sind (Mandal *et al.*, 2011). Daraus kann geschlossen werden, dass es bei kompatiblen und inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen zu unterschiedlichen Prozessen in der Pflanze kommt. In *S. lycopersicon* konnte ebenfalls ein temporärer Unterschied der Pflanze in der Reaktion auf die Inokulation mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* beobachtet werden (3.4.3). Möglicherweise sind dort ähnliche Prozesse involviert wie bei der Reaktion von ECW-10R-Pflanzen auf *Xcv* 85-10. Allerdings sind diese Unterschiede unabhängig von SA, welche in den untersuchten Konzentrationen selbst eine Zelltodreaktion auslöste. Eine Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen endogenen SA-Konzentrationen in den einzelnen Solanaceen-Arten sein. Die endogenen SA-Konzentration liegen in Paprika bei ca. 50-100 pmol/g Frischgewicht (Hwang *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2011), in Tomate bei ca. 30-70 nmol/g Frischgewicht (Peng *et al.*, 2004; Van

Meulenbroek *et al.*, 2012). Desweiteren dauert es deutlich länger (ca. fünf Tage) bis die Reaktion von Tomate auf *Xcv* sichtbar ist als dies bei resistenten Paprikapflanzen der Fall ist (ca. 24 Stunden).

Dass Typ-III-Effektoren zur Pathogenität verschiedener, phytopathogener Bakterien beitragen, obwohl sie nicht essentiell sind, belegen Studien. So spielt HopPtoA1 aus *Pseudomonas (P.) syringae* pv. *tomato* eine Rolle bei der Bildung von Kolonien während der Infektion (Badel *et al.*, 2002). Die Deletion des Gens führt jedoch nicht zum Verlust der Pathogenität. Eine *hopPtoN*-Deletionsmutante von *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 erzeugt deutlich mehr nekrotische Läsionen in Blättern von Tomatenpflanzen als der Wildtyp, jedoch ist die Wachstumsrate der beiden Stämme identisch (López-Solanilla *et al.*, 2004). In *Xcv* führen sowohl die Deletion von *xopB* als auch die Deletion von *xopS* zu einer verminderten Bildung von Symptomen in suszeptiblen Paprikapflanzen, ohne einen Pathogenitätsverlust der Bakterien zu verursachen (Schulze *et al.*, 2012). Häufig ist auch auf Grund redundanter Funktionen mehrerer Effektoren kein Virulenzeffekt einzelner Effektoren feststellbar (Büttner & Bonas, 2010; Hann *et al.*, 2010). Jedoch gibt es auch Effektoren mit einer bedeutenden Virulenzfunktion. So ist AvrXa7 als TAL-Effektor wichtig für die Pathogenität von *X. oryzae* pv. *oryzae* und hat abhängig von dem Genotyp der Wirtspflanze Reis sowohl Avirulenz- als auch Virulenzfunktion (Yang *et al.* 2000; Yang & White, 2004; Römer *et al.*, 2010). In *Xcv* ist AvrBsT in der Lage, die AvrBs1-abhängige HR in resistenten Paprikapflanzen durch die Interaktion beider Effektoren mit verschiedenen Untereinheiten einer SnRK zu supprimieren (Szczesny *et al.*, 2010). XopC als Suppressor der AvrBs1-abhängigen HR nimmt offensichtlich eine Sonderstellung ein, da die Fähigkeit zur Suppression von Stressbedingungen für die Pflanze abhängt. Suppression von Zelltod ist ein häufiges Charakteristikum von Effektorproteinen. So supprimiert XopB verschiedene, durch transiente Expression von AvrBsT, AvrRxv und XopJ ausgelöste Zelltodreaktionen in *N. benthamiana* (Schulze *et al.*, 2012). Die Suppression der HopA1 induzierten HR auf *N. tabacum* cv. *xanthi* kann durch den *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000)-Effektor HopS2 supprimiert werden (Guo *et al.*, 2009). Der *P. syringae* pv. *tomato*-Effektor AvrPtoB erhöht die Suszeptibilität der Wirtspflanzen durch die Suppression des BAX-abhängigen PCD (Abramovitch *et al.*, 2003). Das Effektorprotein VirPphA aus *P. syringae* pv. *phaseolicola* blockiert Avr-Proteine in verschiedenen Kultivaren von Bohnen, so dass die HR nicht mehr ausgelöst wird (Jackson *et al.*, 1999). Ebenfalls Kultivar-spezifisch supprimiert die Interaktion zwischen AvrPphC und AvrPphF die durch *P. syringae* pv. *phaseolicola*-Effektoren ausgelöste HR in Bohnen (Tsiamis *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Suppression der

durch AvrRpm1 ausgelösten RPM1-abhängigen HR in *Arabidopsis* durch AvrRpt2 (Ritter & Dangl, 1996). Die *P. syringae*-Effektoren AvrE und HopPtoM supprimieren die SA-abhängige Basalabwehr in *Arabidopsis* (DeRoy *et al.*, 2004).

Grundsätzlich stellt der programmierte Zelltod (PCD), zu dem auch die HR gehört, ein wichtiges Werkzeug für die Entwicklung der Pflanze und ihre Reaktion auf äußere Einflüsse dar. Speziell in *A. thaliana* sind sogenannte *Lesion mimic mutants* (LMM) bekannt, von denen einige zu spontanen Zelltodreaktion führen, andere diese vollständig supprimieren (Lorrain *et al.* 2003). Die Resistenz gegenüber verschiedener *P. syringae* spp. ist in den meisten Fällen unverändert, jedoch wurde für die LMM *cpr5* beschrieben, dass die Resistenz erhöht ist (Boch *et al.*, 1998). Für einige dieser LMM (*acd1*, *acd2*) konnte gezeigt werden, dass, verglichen mit dem Wildtyp, die HR bei Inokulation geringerer Bakteriendichten induziert wird, andere (*cpr1*) zeigte eine verstärkte HR (Greenberg & Ausubel, 1993; Greenberg *et al.*, 1994; Jambunathan *et al.*, 2001). Zusätzlich zur veränderten lokalen Reaktion auf die Inokulation mit Pathogenen, zeigen die nicht-infizierten Bereiche der Pflanzen erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen, die so genannte *systemic-acquired resistance* (SAR), bei der Salizylsäure (SA) ein Schlüsselsignal darstellt (Ryals *et al.*, 1996). Die konstitutive Expression verschiedener Abwehrmechanismen und erhöhte SA-Produktion in vielen LMM deutet auf eine Aktivierung der SAR in diesen Mutanten hin (Dietrich *et al.*, 1994; Devadas & Raina, 2002).

Der Grad der Resistenz in Pflanzen wird also durch systemische Signale, die durch Phytohormone übermittelt werden, beeinflusst. Klassischerweise lösen SA-Signale Resistenz gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene aus, wohingegen eine Kombination aus Jasmonsäure (JA)- und Ethylen (ET)-Signalen für Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen verantwortlich ist (Glazebrook, 2005). Da erhöhte biotrophe Resistenz häufig mit erhöhter nekrotropher Suszeptibilität einhergeht und umgekehrt, wirken diese beiden Signalübertragungswege größtenteils antagonistisch (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a). Weiterhin spielen Gibberellinsäure (GA), Brassinosteroide, Zytokine (CK), Auxin und Abscisinsäure (ABA) eine Rolle bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a). Durch GA werden DELLA-Protein-Wachstumsrepressoren abgebaut, was zu einer Erhöhung von ROS und SA führt sowie JA-Signale abschwächt (Achard *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006). Durch Behandlung mit Brassinosteroiden wird die biotrophe und hemibiotrophe Resistenz erhöht (Nakashita *et al.*, 2003). CK fördern die Resistenz gegen biotrophe Pathogene indem sie die SA-Antwort durch NPR1 verstärken (Choi *et al.*, 2010; siehe unten). Exogene SA-Applikation hingegen führt zu einer Stabilisierung von AUX-IAA

(Auxin/Indol-3-essigsäure)-Proteinen, was die Auxin-Signale abschwächt (Wang *et al.*, 2006). AUX-IAA-Proteine sind negative Regulatoren von Genen, die auf Auxin reagieren (Guilfoyle & Hagen, 2007). Sie binden und inaktivieren ARFs (*auxin response factors*), welche positive Regulatoren der Auxinsignalwege sind (Guilfoyle & Hagen, 2007). Auxin selbst ist in nahezu alle Prozesse der Pflanzenentwicklung involviert (Hay *et al.*, 2006; Kuhlemeier, 2007; Benjamin & Scheres, 2008; Petricka & Benfey, 2008; Rolland-Lagan, 2008; Østergaard, 2009). Auch die Auxinsignalwege wirken meist antagonistisch zu den SA-Signalwegen. Verstärkte Auxinsignale führen zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber biotrophen Pathogenen (Navarro *et al.*, 2008a; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011b). Auch scheinen die Auxinsignale die SA-Biosynthese zu beeinträchtigen (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011b). SA dagegen stabilisiert die AUX-IAA-Proteine (Wang *et al.*, 2006). Die Aktivierung von ABA-Biosynthese- und Signalwegen fördert die Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Pflanzenpathogenen (Ton & Mauch-Mani, 2004; Asselbergh *et al.*, 2007).

Eine Schlüsselrolle als positiver Regulator in der SA-Signalkaskade spielt NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*), welches in Abwesenheit von SA im Zytoplasma lokalisiert ist (Dong, 2004). SA induziert eine Änderung des Redox-Status' der Zelle (Mou *et al.*, 2003), was zur Dissoziation des NPR1-Komplexes führt, so dass die NPR1-Monomere in den Zellkern transportiert werden. Dort erhöhen sie durch Bindung an TGA-Transkriptionsfaktoren deren Bindung an SA-responsive Promotoren (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a). Aber auch der Proteinumsatz von NPR1 selber ist für die Induktion der NPR1-Zielgene relevant. Durch die Phosphorylierung von NPR1, welche im Nukleus stattfindet, wird eine Interaktion zwischen CULLIN und NPR1 ermöglicht. Dies führt zur Degradierung von NPR1-Monomeren. Offensichtlich ist diese Degradation notwendig für die vollständige Induktion von SA-Zielgenen, da eine Stabilisierung von NPR1-Monomeren zu reduzierter Promotor-Aktivität führt (Spoel *et al.*, 2009). Ein SA-Rezeptor ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise wird SA von zytosolischen Rezeptoren perzipiert. Allerdings ist es auch möglich, dass nicht SA direkt, sondern NPR1 die durch SA getriggerten Modifikationen perzipiert (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a).

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass, neben weiteren Phytohormonen, SA in Abwehrmechanismen, speziell in Verbindung mit Zelltodreaktion, eine wesentliche Rolle spielt. Dies erklärt möglicherweise den Zusammenhang zwischen dem in Abhängigkeit von XopC durch Xcv ausgelösten Phänotyp in resistenten ECW-10R-Pflanzen und dem dafür erforderlichen SA-Stress. Es ist bekannt, dass SA die Akkumulation von ROS, insbesondere H₂O₂, verstärkt (Chen *et al.*, 1993). ROS wiederum sind in die Abwehrreaktion der Pflanze

gegen Pathogene und die Ausprägung der HR involviert (Levine *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1998; Kachroo *et al.*, 2003). Weiterhin induziert die Applikation von SA in Paprikapflanzen die Expression von Asparaginsynthetase 1 (*CaAS1*), welche eine Rolle in der Auslösung der HR durch *Xcv* spielt (Hwang *et al.*, 2011). Werden resistente Paprikapflanzen ohne Zugabe von SA mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokuliert, ist die bekannte Auslösung der HR zu beobachten (3.4). Werden die beiden *Xcv*-Stämme jedoch mit SA koinokuliert, ist ein zeitlicher Unterschied in der Auslösung der HR in ECW-10R-Pflanzen zu beobachten. Eine denkbare Erklärung hierfür stellt die primäre Stressreaktion der Pflanze auf die SA dar. Werden im Anschluss zusätzlich die Effektoren aus *Xcv* transloziert, ist *XopC* wahrscheinlich in der Lage, die ROS-Konzentration gezielt direkt oder indirekt zu senken. Fehlt *XopC*, wird die ROS-Konzentration möglicherweise noch erhöht, da der mutmaßliche Suppressionseffekt von *XopC* nicht vorhanden ist. Es kommt zu einer früheren HR in den mit *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokulierten Bereichen verglichen mit *Xcv* 85-10.

4.1.1 Der *XopC*-Virulenzeffekt in Paprika hängt von einer zytosolischen OAS-TL ab

XopC interagiert *in vivo* mit einer zytosolischen OAS-TL (3.7; 3.8) und erhöht deren Aktivität *in vitro* (3.10). *Silencing* der zytosolischen OAS-TL in resistenten Paprikapflanzen inhibiert die Verzögerung der *AvrBs1*-abhängigen HR durch *XopC* (3.11).

Die Verfügbarkeit von reduziertem Schwefel wird durch die vielfältigen Funktionen, die durch Schwefelprimärmetabolite wie Cystein, Methionin und Glutathion (GSH) vermittelt werden, zu einem wichtigen Faktor. Einige dieser Funktionen sind in die Kontrolle des Redox-Status' der Zelle, die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern, die Vitaminbiosynthese und die Neutralisierung von ROS involviert (Leustek *et al.*, 2000; Droux, 2004; Wirtz & Droux, 2005). Die Synthese von Cystein stellt den letzten Schritt der Fixierung anorganischen Schwefels in Bakterien und in Pflanzen dar. Diese Reaktion wird sequentiell von zwei Enzymen katalysiert. Serinacetyltransferase (SAT) und *O*-Acetylserin-(thiol)lyase bilden dabei einen heterooligomeren Komplex, den Cysteinsynthasekomplex (CSC) (Becker *et al.*, 1969; Kredich *et al.*, 1969; Nakamura *et al.*, 1987; Nakamura & Tamura 1990; Bogdanova & Hell, 1997). Dieser besteht aus einem Serinacetyltransferase (SAT)-Hexamer und zwei OAS-TL-Dimeren (Abb. 4.1).

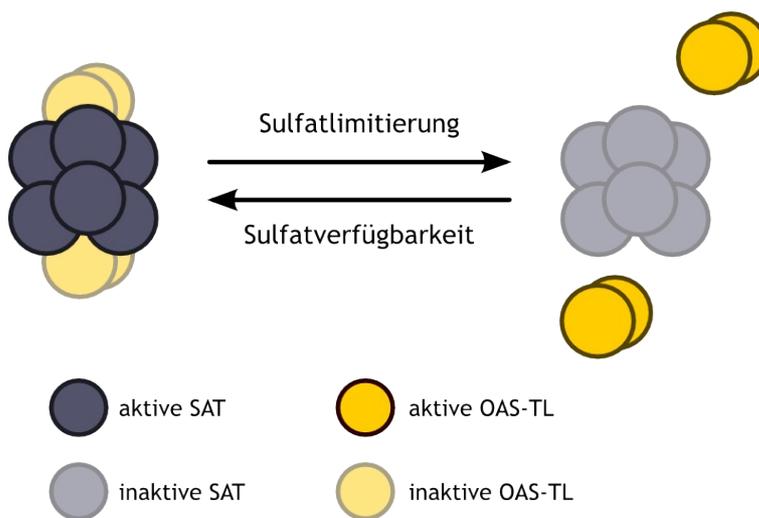


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des CSC. Abb. nach Wirtz & Hell, 2006

Bei Sulfatverfügbarkeit assoziiert der CSC und die SAT ist aktiv. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von *O*-Acetylserin aus Serin und Acetyl-CoA. Sinkt die Sulfatverfügbarkeit bei gleichzeitigem Anstieg der OAS-Konzentration, dissoziiert der CSC und die OAS-TL geht in ihren aktiven Zustand über. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Cystein aus OAS und Sulfid (Wirtz & Hell, 2006). In Pflanzen gibt es neben der zytosolischen OAS-TL zwei Isoformen, welche sich in den Chloroplasten bzw. den Mitochondrien befinden. Diese sind in *A. thaliana* abgesehen von ihrem jeweiligen Transitpeptid sehr ähnlich, unterscheiden sich in ihrer Sequenz jedoch von der zytosolischen Isoform. Die Aminosäuresequenzidentität zwischen der zytosolischen OAS-TL aus *A. thaliana* (SwissProt ID P47998) und der mitochondrialen Isoform (SwissProt ID Q43725) beträgt 72 %, die zwischen der zytosolischen OAS-TL und der chloroplastidären Isoform (SwissProt ID O22682) 60 %. Auf Grund der AS-Sequenzidentität von mehr als 80 % zu bekannten pflanzlichen, zytosolischen OAS-TLs sowie der Nachweise von *in vitro*- und *in vivo*-Aktivitäten von *CaOAS-TL* sowie der Lokalisierungsstudien konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine funktionelle zytosolische OAS-TL aus *C. annuum* beschrieben werden. Lokalisierungsstudien zu *CaOAS-TL* zeigten Fluoreszenz von *CaOAS-TL*-eGFP-Fusionsproteinen im Zytoplasma und dem Kern der Pflanzenzelle. Bei einer zytosolischen OAS-TL ist die zytosolische Lokalisierung erwartungsgemäß, die im Kern jedoch überraschend, da keine nukleären OAS-TLs bekannt sind. Eine mögliche Erklärung dafür ist ein Überexpressionseffekt, der die tatsächliche Lokalisierung des Proteins verfälschen kann (Lisenbee *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2004). Bezogen auf die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten für *CaOAS-TL* muss bei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen beachtet werden, dass die endogene *OAS-TL* der *E.*

coli-Bakterien (*EcOAS-TL*), in denen die heterologe Expression der *CaOAS-TL* durchgeführt wurde, nicht deletiert war, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein geringer Teil der apparenten *CaOAS-TL*-Aktivität auf Verunreinigungen durch *EcOAS-TL* zurückzuführen war. Da die Bakterien jedoch in Vollmedium kultiviert wurden, welches ausreichende Mengen metabolisierbaren Schwefel enthält, war die Expression der endogenen *EcOAS-TL* höchstwahrscheinlich minimal (Kredich, 1971 & 1996; Forquin *et al.*, 2011). Weiterhin erscheint die K_M für Na_2S zu hoch. Dies könnte an den experimentellen Bedingungen liegen, da in diesem Fall besondere Vorsicht geboten ist (Rüdiger Hell, COS Heidelberg, persönliche Mitteilung). Die $K_M(\text{Na}_2\text{S})$ sollte daher unter optimierten Bedingungen erneut bestimmt werden. Bisher wurde in *C. annuum* nur die chloroplastidäre Isoform der OAS-TL in Früchten beschrieben, welche in die Differenzierung von Chromoplasten aus Chloroplasten involviert ist und damit eine wichtige Rolle in der Fruchtentwicklung spielt (Römer *et al.*, 1992).

Cystein, das Produkt der OAS-TL-Reaktion, bildet die Grundlage der Synthese von Glutathion (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Dies wiederum kann durch ROS oxidiert werden, wodurch die ROS neutralisiert werden. Es ist bekannt, dass Glutathion eine Rolle bei der Detoxifikation von Schwermetallen, organischen Schadstoffen und oxidativem Stress spielt (Zenk, 1996; Meagher, 2000; Clemens, 2001; Dixon *et al.*, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass die Überexpression der zytosolischen OAS-TL in *A. thaliana* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cadmium-Stress führt, wobei vermutet wird, dass die Erhöhung der Cysteinsynthese zu mehr Ressourcen für die Bildung detoxisch wirkender Thiolverbindungen führt (Domínguez-Solís, 2001 & 2004). Auch die Überexpression verschiedener pflanzlicher OAS-TLs in diversen Tabaklinien führt zu erhöhter Toleranz gegenüber Cadmium, H_2S oder SO_2 sowie oxidativem Stress (Youssefian *et al.*, 1993 & 2001; Noji *et al.*, 2001). Die Expression einer nicht-funktionellen zytosolischen OAS-TL in *A. thaliana* (Ökotyp *Landsberg erecta*) durch eine Punktmutation im entsprechenden Gen *AT4G14880* führt zu einem *early leaf death*-Phänotyp, wenn die Pflanzen Temperaturstress ausgesetzt sind. Durch Analyse verschiedener Markergene konnte gezeigt werden, dass der *early leaf death*-Phänotyp nicht auf Seneszenz sondern auf programmierten Zelltod zurückzuführen ist (Shirzadian-Khorramabad *et al.*, 2010). Werden diese Beobachtungen zusammengefasst, führt ein höherer Gehalt funktioneller OAS-TL innerhalb der Pflanze zu erhöhter Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren. Ein geringerer Gehalt bzw. eine geringere Aktivität von OAS-TL resultiert in Zelltodreaktionen unter bestimmten Stressbedingungen, wie beispielsweise oxidativem Stress. Damit liegt die Vermutung nahe, dass OAS-TLs auch bei der

4 DISKUSSION

hypersensitiven Reaktion eine Rolle spielen, da sowohl ein *oxidative burst* als auch der programmierte Zelltod während dieser Reaktion aktiviert werden (Mittler *et al.*, 1995; Lam, 2004). Bei *oas-a1 knock out* (ko)-Mutanten von *A. thaliana* wurde eine Akkumulation von ROS in Abwesenheit von Stressoren und spontane Zelltodreaktionen beobachtet (Lopez-Martin *et al.*, 2008). Da OAS-TLs offenbar einen Einfluss auf den Redox-Status' der Pflanzenzelle haben, lässt sich folgendes Modell für die Funktion von XopC in der Pflanzenzelle erstellen: Bei Inokulation resistenter Paprikapflanzen mit *Xcv* 85-10 Δ *xopC* wird AvrBs1 von der Pflanze erkannt und die HR induziert (Abb. 4.2A). Dies ist unter anderem abhängig von der Ausschüttung von ROS. Bei der Inokulation von *Xcv* 85-10 wird AvrBs1 ebenfalls erkannt, jedoch aktiviert XopC die zytosolische OAS-TL, was zu erhöhten Cysteinkonzentrationen in der Zelle führt. Dies wiederum führt zu erhöhten GSH-Konzentrationen, was dazu führt, dass die ausgeschütteten ROS neutralisiert werden, wodurch die HR verzögert wird (Abb. 4.2B).

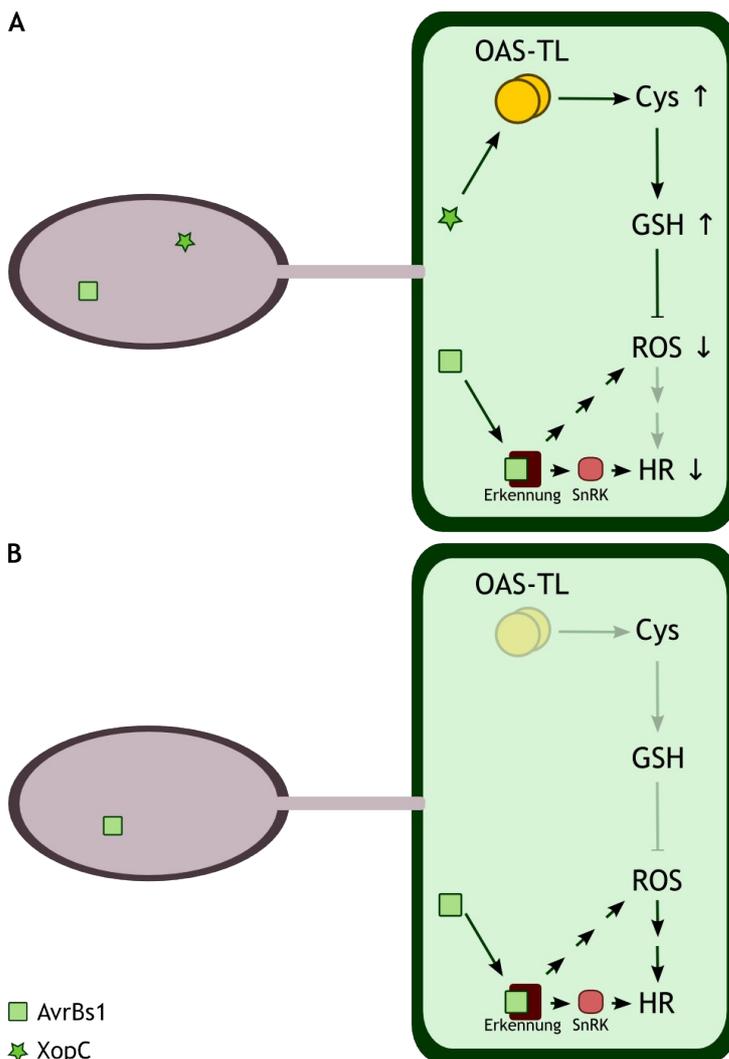


Abb. 4.2: Modell für die Abläufe bei Inokulation mit *Xcv*.

A, *Xcv* 85-10. Minimalistisch dargestellt ist die Erkennung von AvrBs1, was über SnRK zur Induktion der HR führt; B, *Xcv* 85-10 Δ *xopC*. Minimalistisch dargestellt ist die Erkennung von AvrBs1, was über SnRK zur Induktion der HR führt. XopC stimuliert die Aktivität der OAS-TL, wodurch Cystein und anschließend GSH gebildet werden. Letzteres puffert die durch die HR-Induktion hervorgerufenen ROS ab.

4 DISKUSSION

Bisher gibt es nur wenige Studien zur Funktion der OAS-TL in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen. Eine Erhöhung der OAS-TL-Aktivität *in planta* konnte bei der Infektion von *A. thaliana* mit *Alternaria brassicicola* beobachtet werden und war von der externen Sulfatkonzentration abhängig (Kruse *et al.*, 2012). Weiterhin wurde die Interaktion von *A. thaliana* Wildtyp (Wt)- und *oas-a1* ko-Pflanzen (Ökotyp Col-0) mit *Pst* DC3000 bzw. *Botrytis (B.) cinerea* untersucht (Álvarez *et al.*, 2012). In den Wt- und ko-Pflanzen wurde kein Unterschied im SA-Gehalt festgestellt, jedoch war in den ko-Pflanzen der Cysteingehalt um etwa 30% und der Glutathiongehalt um etwa 25% geringer als in den Wt-Pflanzen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die ko-Pflanzen empfindlicher gegenüber *Pst* DC3000 waren, was sich durch ein schnelleres Wachstum der Bakterien zeigte (Álvarez *et al.*, 2012). Diese Beobachtung gilt ebenfalls für die Infektion mit *B. cinerea*. Für die Untersuchung der inkompatiblen Interaktion wurde *Pst* DC3000*avrRpm1* verwendet, welcher in *A. thaliana* Col-0 die ETI auslöst (Mindrios *et al.*, 1994). Durch die *electrolyte leakage*-Analysen wurde gezeigt, dass die *oas-a1* ko-Pflanzen in der Auslösung der HR beeinträchtigt sind, sich dies aber durch die lokale Applikation von Cystein an der Stelle der Infektion mit *Pst* DC3000*avrRpm1* aufheben lässt (Álvarez *et al.*, 2012). Die Infiltration von Cystein, jedoch nicht von Glutathion, parallel zur Inokulation mit *Pst* DC3000*avrRpm1* scheint die Intensität der HR sowohl in WT- als auch in ko-Pflanzen zu verstärken (Álvarez *et al.*, 2012). Die Ergebnisse von Álvarez *et al.* zeigen, dass die HR in *A. thaliana* durch die Abwesenheit der zytosolischen OAS-TL beeinträchtigt wird und Cystein ein wesentlicher Faktor für die Auslösung der HR ist. Das steht zunächst im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen, dass XopC zumindest *in vitro* die Aktivität der CaOAS-TL erhöht und gleichzeitig *Xcv* 85-10Δ*xopC* die AvrBs1-abhängige HR verzögert. Jedoch wurden in der Arbeit von Álvarez *et al.* keine Untersuchungen zu Auswirkungen erhöhter OAS-TL-Aktivität gemacht. Außerdem wurde das Pathosystem *A. thaliana*-*Pst* verwendet, in dem XopC nicht vorhanden ist, und welches sich auch in anderen Faktoren von dem Pathosystem *C. annuum*-*Xcv* unterscheidet. Um zu untersuchen, ob die Ausschaltung der zytosolischen OAS-TL in *C. annuum* zu einer erhöhten Suszeptibilität und verminderter ETI gegenüber *Xcv* führt, müssten CaOAS-TL *knock out*-Paprika-Pflanzen erstellt werden.

Sicherlich spielen neben AvrBs1 und XopC andere von *Xcv* in Paprikablätter translozierte Effektoren und pflanzliche Proteine ebenfalls eine Rolle in der Induktion der HR. Dieses Zusammenspiel in Zusammenhang mit XopC und CaOAS-TL müsste näher analysiert werden, indem die Funktionen weitere Effektoren untersucht werden. Weiterhin gibt es die

Möglichkeit, dass weitere Effektoren in den Schwefelstoffwechsel der Pflanze eingreifen, was ebenfalls durch detaillierte Charakterisierung möglichst vieler Effektoren und deren pflanzlicher Interaktionspartner näher analysiert werden müsste. Um das Modell bestätigen oder widerlegen zu können, wäre es sinnvoll ROS-Messungen an mit *Xcv* und entsprechenden Derivaten infizierten Blattmaterial durchzuführen. Weiterhin sollten die Konzentrationen der verschiedenen Metabolite insbesondere des Schwefelstoffwechsels analysiert werden.

Eine weiterer denkbarer Mechanismus wäre, dass XopC nicht nur einen Einfluss auf die CaOAS-TL ausübt, sondern auch in die durch CaOAS-TL bedingte *feedback*-Regulation anderer mit dem Schwefelstoffwechsel in Zusammenhang stehender Enzyme eingreift. Eines dieser Ziele könnte die Adenylylsulfat-Reduktase sein, die, ebenso wie andere Enzyme der Sulfatassimilation, über OAS auf Transkriptionsebene positiv reguliert wird (Kredich, 1992; Leustek *et al.*, 2000; Lewandowska & Sirko, 2008). Demzufolge könnte die Erhöhung der Aktivität der CaOAS-TL durch XopC auch die Verringerung von OAS und damit die negative Regulation der Expression von Enzymen der Sulfatassimilation zum Ziel haben. Die daraus resultierende Schwefellimitierung im pflanzlichen Metabolismus könnte dazu führen, dass schwefelhaltige, antimikrobielle Substanzen (SDC, *sulfur-containing defence compounds*) wie beispielsweise Isothiocyanat und Defensine nicht mehr oder nur noch in geringer Menge gebildet werden können (Tierens *et al.*, 2001; Rausch & Wachter, 2005). Desweiteren wird diskutiert, dass die Aktivierung des primären Schwefelstoffwechsels, zu dem auch CaOAS-TL gehört, eine Voraussetzung für die Synthese von SDC darstellt (Kruse *et al.*, 2006; Bloem *et al.*, 2007). Für die Interaktion von *A. brassicicola* mit *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Versorgung mit Schwefel die Synthese von SDC fördert (Kruse *et al.*, 2012). Somit gäbe es neben der Erhöhung der Glutathionkonzentration in der Pflanzenzelle eine zweite mögliche Funktion für XopC, nämlich die Suppression der Synthese von SDC. Beide Funktionen wären für *Xcv* nützlich, um der pflanzlichen Abwehr zu entgehen.

Die Analyse der Transkriptmengen verschiedener Enzyme der Sulfatassimilation, insbesondere der Adenylylsulfat-Reduktase, könnten Aufschluss darüber geben, ob deren Regulation von XopC beeinflusst wird.

4.1.2 Der XopC-Virulenzeffekt hängt von einer potenziellen *HAD-like* Hydrolase-Domäne ab

Die Deletion von *xopC* in *Xcv* 85-10 führt zu einer schnelleren HR in resistenten Paprikapflanzen verglichen mit Wildtyp-Bakterien. Dieser Effekt kann mit der ektopischen Expression von XopC komplementiert werden. Ein XopC-Derivat, welches einen AS-Austausch des für *HAD-like* Hydrolasen essentiellen Aspartats gegen Alanin an Position 693 trägt, kann den Verlust der Suppression nicht komplementieren (3.4.1).

Auf Grund des bekannten *HAD-like*-Motivs von XopC zwischen den Aminosäuren 506 und 795 konnte ein Strukturmodell von XopC für den genannten Bereich erstellt werden (Kapitel 3.1). Dieses zeigt signifikante Strukturhomologie zu einigen bekannten *HAD-like* Hydrolasen. Diese Proteinsuperfamilie umfasst zahlreiche unterschiedliche Mitglieder wie L-2-Haloaciddehalogenase, Epoxidhydrolase, Phosphoserinphosphatase, Phosphomannomutase, P-Typ ATPase sowie zahlreiche weitere Enzyme, die ein nukleophiles Aspartat für ihre Phosphoryltransferreaktion benötigen (Koonin & Tatusov, 1994; Aravind *et al.*, 1998; Burroughs *et al.*, 2006). Allerdings besitzen *HAD* Superfamilienproteine nur eine geringe Sequenzidentität von unter 14% (Kim *et al.*, 2004). Ein weiteres Mitglied dieser Superfamilie ist die Phosphoglycolatphosphatase, auf dessen Homolog aus *Aquifex aeolicus* sich XopC modellieren lässt (3.1). Daher liegt die Vermutung nah, dass auch XopC *HAD-like* Hydrolaseaktivität besitzen könnte.

HAD-like Proteine besitzen drei konservierte Motive (Kim *et al.*, 2004), die auch in XopC vorkommen. Dabei handelt es sich um Motiv I DX(D/T/Y)X(T/V)(L/V) welches in XopC DVDGVP lautet, um Motiv II (S/T) und um Motiv III K(X)_n(G/S)(D/S)XXX(D/N) welches in XopC K(X)_nGDQPSD lautet. In Motiv I werden unter den verschiedenen *HAD-like*-Proteinen die geringsten Variationen beobachtet, so dass es sich hier um das am höchsten konservierte der drei Motive handelt. Das erste Aspartat in diesem Motiv, welches in allen *HAD-like*-Proteinen konserviert ist, ist das funktionelle Nukleophil (Collet *et al.*, 1998). Motiv II enthält ein konserviertes Serin oder Threonin, welches Wasserstoffbrücken zum Phosphorylsauerstoff des Substrates bildet und so die Orientierung des nukleophilen Angriffs unterstützt (Wang *et al.*, 2001). Mit Ausnahme des Lysins interagieren alle konservierten Aminosäurereste des Motivs III mit divalenten Metallionen, meistens mit Mg²⁺, und sind für die Aktivität essentiell (Collet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Der konservierte Lysinrest befindet sich in einem Abstand zum konservierten DXXXD in Motiv III, ist aber in den katalytischen Prozess involviert, indem es mit dem Phosphoaspartat-Intermediat interagiert. In Motiv I von XopC gibt es eine Abweichung (Prolin anstelle von

4 DISKUSSION

Valin oder Leucin) im Vergleich zu anderen *HAD-like*-Proteinen. Diese befindet sich jedoch in einem weniger konservierten Aminosäurerest des Motivs und kann somit entweder toleriert werden oder ist möglicherweise spezifisch für XopC.

Auffällig ist, dass in den Homologen von XopC aus anderen *Xanthomonas* spp. die Motive I und III sowie bei dem Homolog von XopC aus *R. solanacearum* das Motiv III fehlen, was vermuten lässt, dass diese Proteine ihre Funktion verloren haben.

Die potenzielle *HAD-like* Hydrolase-Domäne hat einen Einfluss auf die untersuchten Funktionen von XopC. So konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss der *HAD-like* Hydrolase-Domäne von XopC auf die Komplementation von *Xcv* 85-10 Δ *xopC* in Bezug auf die Verzögerung der AvrBs1-vermittelten HR gezeigt werden. Durch ein XopC-Derivat, das eine Mutation des essentiellen Aspartats in Motiv I trägt, war dies nicht möglich. Auch die Erhöhung der CaOAS-TL-Aktivität durch XopC war von der potenziellen *HAD-like* Hydrolase-Domäne von XopC abhängig. Diese experimentellen Daten deuten darauf hin, dass die potenzielle *HAD-like* Hydrolase-Domäne von XopC, vor allem das konservierte Aspartat in Motiv I, für die Funktion von XopC eine wesentliche Rolle spielt.

Die Durchführung von Enzymaktivitätstests wäre eine geeignete Methode, um die *HAD-like* Hydrolase-Funktion von XopC näher zu analysieren. Eine nicht unerhebliche Schwierigkeit dabei stellt die mangelnde Kenntnis des Substrates dar. Auf Grund der zahlreichen verschiedenen Funktionen der Mitglieder der *HAD-like* Superfamilie, kommen zahlreiche, insbesondere phosphorylierte Substrate für *HAD-like* Hydrolasen in Frage. Dies konnte beispielsweise für *HAD-like* Phosphatasen aus *E. coli* gezeigt werden, bei denen ausschließlich phosphorylierte Substrate untersucht wurden (Kuznetsova *et al.*, 2006). Da die *HAD-like* Superfamilie jedoch auch andere Hydrolasen umfasst, welche unterschiedliche Proteinfaltungen zeigen (Burroughs *et al.*, 2006), erweitert sich die Anzahl der möglichen Substrate um ein vielfaches. Dieser evolutionär bedingte Prozess wird auch als *evolutionary exploration of substrate space* bezeichnet (Anantharaman *et al.*, 2003). Eine naheliegende Vermutung ist, dass die OAS-TL ein Substrat einer potenziellen *HAD-like* Hydrolase-Funktion von XopC sein könnte, wofür auch die Erhöhung der Aktivität der OAS-TL durch XopC, jedoch nicht durch XopC_{D693A} spricht. Allerdings konnte *in vitro* keine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es bisher ebenfalls keinerlei beschriebenen Zusammenhang zwischen *HAD-like* Hydrolasen und einer Aktivitätsbeeinflussung von OAS-TLs. Allerdings könnte es sein, dass die Interaktion beider Proteine ein dynamischer, transientser Prozess ist, welche bisher *in vitro* nicht detektiert werden konnte. Daher könnten weitere Interaktionsstudien mit

loss-of-function-Mutationen eines oder beider Proteine doch noch eine direkte Interaktion zeigen.

Es ist jedoch auch möglich, dass XopC und OAS-TL, deren Interaktion *in vivo* gezeigt wurde, nicht direkt miteinander interagieren, sondern ein weiteres Molekül involviert ist. Bei diesem könnte es sich sowohl um ein drittes Protein als auch um Metabolite oder eine kleine RNA handeln. Um einen logischen Kandidaten für eine weitere Komponente der Interaktion von XopC und OAS-TL handelt es sich bei den beiden Substraten der OAS-TL, OAS und Na₂S. Beide waren in den bisherigen *in vitro*-Interaktionsuntersuchungen nicht anwesend und sollten in zukünftigen Studien einbezogen werden. Auch der Kofaktor der OAS-TL, PLP, könnte eine mögliche Komponente der Interaktion oder sogar ein Substrat der potenziellen *HAD-like* Hydrolase-Funktion von XopC sein, zumal die PLP-Phosphatasen zur Familie der *HAD-like* Hydrolasen gehören (Lu *et al.*, 2005; *Arabidopsis thaliana* project). Dazu sollte untersucht werden, ob XopC in der Lage ist, PLP zu dephosphorylieren, was letzten Endes einen Einfluss auf jedes, vom Kofaktor PLP abhängigen Enzym haben könnte. Möglicherweise ist OAS-TL und damit der Schwefelstoffwechsel auch nicht das primäre Ziel von XopC, sondern ein Nebeneffekt. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der in der Hefe-Di-Hybrid-Sichtung gefundene Interaktor, OAS-TL, näher analysiert. Denkbar wäre auch, dass es weitere pflanzliche Proteine gibt, die mit XopC interagieren. Dazu könnte eine weitere Sichtung von beispielsweise einer Tomaten-cDNA-Bibliothek oder auch *in planta*-Interaktionsstudien wie GFP-*trapping* durchgeführt werden.

4.2 XopC moduliert die pflanzliche Abwehr durch die Induktion der Expression von 1,3- β -Glucanase

Da XopC dazu beiträgt, die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu modulieren, wurde untersucht, ob ein Einfluss auf die Expression verschiedener *PR*- (*pathogen related*) Gene nachweisbar ist. Im Allgemeinen werden *PR*-Gene während einer Infektion mit verschiedenen Pathogenen von zahlreichen Pflanzen exprimiert. Die kodierten Proteine werden in mehrere Familien klassifiziert, ihre Funktion ist jedoch teilweise noch unbekannt (van Loon *et al.*, 2006). Bei der Analyse der Expression von *PR1a*, *PR4*, *PR10* und *SGT1* nach Inokulation von resistenten Paprikapflanzen mit *Xcv* konnte kein differentielles Muster nachgewiesen werden, da die Schwankungen innerhalb der Replikate keine Auswertung zuließen. Dies könnte daran liegen, dass verschiedenen *PR*-Gene durch äußere Einflüsse wie Verwundung oder abiotischen Stress induziert werden (Cheong *et al.*, 2002; Norváth *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2007), denen Pflanzen permanent ausgesetzt sind.

4 DISKUSSION

Bei der Analyse der Transkriptmengen von *1,3-B-Glucanase* zeigte sich jedoch bei allen Replikaten ein Unterschied in der Menge von mit *Xcv* 85-10 oder *Xcv* 85-10 Δ *xopC* inokuliertem Blattmaterial (3.6), was durch quantitative real-time PCR quantifiziert werden konnte (3.6).

Die Erhöhung der Transkriptmenge der *1,3-B-Glucanase* in mit *Xcv* 85-10 inokuliertem Blattmaterial korreliert dabei mit einer erhöhten *1,3-B-Glucanase*-Aktivität. Ähnliche Beobachtungen konnten auch durch Joosten & de Wit bereits im Jahr 1989 gemacht werden. Sie zeigten, dass die Infektion von Tomatenblättern mit *Cladosporium fulvum* zu einer Erhöhung der Expression der *1,3-B-Glucanase* sowie deren Aktivität führt.

Es ist bekannt, dass die Expression von *1,3-B-Glucanase* in Tabakzellkulturen durch H_2O_2 induziert werden kann (Kim *et al.*, 1998). Wird jedoch wie im hypothetischen Modell (Abb. 4.2) davon ausgegangen, dass XopC, welches in *Xcv* 85-10 präsent ist, die ROS- und somit auch die H_2O_2 -Konzentration senkt, steht die Induktion der Expression des *1,3-B-Glucanase*-Gens im Widerspruch zu den der Theorie der ROS-Pufferung. Wird jedoch der zeitliche Verlauf berücksichtigt, so kann festgestellt werden, dass die differentielle Expression des *1,3-B-Glucanase*-Gens vier Stunden nach Inokulation mit *Xcv* zu beobachten ist. Die HR hingegen kann makroskopisch frühestens einen Tag nach Inokulation zu beobachten und durch *electrolyte leakage*-Messungen 13 Stunden nach Inokulation gemessen werden. Möglicherweise hat XopC mehrere vom Fortschritt der Infektion der Pflanzen mit *Xcv* abhängige Funktionen.

Eine denkbare Erklärung für die Induktion der Expression des *1,3-B-Glucanase*-Gens wäre die Konkurrenzsituation zwischen verschiedenen pflanzenpathogenen Organismen bezüglich desselben Wirtes. So ist bekannt, dass eine Erhöhung der *1,3-B-Glucanase*-Konzentration in Pflanzen eine wesentliche Rolle in der Abwehr der Pflanzen gegen Pilze spielt. Vor allem in Kombination mit Chitinase (PR2) inhibiert *1,3-B-Glucanase* das Pilzwachstum durch die Degradation der Pilzzellwand (Mauch *et al.*, 1988; Ham *et al.*, 1991). Die Expression von *1,3-B-Glucanase* wird beispielsweise nach Inokulation von Weizen mit *Pseudomonas syringae* induziert (Liu *et al.*, 2010). Induziert *Xcv* eine solche *1,3-B-Glucanase*-Konzentrations- und Aktivitätserhöhung, könnte dies zu erhöhten Barrieren für Pilze und Oomyzeten bei der Infektion der Wirtspflanze führen. Andererseits lässt die sehr frühe Induktion der Expression der *1,3-B-Glucanase* nach Infektion mit *Xcv* auch die Vermutung zu, dass bereits auf der Zielpflanze befindliche Pilze verdrängt werden sollen. Damit ergäbe sich ein Vorteil für *Xcv*. Es ist bekannt, dass das pflanzenpathogene Bakterium *Pseudomonas fluorescens* (Stamm Pf-5) abhängig von einem funktionellen Typ-III-

Sekretionssystem Gurkenpflanzen vor Schäden durch *Pythium ultimum* schützt, indem es vermutlich die Synthese von fungiziden Sekundärmetaboliten induziert (Rezzonico *et al.*, 2005). Ebenfalls durch *Pseudomonas fluorescens*, aber auch durch *Pseudomonas putida* wird das Wachstum von *Phytophthora parasitica* inhibiert (Chang *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass im Boden enthaltene Bakterien das Wachstum von arbuskulären Mykorrhizen inhibieren können (Rousk *et al.*, 2008; Leigh *et al.*, 2011). Weiterhin ist bekannt, dass *Trichoderma asperellum* das Wachstum von *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in Tomatenpflanzen inhibiert (Segarra *et al.*, 2010) und *Pichia anomala* Grauschimmelfäule bei Äpfeln kontrolliert (Friel *et al.*, 2007). Letzteres ist abhängig von zwei Exo-1,3-B-Glucanasen der Hefe. Andererseits gibt es auch das Phänomen, dass Pilze und Bakterien sich gegenseitig begünstigen. Dies wurde beispielsweise für die Interaktion zwischen *Aspergillum fumigatus* und *Paenibacillus vortex* gezeigt (Ingham *et al.*, 2011). Um die Theorie der Hemmung des Pilzbefalls auf Paprika durch Induktion der 1,3-B-Glucanase experimentell zu belegen, könnten suzeptible, mit *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopC* infizierte Pflanzen zusätzlich mit beispielsweise *Colletotrichum capsici* infiziert werden (Hadden & Black, 1989; Pakdeevaporn *et al.*, 2005). Reziprok dazu könnten bereits mit Pilz infizierte Pflanzen zusätzlich mit *Xcv* infiziert werden. Die Ausbreitung des Pilzes auf den Paprikapflanzen könnte dann verfolgt und Rückschlüsse auf den Präventionserfolg durch die Expression von 1,3-B-Glucanase gezogen werden.

Literatur

- Abeles FB & Forrence LE (1970) Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol*; 45(4): 395-400
- Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB & Martin GB (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*; 22(1): 60-9
- Abramovitch RB, Janjusevic R, Stebbins CE & Martin GB (2006) Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(8): 2851-6
- Achard P, Vriezen WH, Van der Straeten D & Harberd NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell*; 15(12): 2816-25
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. Academic Press
- Alfano JR & Collmer A (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell*; 8(10): 1683-98
- Alfano JR & Collmer A (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*; 179(18): 5655-62
- Alfano JR & Collmer A (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*; 42: 385-414
- Álvarez C, Bermúdez MÁ, Romero LC, Gotor C & García I (2012) Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytol*; 193(1): 165-77
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA & Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*; 92(6): 773-84
- Anantharaman V, Aravind L & Koonin EV (2003) Emergence of diverse biochemical activities in evolutionary conserved structural scaffolds of proteins. *Curr Opin Chem Biol*; 7(1): 12-20
- Anderson DM, Fouts DE, Collmer A & Schneewind O (1999) Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggest universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(22):

12839-43

- Anderson DM & Schneewind O (1997) **A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*; 278(5340): 1140-3**
- Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baid C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C & Genin S (2006) ***Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(39): 14620-5**
- Arabidopsis thaliana* project, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Aravind K, Galperin MY & Koonin EV (1998) **The catalytic domain of the p-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci*; 23(4): 127-9**
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T (2006) **The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*; 22(2): 195-201**
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willman MR, Chiu WL, Gómez-Gómez L, Boller T, Ausubel FM & Sheen J (2002) **MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*; 415(6875): 977-83**
- Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F & Höfte M (2007) **Resistance to *Bortrytis cinerea* in sitiens, an abscisic-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in epidermis. *Plant Physiol*; 144(4): 1863-77**
- Astua-Monge G, Minsavage GV, Stall RE, Davis MJ, Bonas U & Jones JB (2000a) **Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact*; 13(9): 911-21**
- Astua-Monge G, Minsavage GV, Stall RE, Vallejos CE, Davis MJ & Jones JB (2000b) ***Xv4-vrxv4*: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol Plant Microbe Interact*; 13(12): 1346-55**
- Ausubel FM (2005) **Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*; 6(10): 973-9**
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (eds.; 1996) **Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York**

- Axtell MJ, Chisholm ST, Dahlbeck D & Staskawicz BJ (2003) Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol*; 49(6): 1537-46
- Badel JL, Charkowski AO, Deng WL & Collmer A (2002) A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Hrp pathogenicity island conserved effector locus, *hopPtoA1*, contributes to efficient formation of bacterial colonies *in planta* and is duplicated elsewhere in the genome. *Mol Plant Microbe Interact*; 15(10): 1014-24
- Badel JL, Nomura K, Bandyopadhyay S, Shimizu R, Collmer A & He SY (2003) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Mol Microbiol*; 49(5):1239-51
- Badel JL, Shimizu R, Oh HS & Collmer A (2006) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *avrE1/hopM1* mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*; 19(2): 99-111
- Bai J, Choi SH, Ponciano G, Leung H & Leach JE (2000) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol Plant Microbe Interact*; 13(12): 1322-9
- Becker MA, Kredich NM & Tomkins GM (1969) The purification and characterization of O-acetylserine sulhydrolase-A from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*; 244(9): 2418- 27
- Bell KS, Sebahia M, Pritchard L, Holden MT, Hyman LJ, Holeva MC, Thomson NR, Bentley SD, Churcher LJ, Mungall K, Atkin R, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Clark K, Doggett J, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Norbertczak H, Ormond D, Price C, Quail MA, Sanders M, Walker D, Whitehead S, Salmond GP, Birch PR, Parkhill J & Toth IK (2004) Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(30): 11105-10
- Benjamin R & Scheres B (2008) Auxin: the looping in plant development. *Annu Rev Plant Biol*; 59: 443-65
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y & King J (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant Signal Behav*; 4(2): 158-9

- Biffen RH (1905) **Mendel's laws of inheritance and wheat breeding.** *J Agr Sci*; 1: 1-48
- Binet R, Létoffé S, Ghigo JM, Delepelaire P & Wandersman C (1997) **Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters-a review.** *Gene*; 192(1): 7-11
- Bittel P & Robatzek S (2007) **Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity.** *Curr Opin Plant Biol*; 10(4): 335-41
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A & Bonas U (2009) **Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors.** *Science*; 326(5959): 1509-12
- Boch J, Verbsky ML, Robertson TL, Larkin JC & Kunkel BN (1998) **Analysis of resistance gene-mediated defense response in *Arabidopsis thaliana* plants carrying a mutation in CPR5.** *Mol Plant Microbe Interact*; 11(12): 1196-206
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hanh S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A & Bonas U (2009) **Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.** *Science*; 326(5959): 1509-12
- Boerjan W, Ralph J & Baucher M (2003) **Lignin biosynthesis.** *Annu Rev Plant Biol*; 54: 519-46
- Bogdanova N & Hell R (1997) **Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J*; 11(2): 251-62
- Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Pnapoulos NJ & Van Gijsegem F (1996) **Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria.** *Mol Microbiol*; 20(3): 681-3
- Bonas U, Stall RE & Staskawicz B (1989) **Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *Mol Gen Genet*; 218(1): 127-36
- Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ & Stall RE (1991) **Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato .** *Mol Plant Microbe Interact*; 4(1): 81-8
- Bonas U, Conrads-Strauch J & Balbo I (1993) **Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*.** *Mol Gen Genet*; 238(1-2): 261-9
- Bowles DJ (1990) **Defense-related proteins in higher plants.** *Annu Rev Biochem*; 59: 873-

- Boyer HW & Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; 41(3): 459-72
- Bretz JR, Mock NM, Charity JC, Zeyad S, Baker CJ & Hutcheson SW (2003) A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol Microbiol*; 49(2): 389-400
- Brown I, Mansfield J & Bonas U (1995) *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. *Mol Plant Microbe Interact*; 8(6): 825-36
- Bryers JD (1993) Bacterial biofilms. *Curr Opin Biotech*; 4(2):197-204
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkins AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM & Collmer A (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(18): 10181-6
- Büttner D & Bonas U (2002) Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol*; 10(4): 186-92
- Büttner D & Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol*; 9(2): 193-200
- Büttner D & Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*; 34(2): 107-33
- Büttner D & He SY (2009) Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiol*; 150(4): 1656-64
- Büttner D, Lorenz C, Weber E & Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type II secretion system by a HpaC- and HpaB dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*; 59(2): 513-27
- Büttner D, Noël L, Thieme F & Bonas U (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J Biotechnol*; 106(2-3) 203-14

- Burghout P, van Boxtel R, Van Gelder P, Ringler P, Müller SA, Tommassen J & Koster M (2004) **Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*; 186(14): 4645-54**
- Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D & Aravind L (2006) **Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *J Mol Biol*; 361(5): 1003-34**
- Canteros B, Minsavage G, Bonas U, Pring D & Stall R (1991) **A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Mol Plant Microbe Interact*; 4(6): 628-32**
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Longsdon Jr. JM, Henze K, Gupta A, Wang CC, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM & Johnson PJ (2007) **Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*; 315(5809): 207-12**
- Cascales E & Christie PJ (2003) **The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*; 1(2): 137-49**
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ & Voytas DF (2011) **Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*; 39(12): e82**
- Chang JH, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM & Dangl JL (2005) **A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(7): 2549-54**
- Chisholm ST, Coaker G, Day B & Staskawicz BJ (2006) **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*; 124(4): 803-14**

- Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek KH & Hwang I (2010) **The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*.** *Dev Cell*; 19(2): 284-95
- Chosed R, Tomchick DR, Brautigam CA, Mukherjee S, Negi VS, Machius M & Orth K (2007) **Structural analysis of *Xanthomonas* XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitin-like protein proteases.** *J Biol Chem*; 282(6): 6773-82
- Chung EH, da Cunha L, Wu AJ, Gao Z, Cherkis K, Mackey D & Dangl JL (2011) **Specific threonine phosphorylation of a host target by two unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants.** *Cell Host Microbe*; 9(2):125-36
- Ciesiolka LD, Hwin T, Gearlds JD, Minsavage GV, Saenz R, Bravo M, Handley V, Conover SM, Zhang H, Caporgno J, Phengrasamy NB, Toms AO, Stall RE & Whalen MC (1999) **Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*.** *Mol Plant Microbe Interact*; 12(1): 35-44
- Claret L, Calder SR, Higgins M & Hughes C (2003) **Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly.** *Mol Microbiol*; 48(5): 1349-55
- Clemens S (2001) **Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.** *Planta*; 212(4): 475-86
- Clontech (2008) **Yeast Protocol Handbook.** Clontech Laboratories, Inc. , A Takara Bio Company , 1290 Terra Bella Ave. , Mountain View, CA 94043 , Technical Support (US)
- Collet JF, Stroobant V, Pirard M, Delpierre G & van Schaftingen E (1998) **A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif.** *J Biol Chem*; 273(23): 14107-1
- Collet JF, Stroobant V & van Schaftingen E (1999) **Mechanistic studies of phosphoserine phosphatase, an enzyme related to P-type ATPases.** *J Biol Chem*; 274(48): 33985-90
- Collmer A, Lindeberg M, Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ & Alfano JR (2002) **Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for TTSS prospectors.** *Trend Microbiol*; 10(10): 462-9
- Conrath U, Pieterse CM & Mauch-Mani B (2002) **Priming in plant-pathogen interactions.** *Trends Plant Sci*; 7(5): 210-6
- Coplin DL & Cook D (1990) **Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria.** *Mol Plant Microbe Interact*;

3(5): 271-9

Cornelis GR & Van Gijsegem F (2000) **Assembly and function of type III secretory systems.** *Annu Rev Microbiol*; 54: 735-74

Costerton JW, Ellis B, LamK, Johnson F & Khoury AE (1994) **Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria.** *Antimicrob Agents Ch*; 38(5): 2803-9

Croft K, Juttner F & Slusarenko AJ (1993) **Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.** *Plant Physiol*; 101(1): 13-24

Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C & Genin S (2004) **Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system.** *Mol Microbiol*; 53(1): 115-28

Dangl JL & Jones JD (2001) **Plant pathogens and integrated defence responses to infection.** *Nature*; 411(6839): 826-33

Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyc MK, Byrde RJW and Fielding AH (1984) **Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* using the broad host range cosmid pLAFR1.** *EMBO J.*; 3: 3323-8

Da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira Aj, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite Rp, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meianis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC & Kitajima JP (2002) **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities.** *Nature*; 417(6887): 459-63

Delepelaire P (2004) **Type I secretion in gram-negative bacteria.** *BBA-Molecular Cell Research*; 1694(1-3): 149-61

DebRoy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K & He SY (2004) **A family of conserved**

- bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(26): 9927-32
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S & Marco Y (2003) **Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(13): 8024-9
- de Torres M, Mansfield JW, Grabov N, Brown IR, Ammouneh H, Tsiamis G, Forsyth A, Robatzek S, Grant M & Boch J (2006) ***Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defense in Arabidopsis.** *Plant J*; 47(3): 368-82
- Devadas SK & Raina R (2002) **Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis hrl1* mutant.** *Plant Physiol*; 128(4): 1234-44
- DeYoung BJ & Innes RW (2006) **Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense.** *Nat Immunol*; 7(12): 1243-9
- Dharmapuri S & Sonti RV (1999) **A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence.** *FEMS Microbiol Lett*; 179: 53-9
- Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA & Dangl JL (1994) **Arabidopsis mutants simulating disease resistance response.** *Cell*; 77: 565-77
- Dixon DP, Laphorn A & Edwards R (2002) **Plant glutathione transferases.** *Genome Biol*; 3(3): REVIEWS3004
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U & Hacker J (2004) **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms.** *Nat Rev Microbiol*; 2(5): 414-24
- Domínguez-Solís JR, Gutierrez-Alcalá G, Vega JM, Romero LC & Gotor C (2001) **The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance.** *J Biol Chem*; 276(12): 9297-302
- Domínguez-Solís JR, López-Martín MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC & Gotor C (2004) **Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Biotechnol J*; 2(6): 469-76
- Dong X (2004) **NPR1, all things considered.** *Curr Opin Plant Biol*; 7(5): 547-52
- Dow JM, Osbourn AE, Wilson TJG & Daniels MJ (1995) **A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis.** *Mol*

- Plant Microbe Interact*; 8(5): 768-77
- Droux M (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth Res*; 79(3): 331-48
- Engler C, Kandzia R & Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high through put capability. *PLoS One*; 3(11): e3647
- Escolar L, Van Den Ackerveken G, Pieplow S, Rossier O & Bonas U (2001) Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol*; 2(5): 287-96
- Espinosa A, Guo M, Tam VC, Fu ZQ & Alfano JR (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol*; 49(2): 377-87
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K & Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J*; 18(17): 4689-99
- Eulgem T & Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol*; 10(4): 366-71
- Figurski & Helinski (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76(4): 1648-52
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391(6669): 809-11
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*; 45: 680-5
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*; 9:275-96
- Flors V, Ton J, Jakab G & Mauch-Mani B (2005) Absicic acid and callose: team players in defence against pathogens? *J Phytopathol*; 153: 377-83
- Forquin MP, Hébert A, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier JF, Landaud S, Junot C, Bonnarne P & Martin-Verstraete I (2011) Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. *Appl Environ Microbiol*; 77(4): 1449-59
- Friel D, Pessoa NM, Vandenbol M & Jijakli MH (2007) Seperate and combined disruptions

- of two Exo-beta-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Mol Plant Microbe Interact*; 20(4): 371-9
- Fritig B, Heitz T & Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol*; 10(1): 16-22
- Fujikawa T, Ishihara H, Leach JE & Tsuyumu S (2006) Suppression of defense responses in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol Plant Microbe Interact*; 19(3): 342-9
- Gaitonde MK (1967) A Spectrophotometric Method for the Direct Determination of Cysteine in the Presence of Other Naturally Occurring Amino Acids. *Biochem J*; 104(2): 627-33
- Gaudriault S, Paulin JP & Barny MA (2002) The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Mol Plant Pathol*, 3(5):313-20
- Gene Pool, <http://genepool.kribb.re.kr/new/index.php>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Ghosh P (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev*; 68(4): 771-95
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*; 43: 205-27
- Gómez-Gómez L & Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci*; 7(6): 251-6
- Goodman RN & Novacky AJ (1994) *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society
- Greenberg JT & Ausubel FM (1993) *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J*; 4(2): 327-41
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF and Ausubel FM (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*; 77: 551-83
- Greenberg JT (1997) PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; 48: 525-45
- Greenberg JT & Vinatzer BA (2003) Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr Opin Microbiol*; 6(1): 20-8

- Guilfoyle TJ & Hagen G (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol*; 10(5): 453-60
- Guo M, Tian F, Wamboldt Y & Alfano JR (2009) The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*; 22(9): 1069-80
- Gürlebeck D, Jahn S, Gürlebeck N, Szczesny R, Szurek B, Hahn S, Hause G & Bonas U (2009) Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4. *Mol Plant Pathol*; 10(2): 175-88
- Hadden JF & Black LL (1989) Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. Proc. Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics, AVRDC, Tainan, Taiwan: 189-99
- Ham KS, Kauffmann S, Albersheim P & Darvill AG (1991) Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragment from fungal walls. *Mol Plant Microbe Interact*; 4(6): 545-52
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*; 8(10): 1773-91
- Hann DR & Rathjen JP (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*; 49(4): 607-18
- Hann DR, Gimenez-Ibanez S & Rathjen P (2010) Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr Opin Plant Biol*; 13(4): 388-93
- Hauck P, Thilmony R & He SY (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(14): 8577-82
- Havre PA & Evans DR (1983) Disassembly and characterization of the nuclear pore complex-lamina fraction from bovine liver nuclei. *Biochem*, 22: 2852-60
- Hay A, Barkoulas M & Tsiantis M (2006) ASSYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development*; 133(20): 3955-61
- He P, Shan L & Sheen J (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol*; 9(6): 1385-96
- He SY, Nomura K & Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta*; 1694(1-3): 181-206

- Heeg C, Kruse C, Jost R, Gutensohn M, Ruppert T, Wirtz M & Hell R (2008) Analysis of the *Arabidopsis* O-Acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell*; 20(1): 168-85
- Heesemann J, Algermissen B & Laufs R (1984) Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*; 46(1):105-10
- Hell R, Jost R, Berkowitz O & Wirtz M (2002) Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*; 22(3): 245-57
- Holland IB, Schmitt L & Young J (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Mol membr Biol*; 22(1): 29-39
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K & Mudgett MB (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. *Mol Microbiol*; 50(2): 377-89
- Huguet E, Hahn K, Wengelnik K & Bonas U (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol*; 29(6): 1379-90
- Hulanicka MD, Garrett C, Jagura-Burdzy G & Kredich NM (1986) Cloning and Characterization of the *cysAMK* Region of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*; 168(1): 322-7
- Hwang BK, Sunwoo JY, Kim YJ & Kim BS (1997) Accumulation of B-1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL-beta-amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol Mol Plant P*; 51(5): 305-22
- Hwang IS, An SH & Hwang BK (2011) Pepper *asparagine synthetase 1* (*CaAS1*) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant J*; 67(5): 749-62
- Ingham CJ, Kalisman O, Finkelshtein A & Ben-Jacob E (2011) Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortres*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108(49): 19731-6
- InterproScan, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Jackson RW, Athanassopoulos E, Tsiamis G, Mansfield JW, Sesma A, Arnold DL, Gibbon MJ, Murillo J, Taylor JD & Vivian A (1999) Identification of a pathogenicity island,

- which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid on the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(19): 10875-80
- Jakobek JL, Smith JA & Lindgren PB (1993) Suppression of bean responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*; 5(1): 57-63
- Jambunatha N, Siani JM & McNelli TW (2001) A humidity-sensitive *Arabidopsis* copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell*; 13: 2225-40
- Jamir Y, Guo M, OH HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A & Alfano JR (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J*; 37(4): 554-65
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB & Stebbins CE (2006) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defense is an E3 ubiquitin ligase. *Science*; 311(5758): 222-6
- Johnson TL, Abendroth J, Hol WG & Sandkvist M (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett*; 255(2): 175-86
- Jones JB (1991) Bacterial Spot. In: Jones JB et al. (eds.) *Compendium of Tomato Diseases*. APS press; p.27
- Jones JB, Stall RE & Bouzar H (1998) Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu Rev Phytopathol*; 36: 41-58
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE & Schaad NW (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*; 27(6): 755-62
- Jones JD & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*; 444(7117): 323-9
- Joosten MH & De Wit PJ (1989) Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol*; 89(3): 945-51
- Jost R, Berkowitz O, Wirtz M, Hopkins L, Hawkesford MJ & Hell R (2000) Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol)lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*; 253(2): 237-47
- Kachroo A, He Z, Patkar R, Zhu Q, Zhong J, Li D, Ronald P, Lamb C & Chattoo BB (2003) Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance

- to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Res*; 12(5): 577-86
- Kao CC, Barlow E & Sequeira L (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol*; 174(3): 1068-71
- Karimi M, Inzé D & Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*; 7(5): 193-5
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G & Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*; 318(5850): 648-51
- Kearney B & Staskawicz BJ (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*; 346(6282): 385-6
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L & Schwede T (2009) The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acid Res*; 37(Database issue): D387-92
- Kim JG, Taylor Kw, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA & Mudgett MB (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected leaves. *Plant Cell*; 20(7): 1915-29
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL & Mackey D (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*; 121(5): 749-59
- Kim SJ, Jae HK, Ky YP & Sun HL (1998) Generation of active oxygen species (AOS) and induction of β -glucanase activity by fungal elicitor xylanase in the suspension cultured cells of tobacco. *J Plant Biol*; 41(1): 43-9
- Kim Y, Yakunis AF, Kuznetsova E, Xu X, Pennycooke M, Gu J, Cheung F, Proudfoot M & Arrowsmit CH (2004) Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem*; 279(1): 517-26
- Knoop V, Staskawicz B & 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. *J Bacteriol*; 173(22): 7142-50
- Koebnik R (2001) The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol*; 9(12): 586-90
- Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A & Bonas U (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol*; 188(21): 7652-60

- Koonin EV & Tatusov RL (1994) **Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases define a large superfamily of hydrolases with diverse specificities. Application of an iterative approach to database search.** *J Mol Biol*; 244(1): 125-32
- Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG & Stathopoulos C (2005) **Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane.** *J Bacteriol*; 187(13): 4306-14
- Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR & Tommassen J (1997) **The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex.** *Mol Microbiol*; 26(4): 789-97
- Kousik CS & Ritchie DF (1999) **Development of bacterial spot on near-isogenic lines of bell pepper carrying gene pyramids composed of defeated major resistance genes.** *Phytopathology*; 89(11): 1066-72
- Kredich NM, Becker MA & Tomkins GM (1969) **Purification and characterization of cysteine synthetase, a bifunctional protein complex, from *Salmonella typhimurium*.** *J Biol Chem*; 244(9): 2428-39
- Kredich NM (1971) **Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth on varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression.** *J Biol Chem*; 246(11): 3474-84
- Kredich NM (1996) **Biosynthesis of cysteine.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology* (Ed. Neidhard FC), American Society for Microbiology, Washington D.C.; S. 514-27
- Kruse C, Haas FH, Jost R, Reiser B, Reichelt M, Wirtz M, Gershenzon J, Schnug E & Hell R (2012) **Improved sulfur nutrition provides the basis for enhanced production of sulfur-containing defense compounds in *Arabidopsis thaliana* upon inoculation with *Alternaria brassicicola*.** *J Plant Physiol*; 169(7): 740-3
- Kruse C, Jost R, Lipschis M, Kopp B, Hartmann M & Hell R (2007) **Sulfur-enhanced defence: effects on sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle.** *Plant Biol (Stuttg)*; 9(5): 608-19
- Kuhlemeier C (2007) **Phyllotaxis.** *Trends Plant Sci*; 12(4): 143-50
- Kunkel BH & Chen Z (2006) **Virulence strategies of plant pathogenic bacteria.** *Prokaryotes*; 2: 421-40
- Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzalez CF, Brown G, Omelchenko MV, Carmel L, Wolf YI, Mori

- H, Savchenko AV, Arrowsmith CH, Koonin EV, Edwards AM & Yakunin AF (2006) **Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family.** *J Biol Chem*; 281(47): 36149-61
- Laemmli UK (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*; 227(5259): 680-5
- Lam E (2004) **Controlled cell death, plant survival and development.** *Nat Rev Mol Cell Bio*; 5(4): 305-15
- Leigh J, Fitter AH & Hodge A (2011) **Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in oranic matter in copetition with soil bacteria.** *FEMS Microbiol Ecol*; 76(3): 428-38
- Leustek T, Martin MN, Bick JA & Davies JP (2000) **PATHWAYS AND REGULATION OF SULFUR METABOLISM REVEALED THROUGH MOLECULAR AND GENETIC STUDIES.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; 51: 141-65
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R & Lamb C (1994) **H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response.** *Cell*; 79(4): 583-93
- Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou JM & Shao F (2007) **The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family.** *Science*; 315(5814): 1000-3
- Lindeberg M, Stavrinides J, Chang JH, Alfano JR, Collmer A, Dangl JL, Greenberg JT, Mansfield JW & Guttman DS (2005) **Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*.** *Mol Plant Microbe Interact*; 18(4): 275-82
- Lindeberg M, Cartinhour S, Myers CR, Schechter LM, Schneider DJ & Collmer A (2006) **Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains.** *Mol Plant Microbe Interact*; 19(11): 1151-8
- Lindgren PB, Peet RC & Panopoulos NJ (1986) **Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants.** *J Bacteriol*; 168(2): 512-22
- Lisenbee CS, Karnik SK & Trelease RN (2003) **Overexpression and mislocalization of tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER.** *Traffic*; 4(7): 491-501
- Liu B, Xue X, Cui S, Zhang X, Han Q, Zhu L, Liang X, Wang X, Huang L, Chen X & Kang Z

- (2010) Cloning and characterization of a wheat β -1,3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol Biol Rep*; 37(2): 1045-52
- Liu Y, Schiff M & Dinesh-Kumar SP (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*; 31(6): 777-86
- López-Martin MC, Becana M, Romero LC & Gotor C (2008) Knocking out cytosolic cysteine synthesis compromises the antioxidant capacity of the cytosol to maintain discrete concentrations of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*; 147(2): 562-72
- López-Solanilla E, Bronstein PA, Schneider AR & Collmer A (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol*; 54(2): 353-65
- Lorenz C (2009) Funktionelle Charakterisierung der konservierten Komponenten HrcN und HrcU des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. (Dissertation)
- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U & Büttner D (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol*; 69(2): 344-60
- Lorenz C & Büttner D (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*; 191(5): 1414-28
- Lorrain S, Vaillau F, Balague C & Roby D (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*; 8(6): 263-71
- Losada LC & Hutcheson SW (2005) Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol*; 55(3): 941-53
- Lu Z, Dunaway-Mariano D & Allen KN (2005) HAD superfamily phosphotransferase diversification: structure and function analysis of HAD subclass IIB sugar phosphatase BT4131. *Biochemistry*; 44(24): 8684-96
- Mackey D, Holt BF 3rd, Wiig A & Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*; 108(6): 743-54

- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR & Dangl JL (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*; 112(3): 379-89
- Mandal S, Das RK & Mishra S (2011) Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol Biochem*; 49(2): 117-23
- Marois E, Van den Ackerveken G & Bonas U (2002) The *xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact*; 15(7): 637-46
- Meagher RB (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol*; 3(2): 153-62
- Ménard R, Sansonetti PJ & Parsot C (1993) Nonpolar Mutagenesis of the *ipa* Genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as Effectors of *Shigella flexneri* Entry into Epithelial Cell. *J Bacteriol*; 175(18): 5899-906
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A & Moreno-Sánchez R (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev*; 29(4): 653-71
- Metz M, Dahlbeck D, Morales CQ, AlSady B, Clark ET & Staskawicz BJ (2005) The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamina*. *Plant J*; 41(6): 801-14
- Mew TW (1987) Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Ann Rev Phytopathol*; 25: 359-82
- Michiels T, Vanooteghem JC, Lambert de Rouvroit C, China B, Gustin A, Boudry P & Cornelis GR (1991) Analysis of *virC*, an operon involved in secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*; 173(16): 4994-5009
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*; 31(3): 426-42
- Minamino T & MacNab RM (2000) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol*; 35(5): 1052-64
- Mindrios M, Katagiri F, Yu GL & Ausubel FM (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene

- RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*; 78(6): 1089-99**
- Minsavage GV, Dahlbeck D, Whalen MC, Kearney B, Bonas U, Staskawicz BJ & Stall RE (1990) **Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant Microbe Interact*; 3(1): 41-4**
- Mittler R, Shulaev V & Lam E (1995) **Coordinating Activation of Programmed Cell Death and Defense Mechanisms in Transgenic Tobacco Plants Expressing a Bacterial Proton Pump. *Plant Cell*; 7(1): 29-42**
- Morales CQ, Posada J, Macneale E, Franklin D, Rivas I, Bravo M, Minsavage J, Stall RE & Whalen MC (2005) **Functional analysis of the early chlorosis factor gene. *Mol Plant Microbe Interact*; 18(5): 477-86**
- Mou Z, Fan W & Dong X (2003) **Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*; 113(7): 935-44**
- Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U & Staskawicz BJ (2000) **Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(24): 13324-9**
- Mukaihara T & Tamura N (2009) **Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of *hrpB*-regulated gene products. *Microbiology*; 155(Pt 7): 2235-44**
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H & Prats E (2008) **The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*; 59(3): 501-20**
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, & Kimura T (2007) **Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, 104(1): 34-41**
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I & Yoshida S (2003) **Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J*; 33(5): 887-98**
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N & Dunand C (2010) **Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Intergr Plant Biol*; 52(2): 195-204**
- Natale P, Brüser T & Driessen AJM (2008) **Sec- and Tat-mediated protein secretion across**

- the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1778(9): 1735-56
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O & Jones JD (2006) **A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling.** *Science*; 312(5772): 436-9
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP & Jones JD (2008a) **DELLAs control plant immune response by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling.** *Curr Biol*; 18(9): 650-5
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY & Voinnet O (2008b) **Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins.** *Science*; 321(5891): 964-7
- NCBI BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Newman MA, Ropenack-Lahaye E v, Parr A, Daniels MJ & Dow JM (2002) **Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria.** *Plant J*; 29(4)
- Niepol F, Anderson D & Mills D (1985) **Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 82(2): 406-10
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D & Bonas U (2001) **cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrp*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *Mol Microbiol*; 41(6): 1271-81
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D & Bonas U (2002) **Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island.** *J Bacteriol*; 184(5): 1340-8
- Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D & Bonas U (2003) **XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *J Bacteriol*; 185(24): 7092-102
- Noji M, Murakoshi I & Saito K (1994) **Molecular cloning of a cysteine synthase cDNA from *Citrullus vulgaris* (water melon) by genetic complementation in an *Escherichia coli* Cys- auxotroph.** *Mol Gen Genet*; 244(1): 57-66
- Noji M, Saito M, Nakamura M, Aono M, Saji H & Saito K (2001) **Cysteine synthase overexpression in tobacco confers to tolerance to sulfur-containing environmental pollutants.** *Plant Physiol*; 126(3): 973-80
- Nomura K, Melotto M & He SY (2005) **Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions.** *Curr Opin Plant Biol*; 8(4): 361-8

- Nomura K, DebRoy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J & He SY (2006) **A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease.** *Science*; 313(5784): 220-3
- Nürnberger T & Scheel D (2001) **Signal transmission in the plant immune response.** *Trends Plant Sci*; 6(8): 372-9
- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B & Piater L (2004) **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences.** *Immunol Rev*; 198: 249-66
- Nürnberger T & Kemmerling B (2006) **Receptor protein kinases-pattern recognition receptors in plant immunity.** *Trends Plant Sci*; 11(11): 519-22
- Nunes-Düby SE, Matsumoto L & Landy A (1989) **Half att site substrates reveal the homology independence and minimal protein requirements for productive synapsis in lambda excisive recombination.** *Cell*; 59(1): 197-206
- O'Garro LW, Gibbs H & Newton A (1997) **Mutation in the *avrBs1* avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* influences survival of the bacterium in soil on a detached leaf tissue.** *Phytopathology*; 87(9): 960-6
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H & Ohme-Takagi M (2001) **Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression.** *Plant Cell*; 13(8): 1959-68
- Østergaard L (2009) **Dont't 'leaf' now. The making of a fruit.** *Curr Opin Plant Biol*; 12(1): 36-41
- Pakdeevaporn P, Wasee S, Taylor PWJ & Mogkolpor O (2005) **Inheritance of resistance to anthracnose by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*.** *Plant Breeding*; 124(2): 206-8
- Parsot C, Hamiaux C & Page AL (2003) **The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems.** *Curr Opin Microbiol*; 6(1):7-14
- Peitsch MC (1995) **Protein modeling by e-mail.** *Nature Biotech*; 13: 658-60
- Peng J, Deng X, Huang J, Jia S, Miao X & Huang Y (2004) **Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner.** *Z Naturforsch*; 59(11-12): 856-62
- Petricka JJ & Benfey PN (2008) **Root layers: complex regulation of developmental patterning.** *Curr Opin Genet Dev*; 18(4): 354-61
- Postel S & Kemmerling B (2009) **Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns.** *Semin Cell Dev Biol*; 20(9): 1025-31

- Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, Panopoulos NJ, Mansfield J, Pugsley AP, Karamanou S & Economou A (2003) **Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization.** *J Biol Chem*; 278(28):25816-24
- Ray SK, Rajeshwari R, Sharma Y & Sonti RV (2002) **A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimal virulence.** *Mol Microbiol*; 46(3): 637-47
- Rezzonico F, Binder C, Défago G & Moënné-Loccoz Y (2005) **The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection.** *Mol Plant Microbe Interact*; 18(9): 991-1001
- Ritter C & Dangl JL (1995) **The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on Arabidopsis.** *Mol plant Microbe Interact*; 8(3): 444-53
- Ritter C & Dangl JL (1996) **Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events by Distinct Plant Disease Resistance Genes.** *Plant Cell*; 8(2): 251-7
- Robert-Seilaniantz A, Grant M & Jones JD (2011a) **Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonat-salicylate antagonism.** *Annu Rev Phytopathol*; 49: 317-43
- Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y & Jones JD (2011b) **The microRNAs miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates.** *Plant J*; 67(2): 218-31
- Roden J, Eardley L, Hotson A, Cao Y & Mudgett MB (2004a) **Characterization of the *Xanthomonas AvrRv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells.** *Mol Plant Microbe Interact*; 17(6): 633-43
- Roden JA, Belt B, Ross JB, Tachibana T, Vargas J & Mudgett MB (2004b) **A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(47): 16624-9
- Rolland-Lagan AG (2008) **Vein patterning in growing leaves: axes and polarities.** *Curr Opin Genet Dev*; 18(4): 348-53
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U & Lahaye T (2007) **Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene.** *Science*; 318(5850): 645-8

- Römer P, Recht S, Strauss T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S & Lahaye T (2010) Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol*; 197(4): 1048-57
- Römer S, d'Harlingue A, Camara B, Schantz R & Kuntz M (1992) Cysteine synthase from *Capsicum annuum* chromoplasts. Characterization and cDNA cloning of an up-regulated enzyme during fruit development. *J Biol Chem*; 267(25): 17966-70
- Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ & Collmer A (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99(20): 13142-7
- Ronald PC & Staskawicz BJ (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol Plant Microbe Interact*; 1(5):191-8
- Rossier O, Wengelnik K, Hahn S & Bonas U (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(16): 9368-73
- Rousk J, Demoling LA, Bahr A & Bååth E (2008) Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. *FEMS Microbiol Ecol*; 63(3): 350-8
- Roy A, Kucukural A & Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*; 5(4): 725-38
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY & Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*; 8: 1809-19
- Salmeron JM, Oldroyd GE, Rommens CM, Scofield SR, Kims HS, Lavelle DT, Dahlbeck D & Staskawicz BJ (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell*; 86(1):123-33
- Salomon D, Dar D, Sreeramulu S & Sessa G (2011) Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effectors in yeast affects cell growth and viability. *Mol Plant Microbe Interact*; 24(3): 305-14
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Sandkvist M (2001) **Type II Secretion and Pathogenesis**. *Infect Immun*; 69(6): 3523
- Sato C, Oka, N, Nabeta K & Matsuura H (2011) **Cellulase applied to the leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) upregulates the production of salicylic acid and azelaic acid**. *Biosci Biotechnol Biochem*; 75(4): 761-3
- Savvides SN, Yeo HJ, Beck MR, Blaesing F, Lurz R, Lanka E, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R & Waksman G (2003) **VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights to bacterial type IV secretion**. *EMBO J*; 22(9): 1969-80
- Schechter LM, Roberts KA, Jamir Y, Alfano JR & Collmer A (2004) ***Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter**. *J Bacteriol*; 186(2): 543-55
- Schornack S, Ballvora A, Gürlebeck D, Peart J, Baulcombe D, Ganai M, Baker B, Bonas U & Lahaye T (2004) **The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3**. *Plant J*; 37(1): 46-60
- Segarra G, Casanova E, Avilés M & Trillas I (2010) ***Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron**. *Microb Ecol*; 59(1): 141-9
- Shan L, Oh HS, Chen J, Guo M, Zhou J, Alfano JR, Collmer A, Jia X & Tang X (2004) **The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector**. *Mol Plant Microbe Interact*; 17(5): 447-55
- Shirzadian-Khorramabad R, Jing HC, Everts GE, Schippers JH, Hille J & Dijkwel PP (2010) **A mutation in the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in *Arabidopsis***. *BMC Plant Biol*; 10:80
- SOLGene Solanaceae Gene Indices, <http://210.218.199.240/SOL/index.php>, letzter Besuch: 14. November 2012
- sol genomics network, <http://solgenomics.net/>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P & Dong X (2009) **Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity**. *Cell*; 137(5): 860-72
- Stall RE & Civerolo EL (1991) **Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida**. *Annu Rev Phytopathol*; 29: 399-420
- Starr MP (1981) **The genus *Xanthomonas***. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A & Schlegel HG (Ed.) *The prokaryotes*. Vol.I, Springer-Verlag Berlin, Deutschland; S.

742ff

- Staskawicz BJ, Dahlbeck D & Keen NT (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility of *Glycine max.* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA*; 81(19): 6024-8
- Stebbins CE & Galán JE (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*; 414(6859): 77-81
- Stephens WL & Starr MP (1963) Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*. *J Bacteriol*; 86: 1070-4
- Sun N, Liang J, Abil Z & Zhao H (2012) Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst*; 8(4): 1255-63
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R & Bent AF (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell*; 18(3): 764-79
- Swanson J, Kearney B, Dahlbeck D & Staskawicz B (1988) Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Mol Plant Microbe Interact*; 1(1): 5-9
- Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH & Gabriel DW (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology*; 81(7): 802-9
- Swords KM, Dahlbeck D, Kearney B, Roy M & Staskawicz BJ (1996) Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *avrBs2*. *J Bacteriol*; 178(15): 4661-9
- Szczesny R (2009) Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. (Dissertation)
- Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A & Bonas U (2010) Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist*; 187: 1058-74
- Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE & Staskawicz BJ (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(24):14153-8

- Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ & Kokkinidis M (2004) **Conserved features of type III secretion.** *Cell Microbiol*; 6(9): 805-16
- Thanassi DG & Hultgren SJ (2000) **Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane.** *Curr Opin Cell Biol*, 12: 420-30
- The Gene Index Project, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Thieme F (2006) **Genombasierte Identifizierung neuer potentieller Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** (Dissertation)
- 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 AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klöggen U, Patschkowski T, Rückert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D & Kaiser O (2005) **Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence.** *J Bacteriol*; 187(21): 7254-66
- Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G & Bonas U (2007) **New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif.** *Mol Plant Microbe Interact*; 20(10): 1250-61
- Tian GW, Mohanty A, Chary SN, Li S, Paap B, Drakakaki G, Kopec CD, Ehrhardt D, Jackson D, Rhee SY, Raikhel NV & Citovsky V (2004) **High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta.** *Plant Physiol*; 135(1): 25-38
- TIGR Solanaceae Genomics Resource, <http://www.jcvi.org/potato/>, letzter Besuch: 14. November 2012
- Ton J & Mauch-Mani B (2004) **Beta-amino-butyric acid-induced resistance against pathogens is based on ABA-dependent priming for callose.** *Plant J*; 38(1): 119-30
- Tsiamis G, Mansfield JW, Hockenull R, Jackson RW, Sesma A, Athanassopoulos E, Bennett MA, Stevens C, Vivian A, Taylor JD & Murillo J (2000) **Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease.** *EMBO J*; 19(13): 3204-14
- Van den Ackerveken G, Marois E & Bonas U (1996) **Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell.** *Cell*; 87(7): 1307-16
- Van der Biezen EA & Jones JD (1998) **Plant disease-resistance proteins and the gene-for-**

- gene concept. *Trends Biochem Sci*; 23(12): 454-6
- van der Hoorn RA & Kamoun S (2008) From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*; 20(8): 2009-17
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA & Schell J (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature*; 252(5479): 169-70
- van Loon LC, Rep M & Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plant. *Annu Rev Phytopathol*; 44: 135-62
- Van Meulenbroek L, Bussche JV, Steppe K & Vanhaecke L (2012) Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *J Chromatogr A*; 1260:067-80
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K & Kudla J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*; 40(3): 428-38
- Wang W, Kim R, Jancarik J, Yokota H & Kim SH (2001) Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methnococcus jannschii*, a hyperthermophile, at 1.8 Å resolution. *Structure*; 9: 65-71
- Wang Y, Zhang Q, Sun MA & Guo D (2011) High-accuracy prediction of bacterial type III secreted effectors based on position-specific amino acid composition profiles. *Bioinformatics*; 27(6): 777-84
- Wang Z, Wang Q, Chong K, Wang F, Wang L, Bai M & Jia C (2006) The brassinosteroid signal transduction pathway. *Cell Res*; 16(5): 427-34
- Wehling MD, Guo M, Fu ZQ & Alfano JR (2004) The *Pseudomonas syringae* HopPtoV protein is secreted in culture and translocated into plant cells via the type III protein secretion system in a manner dependent on the ShcV type III chaperone. *J Bacteriol*; 186(11): 3621-30
- 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*. *J Bacteriol*; 178(12): 3462-9
- Wengelnik K, Van den Ackerveken G & Bonas U (1996) HrpG, a key regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component

- response regulators. *Mol Plant Microbe Interact*; 9(8): 704-12
- Whalen MC, Stall RE & Staskawicz BJ (1988) Characterization of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in bean. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85(18): 6743-7
- Whalen MC, Wang JF, Carland FM, Heiskell ME, Dahlbeck D, Minsavage GV, Jones JB, Scott JW, Stall RE & Staskawicz BJ (1993) Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant Microbe Interact*; 6(5): 616-27
- Whalen MC, Richter T, Zakharevich K, Yoshikawa M, Al-Azzeh D, Adefioye A, Spicer G, Mendoza LL, Morales CQ, Klassen V, Perez-Baron G, Toebe CS, Tzovolous A, Gerstman E, Evans E, Thompson C, Lopez M & Ronald PC (2008) Identification of a host 14-3-3 protein that interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv. *Physiol Mol Plant P*; 72(1-3): 46-55
- Wichmann G & Bergelson J (2004) Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics*; 166(2): 693-706
- Williams PH (1980) Black Rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis*; 64(8): 736-42
- Wirtz M & Droux M (2005) Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth Res*; 86(3): 345-62
- Wirtz M & Hell R (2006) Functional analysis of the cysteine synthase complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol*; 163(3): 272-86
- Xiao Y, Heu S, Yi J, Lu Y & Hutcheson SW (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol*; 176(4): 1025-36
- Yang B & White FF (2004) Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant Microbe Interact*; 17(11): 1192-200
- Yang B, Zhu W, Johnson LB & White FF (2000) The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(17): 9807-12

- Yoshioka H, Asai S, Yoshioka M & Kobayashi M (2009) **Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity.** *Mol Cells*; 28(4): 321-9
- Youssefian S, Nakamura M & Sano H (1993) **Tobacco plants transformed with the O-acetylserine(thiol)lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas.** *Plant J*; 4(5): 759-69
- Youssefian S, Nakamura M, Orudjev E & Kondo N (2001) **Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpression O-acetylserine(thiol)lyase modifies plant response to oxidative stress.** *Plant Physiol*; 126(3): 1001-11
- Zenk MH (1996) **Heavy metal detoxification in higher plants - a review.** *Gene*; 179(1): 21-30
- Zhang S & Klessig DF (2001) **MAPK cascades in plant defense signaling.** *Trends Plant Sci*; 6(11): 520-7
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X & Zou JM (2007) **A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants.** *Cell Host Microbe*; 1(3): 175-85
- Zhang Y (2008) **I-TASSER server for protein 3D structure prediction.** *BMC Bioinformatics*; 9: 40
- Zhu K, González-Pedrajo B & MacNab RM (2002) **Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*.** *Biochemistry*; 41(30): 9516-24
- Zipfel C (2009) **Early molecular events in PAMP-triggered immunity.** *Curr Opin Plant Biol*; 12(4): 414-20
- Zipfel C & Felix G (2005) **Plants and animals: a different taste for microbes?** *Curr Opin Plant Biol*; 8(4): 353-60
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakley EJ, Jones JD, Felix G & Boller T (2004) **Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception.** *Nature*; 428(6984): 764-7

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Professor Dr. Ulla Bonas bedanken, die mir die Bearbeitung dieses spannenden und überraschenden Themas ermöglicht hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr und Tipps in Theorie und Praxis parat. Für ihre - gelegentlich auch nachdrückliche - Motivation bin ich ihr sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt auch Robert Szczesny, den ich insbesondere am Anfang der Arbeiten mit meinen Fragen gefordert habe, der aber immer eine gute Idee hatte und von dem ich viel gelernt habe. Für hilfreiche Diskussionen möchte ich mich außerdem bei den weiteren „Effektor-Leuten“ Sebastian Schulze, Heike Berndt, Doreen Schmidt und Antje Krüger bedanken.

Bianca Rosinsky danke ich für die liebevolle Betreuung der Versuchspflanzen. Carola Kretschmar danke für die exzellenten Sequenzen, sowie Marina Schulze dafür, dass sie sich immer um die Versorgung mit Medien und sauberem Laborequipment gekümmert hat.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Bonas möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken. Steve, du warst ein toller Labornachbar.

Mein aufrichtiger Dank gilt der AG Hell in Heidelberg, besonders Markus Wirtz, der mir geduldig alle meine Fragen zu OAS-TLs beantwortet hat und mit dessen Hilfe ich viele experimentelle Ansätze erarbeiten konnte.

Meinen Freunden gilt mein Dank für die manchmal notwendige Ablenkung von der Wissenschaft und den vielen Spaß, den ich hatte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Keppo und Maria bedanken, die mir das Studium der Biochemie ermöglicht haben. Danke auch, dass ihr nicht immer alles ganz genau wissen wolltet.

Bei meinem Mann Lars möchte ich mich für einfach alles bedanken.

Anhang

DNA-Sequenz von *xopC* (ORF)

ATGAAAACAAGTAGTGCAAGCAAGTCTCATTATACTGGCCAATTTCCCCAGGGGGATTTGCAGCCAAA
AACTCCAATTCAGTGGGACGCAATAGCGAAATTCCAAAGGATGCGGCATTAAGCGCCCAACTAAAGG
GGCTCCGCCCTCTTGATCGTAAGCCATCTAAAATGCCAATTCTAGCAGTGATCTTCAGGCGGTCAAT
AAGATGATTGCCGAGAATCGCTCGAACGACGTTGGAAAAGGTCAGTTTCTTCTCTACCCAAAGCCT
AGGTTCTGCAGAACGTGTAGATTCGCAAACTACCATTACGGAATGAATCGGGGAAAGCGCCTCTCT
TTTTTAGCGAATTTGCTACTGAGAAGCCATCTTTACAATCAGTGAAAAGCCTCTCGCAGGGAAAGCAG
GACTATTATGCAGTTAGACATGTGGGAAAGCGTGGTCGAGATTTATTACCGATGAACCAATCGAGGG
CGAAAATAGCAAACCTCGGCAGACTAAAAACCAGCCCGCTGTTAAGTACTCAGAGTCAGGGAACACGTG
CTATTCGAGCTTTCGCGGCTACAGCGACAATCGATAAATCTCGTGGAGAATACGTCGCACGTCTGCAT
CGCCATGTAGTTGAGGCTTTAGGCGATGAAGGTGGTGTGGTTCATTTGCTAAGGCCGACGCGTGATCA
CTATGCCGAAGATAGTACATTGAACCTTTTACCTTCTGCGAACAAACAGAGCTGGCCAGTTCACTGA
ACTCCTTAGAAGCTATTTAGCTAAGAAGGAGGACAGAAAGCCTATTGTATTTACAGATCATAAGTCC
CTCGTGGGTCTTTCAAGAACCTCGCGTACAGAAGCGAGTCCGATTGGCCGTTTGGTACAGCAGCCTTA
TTTCGTTACATCCGACCTGAAACGTGGCGATAAAGTTGTCATTACCGATGACCACATTACAGCAGGAG
GATCTATGCTGGCAATGGAAGCAGCAGCCAAGGAGGCAGGTGTGGACGTGCTTGCTCTTGCAACGCTG
AGCGCCCATCCATTTTACCAGCACTTACCATGTCTCCGAGGTGAGCGCTTTTTTAGACGAAACCT
AGCAGCTTGGGATCCTCAAGGAAAGGTTACTGAACGCTTGGCCGAATCGGAATGCCGCGTGAGAAGT
TAACCAACAGCGAAGCGATGATTTTAAATCGCCTACGCAATAGATCCGGCCAGCGATTCGGCAATCTTA
AGATTCGAGTCAATTCAAAATAACTTGTTCAAAAGAGCCCATCTTCACAATGTAGGGATAGACCCGGA
CGCGCCAGATACGCTTGAGCAAATGCAAAAACCTAAGTTCCATGCAAGAGATGGCAGGGACGGATTCTG
CGCGTCACTTCGTAGATGATGCGAAAGTTCTCGAAGGTGAGCATGATTCGCTTATTCTATCTTGAAA
ATGAAACCTGCTTACCTGATGAAATCGTGAAAGAGCTCGACCAAGTTAGTTTGGCGAGCCGTTCCCTC
AATCCAAGCGTCTGAGGTAAAACAGGTGTCGTATTGGATTGGGACGACTGTCTGCGTGACGAAAAAG
GATTGAATTATAAGCTTATGCATAACGCGTTGGCTATCACAGCAAGGGAACATGCGTCGACATTGCCT
GAACTCGGAGATGCCGTAGCGTCTGCACAGCAAGTTGAACGGTGCAGAACCGGTGACGAGGAAGC
GCCATTGCTGATGAAAAATCAAAAAGACTTTTTCATCTTATTTGATGGGTAGGCAAAGCATATATAAGC
GCCACATAATTGAAGATTTTGTTCGAAAATGCTCCCAGGAATTTCTGAGCATAAAGCAGCGTCGATA
ATAATGCCGTATACTCTAACTTTGTCCGCGAATATAAAATGCTAGTAAAGCCGGAAGTTTTCGAAAA
AAATTATAGTCGAGATGTTCCGTTCCCGGATATTGAGCTTTCCCTACTTCTGGCGCAAAGAAATTC
TGGAGAAATCACGCAATGCGAATTCGCGTCATATTGATCAGTAATCGCGGCCATGGCGATTTGGAA
ACGAGATCAATCATCTTGGCATGATGCACTACTTTGACGTGGTGTCCGGCGCGGAAGAAGTACCCT
TGAAAAGTCGATTTGCCCTTCTCAAATGCCTGAAGATTTGCAGAAGCGACTTATCAATTCATTGA
ATGGCAGTGACGAAGAAGCACTACGGGCTACTCTTTCAGAGGCAGCAATTTACGCCATCCGGATTCC
ACGACCATTGAACGGATCGACAAAAAACAGATTCAACGAGATTGGCAGAGAGCCTTGAGCGGCTCTC
GGTTCAACCTAATGTGCCGATAACCTCTTACGGCGATCAACCCTCCGATATCAAGCAATTAAGAGTG
TTGCGGAGCCAAAGAGCCGTGACTCAAGGGGGTGATCGTCAACGCGCAGCGTGACGACGTGGGCAGG
GAAATTGATGTCGACGGGGTGCCAACCCGTGTTGTATCTAAAATCACGGAACCTTAG

ANHANG

Proteinsequenz von XopC

MKTSSASKSHYTGQFPQGDLPKTPVGRNSEIPKDAALSAQLKGLRPLDRKPSKMPTSSSDLQAVN
KMIENRSNDVGKGQFLLSTQSLGSAERVDSQNYHSRNEGKAPLFFSEFATEKPSLQSVKSLSQGKQD
YYAVRHVVGKRGDLFTDEPIEGENSKLGRKTSPLLSTQSQGTRAIRAFAATATIDKSRGEYVARLHR
HVVEALGDEGGVVHLLRPTRDHYAEDSTLNFFTFCEQTELASLNSLEAISAKKEDRKPIVFTDHKSL
VGLSRTSRTEASPIGRLVQQPYFVTSDLKRGDVITDDHIQAGGSMLAMEAAAKEAGVDVLAALATLS
AHPFSPQLTMSSEVSAFLDETLAAWDPQGVKTERLAAIGMPREKLTNSEAMILIAYAIDPASDSAILR
FESIQQNLFKRAHLHNVGIDPDAPDTLEQMQLSSMQEMAGTDSARHFVDDAKVLEGEHDSLIPILKM
KPASPDEIVKELDQVSLASRSSIQASEVKQVVLDWDDCLRDEKGLNYKLMHNALAITAREHASTLPE
LGDAVAVLHSLNGAEPVDEEAPLLMKNQKDFSSYLMGRQSIYKRHIIEDFVRKMLPGISEHKAASIN
NAVYSNFVREYKMLVKPEVSKKNYSRDVPPDIELSLLPGAKEILEKSRNANSRVILISNRGHGDLN
EINHLGMMHYFDVVSGAEEVTLEKSHLPPSQMPEDLQKRLINSLNGSDEEALRATLSEAAIYHPDST
TIERIDKKPDSTRLAESLERLSVQPNVPITSYGDQPSDIKQLKSVAEPKSRVLKGVIVNAQRDDVGRE
IDVDGVPTRVSKITEL

- X - vorhergesagte Phosphoribosyltransferasedomäne
- X - vorhergesagte *HAD-like* Hydrolase-Domäne

ANHANG

Kodierende DNA-Sequenz von *CaOAS-TL*

ATGGCAGCAGAAAAGAATGGAATTGCCAAGGATGTAAGTGAATTGATCGGTAACACTCCTTTGGTTTAA
CCTGAATAATGTTGTGGATGGGTGTGTTGGACGTGTTGCTGCCAAGCTGGAAAGCATGGAGCCATGCT
CTAGTGTTAAGGATAGGATTGGTTATAGTATGATTACTGATGCTGAGGAGAAGGGCCTAATCAAACCC
GGCGAGAGTGTTCTCATCGAACCTACAAGTGGAAACACCGGTGTTGGATTAGCATTATGGCTGCTGC
TAAAGGCTACAAACTCATCATTACGATGCCTTCTTCAATGAGTCTTGAGAGAAGAATTATTCTGCGTG
CTTTCGGTGCTGAGTTGGTGCTTACTGATCCGGCAAAAGGGATGAAAGGTGCTATTTCTGAAGGCTGAA
GAGATAAAGGCCAAAACACCCAACTCCTATATTCTTCAGCAATTTGAAAACCCTGCAAACCCAAAGAT
ACACTATGAAACCACTGGTCCTGAGATCTGGAAAGGCTCAAACGGGAAAGTGGATGCTCTAGTCTCTG
GAATTGGAACAGGAGGCACAATAACAGGTTTCAGGCAAGTATTTAAGAGAGCAGAACCCCAACATCAAG
CTGTATGGCGTGGAAACCAGTTGAAAGTGCTATTCTTTCTGGTGGAAAGCCTGGTCCACATAAGATTCA
GGGGATTGGTGCTGGTTTTCGTTCTGGTGTTTTGGAAGTTAACCTTATTGATGAAGTAGTTCAAGTTT
CAAGTGAAGAATCCATAGAAATGGCAAAGCTTTTTGGCGATGAAGGAAGGATTGCTTGTGGGAATATCA
TCTGGTGCTGCTGCCGCTGCCGCAATTAACCTTGCTAAGCGCCCTGAAAATTCTGGGAAGCTCTTTGT
TGTTATTTTCCCAAGTTTTCGGGGAGCGATATCTCTCCTCCGTGCTCTTTGAATCTGTCAGACGGGAAG
CAGAGAACATGACCGTGGAGCCTTGA

Proteinsequenz von *CaOAS-TL*

MAAEKNGIAKDVTELI GNTPLVYLNNVVDGCVGRVAAKLESMEPCSSVKDRIGYS MITDAEEKGLIKP
GESVLI EPTSGNTGVGLAFMAAAKGYKLIITMPSSMSLERRIILRAFGAELVLTDPAKGMKGAISKAE
EIKAKTPNSYILQQFENPANPKIHYETTGP EIWKGSNGKVDALVSGIGTGGTITGSGKYLREQNPNIK
LYGVEPVESAILSGGKPGPHKI QGIGAGFVPGVLEVNLIDEVVQVSSEESIEMAKLLAMKEGLLVGIS
SGAAAAAAIKLAKRPENSGKLFVVI FPSFGERYLSSVLFESVRREAENMTVEP

Lebenslauf

Zur Person

Name: Eva-Maria Herzfeld
geb. Plugge

Anschrift: Ludwig-Wucherer-Straße 14
0 61 08 Halle (Saale)

Geb. am: 16. April 1979 in Haltern (Westfalen)

Ausbildung

1989 - 1998 Clemens-Brentano-Gymnasium Dülmen (Abschluss: Abitur)

1998 - 2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2003 - 2004 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Thema „Charakterisierung der spacio-temporären Expression des E- und P-Selektin-Gens im Hühnerembryo“
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

2007-2011 Promotionsarbeit im Fachbereich Genetik am Institut für Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg

Beruflicher Werdegang

2004-2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Neuroonkologischen Labor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Thema: Tumorspezifische Antigene in malignen Hirntumoren)

seit 2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Thema: Neuroprotektive Mechanismen verschiedener Wirkstoffe)

Publikationen

Söling A, **Plugge EM**, Schmitz M, Weigle B, Jacob R, Illert J, Holzhausen HJ, Rainov NG „Autoantibodies to the inhibitor of apoptosis protein survivin in patients with brain tumors“; *Int J Oncol* 2007; 30(1): 123-8

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den 21. November 2012

Eva-Maria Herzfeld