

**Funktionelle Charakterisierung des C-terminalen Bereiches von
AvrBs3 aus *Xanthomonas* und Identifizierung neuer pflanzlicher
Interaktionspartner**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anika Sorgatz
geb. am 03.09.1984 in Halle/Saale

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bonas
2. Prof. Dr. D. Scheel
3. Prof. Dr. C. Gatz

Tag der Verteidigung: 23.04.2015

Zusammenfassung

Der TAL-Effektor AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* wird über das Typ-III-Sekretionssystem in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert und lokalisiert in den pflanzlichen Zellkern. Dort bindet AvrBs3, vermittelt durch die zentrale *repeat*-Region, an das sogenannte UPA-EBE (*effector binding element*) im Promotor von UPA-Genen und aktiviert deren Transkription. In suszeptiblen Paprikapflanzen induziert AvrBs3 eine Hypertrophie der Mesophyllzellen durch die Induktion des Schlüsselregulators UPA20. In *Bs3*-resistenten Paprikapflanzen, induziert AvrBs3 die *Bs3*-Expression, wodurch die HR (*hypersensitive response*) ausgelöst wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Analyse der C-terminalen Region von AvrBs3. Es war bekannt, dass Kernlokalisierungssignale (NLS) und die Aktivierungsdomäne (AD) im C-terminalen Bereich von AvrBs3, zur Virulenz- und Avirulenzaktivität beitragen. Hier wurde die AR- (*adjacent to repeats*)-Region durch Mutationsanalysen näher untersucht. AR-Deletionsderivate von AvrBs3 waren in der Aktivität reduziert. Der imperfekte Leucin-Zipper der AR-Region ist für die Aktivität von AvrBs3 jedoch nicht relevant. Vielmehr scheinen AS-Substitutionen in der AR-Region von AvrBs3 und Homologen die Aktivität zu beeinflussen. Während Substitutionen von einzelnen AS in der AR-Region keinen Einfluss auf die Aktivität von AvrBs3 hatten, zeigte eine Chimäre mit neun AS-Substitutionen reduzierte Aktivität. Dies war nicht auf reduzierte DNA-Bindung an das UPA20-EBE zurückzuführen. Außerdem wurden in Hinblick auf den Mechanismus der Genaktivierung durch AvrBs3, gezielt Interaktoren des C-terminalen Bereiches, mit Hilfe eines veränderten experimentellen Ansatzes, durch die Hefe-2-Hybrid-Sichtung einer Paprika cDNA-Bibliothek identifiziert. Es wurden 57 Interaktoren identifiziert und für drei eine Interaktion mit AvrBs3 in Pflanze gezeigt. Bei diesen handelte es sich um Proteine mit Homologie zu (i) einem Zinkfingerprotein (SIZF) mit RNA-Bindemotiven, (ii) einem Protein mit einer RED-Domäne (CaRED), welches mit dem Spleißosom assoziiert sein könnte und (iii) einem CONSTANS-interagierendem Protein (CaCIP6) mit Histon H3-Bindemotiven. Ein Einfluss dieser pflanzlichen Proteine auf die Aktivität von AvrBs3 wurde bisher weder in *silencing*- noch Überexpressionsexperimenten gezeigt, so dass die biologische Relevanz der neuen Interaktionspartner noch zu klären bleibt.

Summary

The TAL effector AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is translocated via the type III secretion system into the cytoplasm of the plant cell and localizes to the plant cell nucleus. There, AvrBs3 binds, via the central repeat region to the UPA-EBE (*effector binding element*) in the promoter of UPA-genes and activates their transcription. In susceptible pepper plants AvrBs3 induces a hypertrophy of mesophyll cells via the key regulator UPA20. In Bs3-resistant pepper plants, AvrBs3 induces Bs3-expression and elicits the HR (*hypersensitive response*). The objective of this work was a detailed analysis of the C-terminal region of AvrBs3. It was known that nuclear localization signals (NLSs) and the activation domain (AD) in the C-terminal region of AvrBs3, contribute to both, the virulence and avirulence function. Here, the AR (*adjacent to repeats*) region was studied in more detail using mutation analyses. AR deletion derivatives of AvrBs3 displayed reduced activity. However, the imperfect leucine zipper motif in the AR region is not relevant for AvrBs3 activity. In fact, amino acid (aa) substitutions in AvrBs3 and homologs influence the activity. While single aa substitutions in the AR region did not have an effect, chimeric proteins with nine aa substitutions showed reduced activity. This was not due to reduced binding to the UPA20-EBE. Another goal was the analysis of the mechanism of gene induction by AvrBs3. For this, interactors of the C-terminal region of AvrBs3 were identified, using an altered experimental approach to screen a pepper cDNA library in yeast. In total 57 interactors were identified, three interact with AvrBs3 *in planta*. These proteins show homology to (i) a zinc finger protein (SIZF), containing RNA binding motifs, (ii) a protein with a RED domain (CaRED), which could be associated with the spliceosome and (iii) a CONSTANS interacting protein (CaCIP6), which contains histone H3 binding motifs. Until now a role of these plant proteins for AvrBs3 activity could not be shown by silencing or over-expression experiments. The biological relevance of the newly identified interactors has to be clarified in future.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X

1. Einleitung	1
1.1. Die Interaktion zwischen bakteriellen Phytopathogenen und der Pflanze	1
1.1.1. Die Ko-Evolution pflanzlicher Abwehrmechanismen und phytopathogener Virulenzstrategien	2
1.2. Phytopathogene Bakterien der Gattung <i>Xanthomonas</i>	4
1.3. Die AvrBs3-Effektor-Familie	6
1.3.1. Die Struktur von AvrBs3 und verwandten Proteinen.....	7
1.3.2. Die Zielgene von AvrBs3 und verwandten Proteinen	8
1.3.3. Funktionelle Rolle der C-terminalen Bereiches von AvrBs3-Homologen	11
1.3.4. Der Mechanismus der Geninduktion durch AvrBs3 und Homologe.....	12
1.3.5. Vorarbeiten und Zielstellung.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Nährmedien und Antibiotika.....	15
2.1.2. Biologisches Material	16
2.1.2.1. Pflanzenmaterial	16
2.1.2.2. Bakterien- und Hefestämme	17
2.1.3. Verwendete Plasmide	17
2.1.4. Verwendete Oligonukleotide	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Molekulargenetische Standardmethoden	18
2.2.1.1. Plasmidisolierung	18
2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	18
2.2.1.3. Elution von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen	18
2.2.1.4. Amplifikation von DNA-Fragmenten	18

2.2.1.5.	DNA-Sequenzierung	19
2.2.1.6.	Restriktionsanalysen	19
2.2.1.7.	Klonierung von DNA-Fragmenten (Klassische Klonierung)	20
2.2.1.8.	<i>golden-gate</i> -Klonierung	20
2.2.1.9.	Die Klonierung mittels des GATEWAY®-Systems (<i>gateway</i> -Klonierung)	20
2.2.1.10.	Kompetente Zellen: Herstellung und Transformation	21
2.2.1.11.	<i>A. tumefaciens</i> -vermittelte transiente Transformation in <i>N. benthamiana</i>	22
2.2.1.12.	<i>Xcv</i> -Inokulationsexperimente	22
2.2.2.	Biochemische Methoden	23
2.2.2.1.	Western-Blot-Analyse	23
2.2.2.1.1.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western-Blot	23
2.2.2.1.2.	Coomassie-Färbung	24
2.2.2.2.	Reportergenaktivierungsstudien (GUS-Assay)	24
2.2.2.3.	Leitfähigkeitsmessung	24
2.2.2.4.	Herstellung und Reinigung von rekombinanten Proteinen	25
2.2.2.4.1.	Herstellung von Proteinen in <i>E. coli</i>	25
2.2.2.4.2.	Reinigung von AvrBs3 und Derivaten mit His ₆ -Epitop	25
2.2.2.4.3.	Zwei-Schritt-Reinigung von AvrBs3 mit GST- und His ₆ -Epitop	26
2.2.2.5.	<i>In vitro</i> DNA-Bindestudien mittels <i>Electromobility Shift Assay</i> (EMSA)	26
2.2.2.6.	Isolierung von Proteinen aus Tomatenzellkernen	27
2.2.2.7.	<i>pulldown</i> mit immobilisierten His ₆ -AvrBs3 und Extrakt aus Tomatenzellkernen	28
2.2.2.8.	Hefe-2-Hybrid-Sichtung	28
2.2.2.9.	Verwendete Datenbanken	29
2.2.2.10.	Fluoreszenzmikroskopie	29
2.2.2.10.1.	GFP-Fluoreszenzmikroskopie	29
2.2.2.10.2.	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	30
2.2.2.11.	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien mittels Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)	30
2.2.2.12.	Interaktionsstudien <i>in vitro</i> mittels <i>GST-Pulldown</i>	31
2.2.2.13.	Interaktionsstudien in Hefe	31
2.2.2.14.	Virus-induziertes-Gen- <i>silencing</i> (VIGS) in <i>N. benthamiana</i>	31
2.2.2.14.1.	Erstellung der <i>silencing</i> -Konstrukte	32
2.2.2.14.2.	VIGS-Inokulation in <i>N. benthamiana</i> und <i>challenging</i> mit AvrBs3	32
2.2.2.15.	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	33
2.2.2.16.	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	33

3.	Ergebnisse	34
3.1	AvrBs3 und Homologe besitzen ein imperfektes Leucin-Zipper-Motiv	34
3.1.1	Genetische Analyse des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs in AvrBs3	35
3.2	Einfluss der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3.....	39
3.2.1	Einfluss von AS-Substitutionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3.....	39
3.2.2	Untersuchung von Einzel-Aminosäure-Substitutionen in der AR-Region von AvrBs3	44
3.2.3	Einfluss von Deletionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3	46
3.2.4	Untersuchung der Wechselwirkung von <i>repeat</i> - und AR-Region in AvrBs3	50
3.3	Identifizierung kernlokalisierter Interaktionspartner von AvrBs3	54
3.3.1	Analyse der Interaktion von AvrBs3 mit der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate	55
3.3.2	Biochemischer Ansatz zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern aus <i>Solanum lycopersicum</i>	58
3.3.3	Hefe-2-Hybrid-Sichtungen zur Identifizierung von AvrBs3- Interaktionspartnern	60
3.3.3.1	Wahl der cDNA-Bank und der Köderproteine.....	60
3.3.3.2	Sichtung der cDNA-Bank aus Paprika.....	62
3.4	Analyse der Kandidaten für AvrBs3-Interaktionspartner.....	63
3.4.1	Verifizierung der AvrBs3-Interaktionen mit den Kandidaten in Hefe	64
3.4.2	Untersuchung der Lokalisierung der potentiellen Interaktoren in <i>N. benthamiana</i>	66
3.4.3	Analyse der Interaktion von potentiellen Interaktoren und AvrBs3 <i>in planta</i>	68
3.4.3.1	BiFC zur Analyse der Interaktion <i>in planta</i>	68
3.4.3.2	Ko-Immunopräzipitation zur Untersuchung der Interaktion der potentiellen AvrBs3-Interaktoren.....	68
3.4.4	GST- <i>pull-down</i> -Analysen zur Untersuchung der direkten Interaktion zwischen AvrBs3 und pflanzlichen Proteinen.....	70
3.4.5	Identifizierung der Interaktionsdomänen in AvrBs3.....	70
3.4.6	Biologische Relevanz der AvrBs3-Interaktoren.....	73
3.4.6.1	Gen- <i>silencing</i> von AvrBs3- Interaktionspartnern in <i>N. benthamiana</i>	73
3.4.6.2	Ko-Expression von AvrBs3 und den Interaktoren in Paprika und <i>N. benthamiana</i>	75
4.	Diskussion und Ausblick	78
4.1.	Die AR-Region von AvrBs3 ist an der Geninduktion beteiligt	78

4.1.1.	Der Einfluss von Mutationen in der AR-Region auf die AvrBs3-Aktivität	79
4.1.2.	Spielt die Struktur des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 und Homologen eine Rolle bei der Genaktivierung?	81
4.1.3.	Interagiert die AR-Region mit pflanzlichen Zielproteinen?.....	83
4.1.3.1.	Bisherige Modelle der Wirkungsweise von AvrBs3	83
4.1.3.2.	Die Interaktion der AR-Region mit bereits bekannten pflanzlichen Proteinen	84
4.2.	Identifizierung von neuen pflanzlichen Interaktionspartnern von AvrBs3	85
4.2.1.	Die AD von AvrBs3 ist nicht essentiell für die Interaktion mit RED in Hefe	87
4.2.2.	Neu identifizierte pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs3 könnten an Mechanismen der Genexpression beteiligt sein.....	88
4.2.3.	Die Bedeutung der Interaktoren für die Aktivität von AvrBs3.....	90
4.2.4.	Pflanzliche Interaktoren von AvrBs3 und Homologen weisen Homologie zu Proteinen mit ähnlichen Funktionen auf	92
4.3.	Erweitertes Modell des molekularen Mechanismus der Geninduktion durch AvrBs3	94
	Literaturverzeichnis	97
	Anhang	109
	Lebenslauf.....	130
	Erklärung	131

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1:	Zick-Zack-Modell zur Koevolution pflanzlicher Abwehrmechanismen und pathogener Virulenzstrategien am Beispiel des Modellsystems <i>Xcv</i> -Paprika	5
Abbildung 2:	Struktur und Zielsequenz von AvrBs3	8
Abbildung 3:	Modell der Wirkungsweise von AvrBs3	9
Abbildung 4:	Aminosäuresequenzen der ersten 90 AS der C-terminalen Region von AvrBs3 und Hax2	12
Abbildung 5:	Imperfektes Leucin-Zipper-Motiv in AvrBs3 und Homologen aus <i>Xanthomonas</i> ssp.	34
Abbildung 6:	Analyse des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs in AvrBs3	36
Abbildung 7:	AvrBs3-WT und LZ-Derivate induzieren Hypertrophie bzw. HR in Paprika.....	38
Abbildung 8:	Analyse der Aktivität von AvrBs3-Hax2-Chimären sowie der DNA-Bindung von AvrBs3-WT und AvrBs3AR ₁₋₄₅	41
Abbildung 9:	Induktion von Hypertrophie bzw. HR in Paprika durch AvrBs3-WT und AvrBs3-Chimären.....	43
Abbildung 10:	Analyse des Einflusses von Einzel-AS-Substitutionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3	45
Abbildung 11:	Analyse des Einflusses von Deletionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3	48
Abbildung 12:	Untersuchung der durch AvrBs3-WT und AvrBs3-Deletionsderivate induzierten HR in ECW-30R-Paprikapflanzen.....	50
Abbildung 13:	Analyse der Wechselwirkung von <i>repeat</i> - und AR-Region AvrBs3.....	52
Abbildung 14:	Analyse der Interaktion zwischen AvrBs3 und der SICTD <i>in vitro</i> und in Hefe	56
Abbildung 15:	Vergleich der Reinigung von rekombinantem AvrBs3Δ2 mittels verschiedener Affinitätsreinigungen.....	59

Abbildung 16:	Untersuchung der Autoaktivität der Köderproteine BD _{Gal4} C und BD _{Gal4} CΔAD in Hefe.....	61
Abbildung 17:	Analyse der Interaktion von AvrBs3 mit den Kandidaten in Hefe.....	65
Abbildung 18:	Lokalisierung der potentiellen Interaktoren in Zellen von <i>N. benthamiana</i>	67
Abbildung 19:	Ko-Immunopräzipitation von AvrBs3Δ2 mit potentiellen pflanzlichen Interaktoren	69
Abbildung 20:	Analyse der Interaktion von SIZF, CaCIP6 und CaRED mit der Aktivierungsdomäne von AvrBs3	72
Abbildung 21:	Gen- <i>silencing</i> -Experimente von <i>NbZF</i> und <i>NbRED</i> in <i>N. benthamiana</i>	75
Abbildung 22:	Induktion von <i>Bs3</i> und des GUS-Reportergens nach Ko-Expression AvrBs3 und potentiellen Interaktoren	77
Abbildung 23:	Sequenzvergleich des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs von AvrBs3 und Homologen.....	80
Abbildung 24:	Modell des Einflusses der AR-Region von AvrBs3 auf die Induktion von <i>UPA</i> -Genen.....	82
Abbildung 25:	Modell der molekularen Wirkungsweise von AvrBs3 am Beispiel der <i>UPA20</i> -Induktion.....	96

Tabellen

Tabelle 1:	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.....	15
Tabelle 2:	Verwendete Bakterien und Hefestämme.....	17
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper	24
Tabelle 4:	Anzahl der durch Hefe-2-Hybrid-Sichtungen selektierten und spezifischen Transformanten.....	62
Tabelle 5:	Mit den Ködern BD _{Gal4} C und BD _{Gal4} CΔAD interagierende Proteinfragmente aus Tomate	63
Tabelle 6:	Kernlokalisierte Interaktionspartner von AvrBs3 und PthAs und ihre biologische Funktion.....	93

Anhang

Anhang 1:	Reportergenaktivierung durch AvrBs3 mit Separation von repeat- und AR-Region von AvrBs3.....	109
Anhang 2:	AS-Sequenzvergleich der SICTD und CsCTD	109
Anhang 3:	Reportergenaktivierung durch AvrBs3-WT und AvrBs3-iAD	110
Anhang 4:	Mit BD _{Gal4} C und BD _{Gal4} CΔAD interagierende Proteinfragmente aus Paprika	110
Anhang 5:	DNA-Sequenzen von SIZF, SIKH, CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 und CaRF2b.....	112
Anhang 6:	Aminosäuresequenzen der AR-Region von AvrBs3 und Homologen	115
Anhang 7:	Promotorsequenzen von <i>UPA20</i> und <i>Bs3</i> aus <i>C. annuum</i> ECW-30R	116
Anhang 8:	Verwendete Plasmide	117
Anhang 9:	Verwendete Oligonukleotide	125

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin(nukleotid)
AD	<i>acidic activation domain</i> , saure Transkriptionsaktivierungsdomäne
AIM	<i>Agrobacterium</i> -Inokulationsmedium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	<i>adjacent to repeat</i> , benachbart zu <i>repeat</i>
AS	Aminosäure
<i>avr</i> -; <i>Avr</i> -	Avirulenz
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
<i>Bs</i>	<i>bacterial spot</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin (nukleotid)
C-	Carboxy-
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post inoculation</i> , Tage nach Inokulation
EBE	<i>effector binding element</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , Detektionsverfahren für Western Blot-Analyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Exopolysaccharid(e)
ETI	<i>effector-triggered immunity</i> , Effektor-induzierte Immunität
ETS	<i>effector-triggered-susceptibility</i> , Effektor-induzierte Suszeptibilität
G	Guanin(nukleotid)
Gent	Gentamycin
GUS	β -Glucuronidase
<i>hpa</i> , <i>Hpa</i>	<i>hrp associated</i> , <i>hrp</i> -assoziiert
HR	hypersensitive Reaktion
<i>hrp</i> , <i>Hrp</i>	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i> , hypersensitive Reaktion und Pathogenität
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
LB	Lysogenic-Broth
LPS	Lipopolysaccharid (e)
LRR	<i>leucine rich repeats</i> , Leucin-reiche Sequenzwiederholungen
LV	Leervektor
M	molare Masse
MAMP	<i>microbial-associated molecular pattern</i> , Mikroben-assoziiertes molekulares Muster
min	Minute(n)

MUG	4-Methylumbelliferyl β -D-Glucuronidhydrat
NB	Nukleotid-Bindestelle
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NYG	<i>Nutrient-Yeast-Glycerol</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , Leserahmen
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphate <i>buffered</i> saline
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> , PAMP-induzierte Immunität
pv.	Pathovar
R, R	Resistenz
Rif	Rifampicin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
ssp.	Subspezies
T	Thymin(-nukleotid)
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> + Tween20
TBP	TATA-Bindeprotein
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPA, UPA	<i>upregulated by AvrBs3</i>
WT	Wildtyp
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xcm	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
Xoo	<i>Xanthomonas. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
YEB	<i>Yeast-Extract-Broth</i>
YEP	<i>Yeast-Extract-Peptone</i>
YNB	<i>Yeast-Nitrogen-Base</i>
% (v/v)	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
Δ	Delta, Deletion

1. Einleitung

Bakterien bilden eine der drei Domänen von Lebensformen auf der Erde und sind aufgrund ihrer großen Anpassungsfähigkeit in der Lage, sich in allen Bereichen unserer Umwelt erfolgreich anzusiedeln. Phytopathogene Bakterien verursachen jedes Jahr hohe Ernteverluste von Nutzpflanzen, weshalb die Aufklärung der molekularen Grundlagen von Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen sowie die Aufklärung der Virulenzprinzipien von großer Bedeutung für die Erzeugung gesunder Kulturpflanzen ist. Um Pflanzen zu befallen, dringen bakterielle Phytopathogene zunächst durch natürliche Öffnungen oder Verwundungen in die Pflanzen ein und kolonisieren den Interzellularraum. Während es den meisten Bakterien nicht gelingt, die diversen Abwehrmechanismen der Pflanzen zu überwinden, haben erfolgreiche Pathogene jedoch Strategie zur Überwindung dieser Abwehrmechanismen entwickelt.

Aufgrund ihrer guten experimentellen Zugänglichkeit wurden viele Gram-negative Bakterien, z.B. der Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* und *Agrobacterium* als Modellorganismen für die molekularbiologische Analyse von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen etabliert.

1.1. Die Interaktion zwischen bakteriellen Phytopathogenen und der Pflanze

Pflanzen und phytopathogene Bakterien haben im Laufe ihrer Ko-Evolution Strategien zur Abwehr von Pathogenen bzw. zur Überwindung der pflanzlichen Abwehr entwickelt. Werden anfällige (suszeptible) Pflanzen erfolgreich von bakteriellen Phytopathogenen kolonisiert, führt dies zur Auslösung von Krankheitssymptomen. Man spricht in diesem Fall von einer kompatiblen Interaktion. Im Gegensatz dazu wird bei einer inkompatiblen Interaktion das Bakterium von einer resistenten Pflanze erkannt und das Wachstum unterdrückt.

Phytopathogene Bakterien dringen meist durch natürliche Öffnungen wie Stomata, Hydathoden oder Wunden in den Interzellularraum der Pflanze ein, wo sie sich zu hohen Zelldichten vermehren. Obwohl Pflanzen zahlreiche passive Schutzmechanismen, wie chemische und mechanische Barrieren (Kutikula, Zellwände oder Sekundärmetabolite), entwickelt haben, können spezialisierte Pathogene diese Barrieren überwinden und die Pflanze besiedeln (Kunkel und Chen, 2006; Göhre und Robatzek, 2008). Hierfür haben phytopathogene Bakterien eine Reihe von Virulenzfaktoren entwickelt (Abramovitch *et al.*, 2006).

1.1.1. Die Ko-Evolution pflanzlicher Abwehrmechanismen und phytopathogener Virulenzstrategien

Durch die Entwicklung neuer Abwehr- und Angriffstrategien der Pflanze bzw. des Pathogens kommt es zu einer Art „Wettrüsten“ zwischen dem Pathogen und dem Wirt welches im sogenannten Zick-Zack-Modell verdeutlicht wurde (Jones und Dangl, 2006) (Abbildung 1).

Phytopathogene Bakterien besitzen konservierte mikrobielle Strukturen, sogenannte Mikroben- oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen- / microbial-associated molecular patterns*, PAMPs oder MAMPs) (Gudesblat *et al.*, 2009; Zipfel, 2009). Beispiele sind Lipopolysaccharide (LPS), Komponenten der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien (Dow *et al.*, 2000; Zeidler *et al.*, 2004), Teile des Elongationsfaktors Tu (EF-Tu) (Kunze *et al.*, 2004) und bakterielles Flagellin (Felix *et al.*, 1999; Zipfel und Felix, 2005). PAMPs/MAMPs werden durch Membran-lokalisierte Oberflächenrezeptoren der Pflanzenzelle (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt, was zu einer PAMP-induzierten Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI) (Jones und Dangl, 2006)(Abbildung 1) führt und die weitere Kolonisierung der Pflanze durch das Pathogen aufhalten kann.

Durch Virulenzfaktoren von Phytopathogenen kann die PTI wiederum unterdrückt werden. Eine effektive Strategie, um Virulenzfaktoren in die Pflanzenzelle zu schleusen, ist das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), das einen essentiellen Pathogenitätsfaktor darstellt (Tampakaki *et al.*, 2004). Es handelt sich hierbei um eine stark konservierte Proteinmaschine, die in den meisten Gram-negativen phytopathogenen Bakterien, außer in *Agrobacterium* ssp. und *Xylella fastidiosa* (Dow und Daniels, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2001), sowie in Tierpathogenen und Symbionten vorkommt (Hueck, 1998; Viprey *et al.*, 1998; Dale *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). Das T3SS wird von einem sogenannten *hrp*-Gencluster (*hypersensitive response and pathogenicity*, hypersensitive Reaktion und Pathogenität) kodiert (Alfano und Collmer, 2004; He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004), überspannt beide bakterielle Membranen und ermöglicht die Sekretion von Proteinen in den Apoplasten oder die direkte Translokation in das Zytosol der pflanzlichen Zelle (Büttner und Bonas, 2006). Solche Proteine sind z.B. Proteasen oder Phosphatasen und werden als Typ-III-Effektoren bezeichnet. Die Gesamtheit der etwa 20-40 Effektoren leistet einen Beitrag zur Virulenz und Fitness des Pathogens, was sich z.B. durch Ausbildung von Krankheitssymptomen oder Vermehrung von Bakterien im pflanzlichen Gewebe äußert (Mudgett, 2005; Abramovitch *et al.*, 2006; Büttner und Bonas, 2006) (Abbildung 1). So können erfolgreiche Pathogene, vermittelt durch Effektoren, die PTI unterdrücken, was zu einer Effektor-induzierten

Einleitung

Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS) der Pflanze führt und die Kolonisierung durch Pathogene erlaubt (Jones und Dangl, 2006) (Abbildung 1).

Einzelne Effektoren, welche als Avr-(Avirulenz-)Proteine bezeichnet werden, können bei Anwesenheit korrespondierender *R*-(Resistenz)-Gene der Pflanze spezifisch erkannt werden (Abbildung 1). Die größte kodierte Klasse von R-Proteinen sind die sogenannten NB-LRR Proteine. Diese wurden nach ihrer charakteristischen Nukleotid-Bindedomäne (*nucleotide binding*, NB) und den Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (*leucine rich repeats*, LRR) benannt (DeYoung und Innes, 2006; Jones und Dangl, 2006). Die *R*-Gen-vermittelte spezifische Resistenz in einer inkompatiblen Interaktion erfordert nach der Gen-für-Gen-Hypothese die Anwesenheit eines *avr*-Gens im Pathogen und eines dazu korrespondierenden *R*-Gens in der Pflanze (Flor, 1971). Ist eines der beiden Gene abwesend oder inaktiv, erfolgt keine Erkennung und das Pathogen kann in der anfälligen Pflanze Krankheitssymptome auslösen (kompatible Interaktion). Für den molekularen Mechanismus zur Erkennung von Avr-Proteinen durch pflanzliche R-Proteine wurden bisher drei Modelle beschrieben. Bei dem Rezeptor-Liganden-Modell erfolgt eine direkte Interaktion zwischen dem Avr-Protein des Pathogens (Ligand) und dem R-Protein der Pflanze (Rezeptor) (Gabriel und Rolfe, 1990; Keen, 1990). Obwohl dieses Modell in einigen Fällen molekular bestätigt werden konnte (Scofield *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006), ist jedoch für zahlreiche R-Proteine keine direkte Interaktion mit dem korrespondierenden Avr-Protein nachweisbar (Luderer *et al.*, 2001). Aufgrund dessen wurde das *guard*-(Wächter)-Modell entwickelt (Van der Biezen und Jones, 1998), welches besagt, dass das Avr-Protein indirekt durch das R-Protein erkannt wird. Das R-Protein, fungiert dabei als Wächter (*guard*) eines pflanzlichen Zielproteins (Virulenzziel), welches durch das Avr-Protein gebunden und/oder modifiziert wird. Dies wird durch das R-Protein detektiert und eine Resistenzreaktion ausgelöst (Van der Biezen und Jones, 1998). Eine Erweiterung des *guard*-Modells ist das *decoy*-(Köder)-Modell (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Bei diesem Modell dient ein, durch ein R-Protein bzw. *R*-Gen bewachtes Protein als Effektorfalle bzw. Köder für das Avr-Protein. Dieses Köder-Protein unterstützt nicht die Abwehr der Pflanze oder die Virulenz der Pathogene, ahmt aber ein Virulenzziel des Avr-Proteins nach (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Eine solche Effektorfalle können neben Proteinen auch pflanzliche Promotoren darstellen (van der Hoorn und Kamoun, 2008).

Die Erkennung von Effektoren durch die Pflanze wird als Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) bezeichnet (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006) (Abbildung 1). Im Vergleich zur PTI ist die ETI eine schnellere und oft stärkere Antwort, die zur Resistenz gegenüber dem Pathogen führt und häufig mit einem schnellen lokalen Zelltod des

pflanzlichen Gewebes einhergeht. Dieser Zelltod wird als HR (*hypersensitive response*) bezeichnet und schränkt vermutlich eine weitere Vermehrung des Bakteriums ein (Klement, 1982; Greenberg und Yao, 2004). Im Laufe der Evolution haben Pathogene verschiedene Effektoren entwickelt, die diese ETI erneut unterdrücken können (Jones und Dangl, 2006) (Abbildung 1). Ebenso können durch natürliche Selektion evolvierte R-Proteine diese Effektoren erkennen und die ETI in der Pflanze wiederum auslösen.

1.2. Phytopathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas*

Die Gattung *Xanthomonas* beinhaltet Gram-negative, stäbchenförmige, polar monotrich begeißelte Bakterien (Swings *et al.*, 1993), die von einer Hülle aus dem Exopolysaccharid Xanthan umgeben sind (Katzen *et al.*, 1996). Ihre charakteristische gelbe Färbung erhalten sie durch Xanthomonadine, bromhaltige Polyenverbindungen in der Membran (Goel *et al.*, 2002). *Xanthomonas* spp. befallen nahezu alle wichtigen Kulturpflanzen und wurden aufgrund ihres Wirtsbereichs in Pathovare (pv.) eingeteilt. Beispiele sind *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), welche die Weißblättrigkeit (*bacterial blight*) bzw. die bakterielle Streifenkrankheit (*bacterial leaf streak*) von Reis auslösen. In Asien und Afrika führen diese zu hohen Ernteverlusten (Nino-Liu *et al.*, 2006). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) löst auf verschiedenen *Citrus*-Arten Zitruskrebs (*citrus canker*) aus (Brunings und Gabriel, 2003). Die Adernschwärze bei Kohlgewächsen wird von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) verursacht und *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) ist als Erreger der eckigen Blattfleckenkrankheit auf Baumwolle (*angular leaf spot*) bekannt (Agrios, 2005; Delannoy *et al.*, 2005). Während sich einige *Xanthomonas* ssp., z.B. *Xcc* und *Xoo*, über das Xylem systemisch in der Pflanze verbreiten, vermehren sich andere Pathovare, wie z.B. *Xac* und *Xoc*, lokal begrenzt und müssen für eine weitere Verbreitung an die pflanzliche Oberfläche zurückkehren (Nino-Liu *et al.*, 2006).

Ein weiterer Vertreter ist *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), ein etablierter Modellorganismus zum Studium der molekularen Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und ihren Wirtspflanzen, dessen Genom bereits entschlüsselt wurde (Thieme *et al.*, 2005). *Xcv* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit (*bacterial spot disease*) auf Tomate (*Solanum* ssp.) und Paprika (*Capsicum* ssp.) (Abbildung 1), der in Anbaugebieten mit feucht-warmem Klima hohe Ernteverluste verursacht (Agrios, 1997). Die Infektion durch *Xcv* erfolgt meist über Stomata oder durch Verwundungen. Die Bakterien vermehren sich lokal im

Einleitung

Interzellularräum des Blattes und breiten sich nicht systemisch in der Pflanze aus. Symptome zeigen sich als nekrotische Läsionen in Blättern und Früchten. Dadurch gelangen die Bakterien wieder auf die Blattoberfläche und die Verbreitung auf weitere Pflanzen erfolgt über Regen oder Spritzwasser.

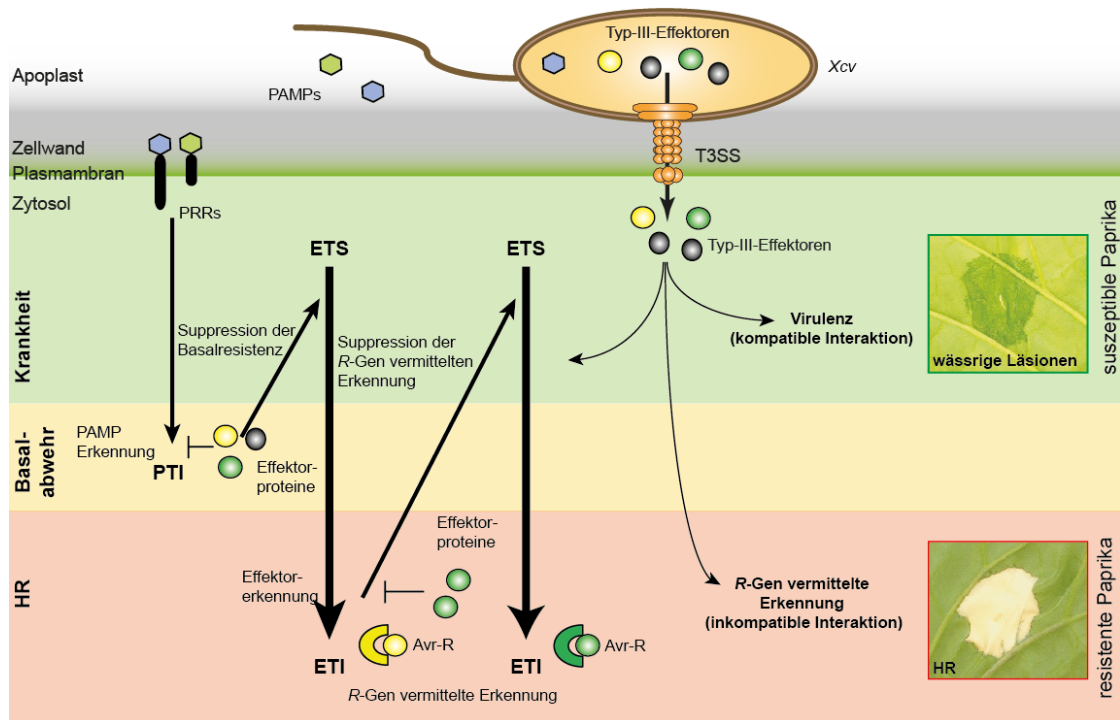


Abbildung 1: Zick-Zack-Modell zur Koevolution pflanzlicher Abwehrmechanismen und pathogener Virulenzstrategien am Beispiel des Modellsystems *Xcv*-Paprika

Die Erkennung konservierter Strukturen (PAMPs/MAMPs) durch Membran-lokalisierte PRRs der Pflanze induziert die PTI (PAMP-induzierte Immunität) als Komponente der Basalabwehr. Diese kann das Wachstum und die Verbreitung von *Xcv* innerhalb der Wirtspflanze beschränken. Translozieren Pathogene Typ-III-Effektorproteine (gelber, grüner und grauer Kreis) in das Wirtszellinnere, können einige Effektoren die PTI unterdrücken (Effektor-induzierte Suszeptibilität; ETS), was die Kolonisierung der Pflanze erlaubt. In suszeptiblen Paprikapflanzen werden Effektoren nicht erkannt und leisten einen Beitrag zur Virulenz des Pathogens und seiner Verbreitung, z.B. durch Ausbildung von wässrigen Läsionen (Bild rechts oben). Einige dieser Typ-III-Effektoren, sogenannte Avr-Proteine (Avr; Avirulenz), können R-Gen-vermittelt erkannt werden, was die Effektor-induzierte Immunität (ETI) auslöst. Die damit einhergehende HR (Bild rechts unten) verhindert die Vermehrung und Verbreitung der Pathogene. Durch Verlust des erkannten Effektorproteins und/oder Erwerb neuer Typ-III-Effektoren (grüner Kreis) können Pathogene die ETI unterdrücken oder umgehen und die Wirtspflanze erneut besiedeln. Die Entwicklung neuer R-Gen-Spezifitäten ermöglicht es der Pflanze wiederum andere bzw. die neu erworbenen Effektorproteine zu erkennen und erneut ETI zu induzieren. Das Modell wurde verändert nach (Jones und Dangl, 2006). (Bildquellen für Labor-Phänotypen: S. Hahn).

1.3. Die AvrBs3-Effektor-Familie

AvrBs3 ist das namensgebende Protein einer Effektor-Familie, welche in der Literatur als AvrBs3-, AvrBs3/PthA- oder TALE-(*transcription activator like effector*)-Familie bezeichnet wird. Das *avrBs3*-Gen wurde basierend auf seiner Erkennung in Paprikapflanzen isoliert, die das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* tragen (Bonas *et al.*, 1989). AvrBs3 wird von *Xcv* über das T3SS in die Pflanzenzelle transloziert (Szurek *et al.*, 2002). Zu Beginn dieser Arbeit waren Mitglieder der *avrBs3*-Effektor-Familie nur aus *Xanthomonas* ssp. (Schornack *et al.*, 2006) und *Ralstonia solanacearum* bekannt (Cunnac *et al.*, 2004; Mukaihara *et al.*, 2004; Heuer *et al.*, 2007) isoliert worden. Kürzlich wurden drei Gene aus *Burkholderia rhizoxinica* identifiziert, die jedoch nur geringe Ähnlichkeit zu TALEs aufweisen (Lange *et al.*, 2014).

Einige Mitglieder der AvrBs3-Familie sind essentielle Virulenzfaktoren für *Xanthomonas*, z.B. PthA aus *Xac*, welches essentiell für die Auslösung von Zitruskrebs und das Wachstum der Bakterien in *Citrus* ist (Swarup *et al.*, 1991). Für AvrXa7 aus *Xoo* konnte die Induktion von wässrigen Läsionen und bakterielles Wachstum in Reis gezeigt werden (Hopkins *et al.*, 1992; Bai *et al.*, 2000; Yang und White, 2004). Avrb6 aus *Xam* ist ein weiterer Virulenzfaktor, der wesentlich zur Ausbildung wässriger Läsionen in suszeptiblen Baumwollpflanzen und zur bakteriellen Freisetzung beiträgt (Yang *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996).

AvrBs3 aus *Xcv* induziert in den suszeptiblen Wirtspflanzen Paprika und Tomate eine Hypertrophie (Marois *et al.*, 2002). Ebenso konnten für AvrBs3 nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer auch Hypertrophiesymptome in anderen *Solanaceen*, z.B. *Nicotiana benthamiana*, beobachtet werden (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). Die Hypertrophie ist eine Vergrößerung von Mesophyllzellen in infizierten Blättern und spielt vermutlich eine Rolle in der Freisetzung der Bakterien aus dem infizierten Gewebe (Marois *et al.*, 2002). Obwohl AvrBs3 nicht essentiell für die Pathogenität von *Xanthomonas* ist, könnte die durch AvrBs3 induzierte Hypertrophie einen Einfluss auf die Virulenz der Bakterien haben (Hahn, 2009). Tatsächlich konnten Feldstudien zeigen, dass AvrBs3 einen positiven Einfluss auf die bakterielle Verbreitung hat (Wichmann und Bergelson, 2004).

1.3.1. Die Struktur von AvrBs3 und verwandten Proteinen

Sequenzanalysen isolierter *avrBs3*-Familienmitglieder aus *Xanthomonas* weisen eine hohe Sequenzidentität auf Proteinebene auf (> 80%) (Gabriel, 1999; Schornack *et al.*, 2006). AvrBs3 ist eines der am besten charakterisierten Proteine dieser Effektorfamilie, deren Proteinstruktur in drei Bereiche eingeteilt werden kann. So enthalten AvrBs3 und Homologe einen N-terminalen Bereich, welcher ein Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal, sowie eine Bindestelle für das generelle Typ-III-Chaperon HpaB trägt (Rossier *et al.*, 1999; Szurek *et al.*, 2002; Büttner *et al.*, 2004) (Abbildung 2 A). Im C-terminalen Bereich von AvrBs3 und verwandten Proteinen befinden sich typische eukaryotische Proteinmotive. Dazu zählen drei Kernlokalisierungssignale (*nuclear localisation signals*, NLS), von denen zwei funktionell sind, eine saure Transkriptionsaktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, AD) und ein imperfektes Leuzin-Zipper-Motiv (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Gabriel, 1999; Szurek *et al.*, 2001) (Abbildung 2 A). Die NLS und die AD sind essentiell für die Erkennung von AvrBs3 und Homologen in resistenten Pflanzen sowie für die Virulenzfunktion in suszeptiblen Wirtspflanzen (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Szurek *et al.*, 2001; Yang und White, 2004). Die NLS vermitteln eine Interaktion von AvrBs3 mit Importin α , welches zusammen mit Importin β den Kernimport des Proteins ermöglicht (Szurek *et al.*, 2001; Szurek *et al.*, 2002; Goldfarb *et al.*, 2004) (Abbildung 3).

Wie für die meisten Transkriptionsfaktoren beschrieben (Latchman, 1997), bindet AvrBs3 an pflanzliche DNA (Kay *et al.*, 2007). Die DNA-Bindung, sowie die Bildung von Homo-Dimeren wird durch die zentrale *repeat*-Region vermittelt, eine besonderes strukturelles Merkmal von AvrBs3 und Homologen, welches eine neuartige DNA-Bindedomäne darstellt (Kay *et al.*, 2007) (Abbildung 2 A). Diese Region besteht aus 1,5 bis 28,5 direkten, fast identischen Sequenzwiederholungen mit zumeist 34 Aminosäuren (AS) (Yang und White, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007; Boch und Bonas, 2010). Ausnahmen bilden Hax2 aus *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (*Xca*) (Kay *et al.*, 2005) und Brg11 aus *Ralstonia solanacearum* (Cunnac *et al.*, 2004) mit 35 AS-*repeats*. Sowohl 34 als auch 35 AS lange *repeats* sind in AvrHah1 aus *Xanthomonas gardneri* vorhanden (Schornack *et al.*, 2008). Ebenso weisen einige AvrBs3-Homologe, wie AvrXa7 aus *Xoo*, einzelne *repeats* aus 30,33 oder 42 AS auf (Yang *et al.*, 2000; Boch und Bonas, 2010). Auffällig ist, dass Variationen in den einzelnen *repeats* hauptsächlich an den AS-Positionen 12 und 13 auftreten (Boch und Bonas, 2010). Diese werden daher als hypervariable AS bezeichnet oder *repeat variable diresidue* (RVD) werden (Schornack *et al.*, 2006; Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009) (

Einleitung

Abbildung 2 B). Es wurde gezeigt, dass die Anzahl und Anordnung der *repeats* sowohl die Spezifität der Erkennung in resistenten Pflanzen als auch die Virulenzfunktion in suszeptiblen Pflanzen bestimmt (Boch und Bonas, 2010).

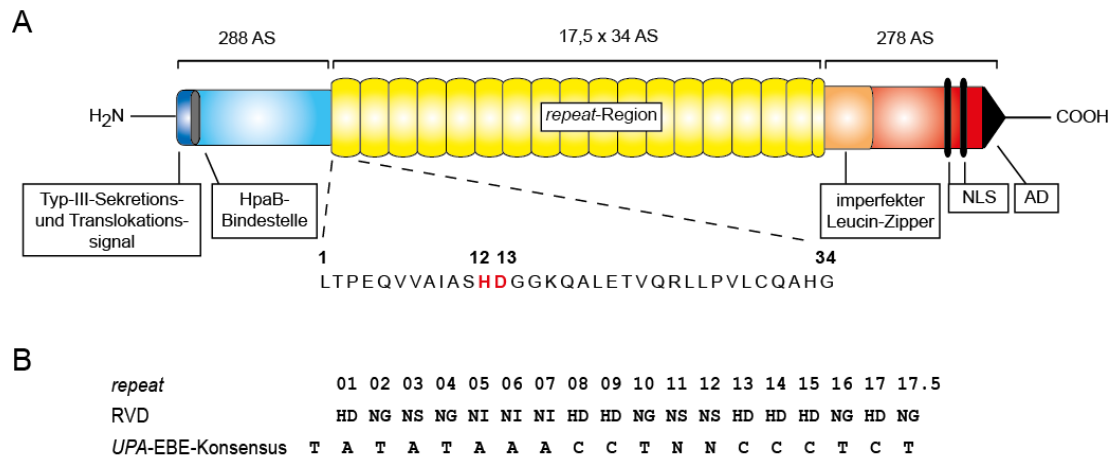


Abbildung 2: Struktur und Zielsequenz von AvrBs3

(A) Schematische Darstellung von AvrBs3. Der N-terminale Proteinbereich (blau) von AvrBs3 enthält das Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal sowie die HpaB-Bindestelle. Die zentrale *repeat*-Region (gelb) besteht aus 17,5 Wiederholungen eines fast identischen 34 AS-Motivs und bestimmt die Spezifität der Proteinaktivität. Für den ersten *repeat* ist die AS-Sequenz dargestellt. Die RVDs an Position 12 und 13 sind rot markiert. Im C-terminalen Bereich (rot) befinden sich ein imperfekter Leucin-Zipper (orange), zwei funktionale Kernlokalisationssignale (NLS) und eine saure Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). **(B)** Model der DNA-Sequenzspezifität von AvrBs3. Darstellung der RVDs der 17,5 *repeats* von AvrBs3 und der korrespondierenden *UPA20*-EBE-Konsensussequenz.

1.3.2. Die Zielgene von AvrBs3 und verwandten Proteinen

Für einige Mitglieder der AvrBs3-Familie konnten bereits Zielgene in den entsprechenden Wirtspflanzen identifiziert werden. So ist gezeigt, dass in resistenten Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R (*Early Calwonder*) das *R*-Gen *Bs3* durch AvrBs3 induziert wird, was zur Ausbildung der HR führt (Römer *et al.*, 2009) (Abbildung 3). Ein weiteres direkt durch AvrBs3 induziertes Gen ist *UPA20*, das für einen Transkriptionsfaktor der bHLH-Familie kodiert (Kay *et al.*, 2007). Dieses fungiert als Schlüsselregulator der Hypertrophie unter anderem über die Induktion von *UPA7*, welches für ein α -Expansin kodiert (Kay *et al.*, 2007) (Abbildung 3). Weitere direkte Zielgene von AvrBs3 sind *UPA15*, eine vorhergesagte Glycosyltransferase, und *UPA17*, ein möglicher GRF-Transkriptionsfaktor (Kay *et al.*, 2009). Beide Proteine könnten ebenso an der Hypertrophie beteiligt sein (Abbildung 3).

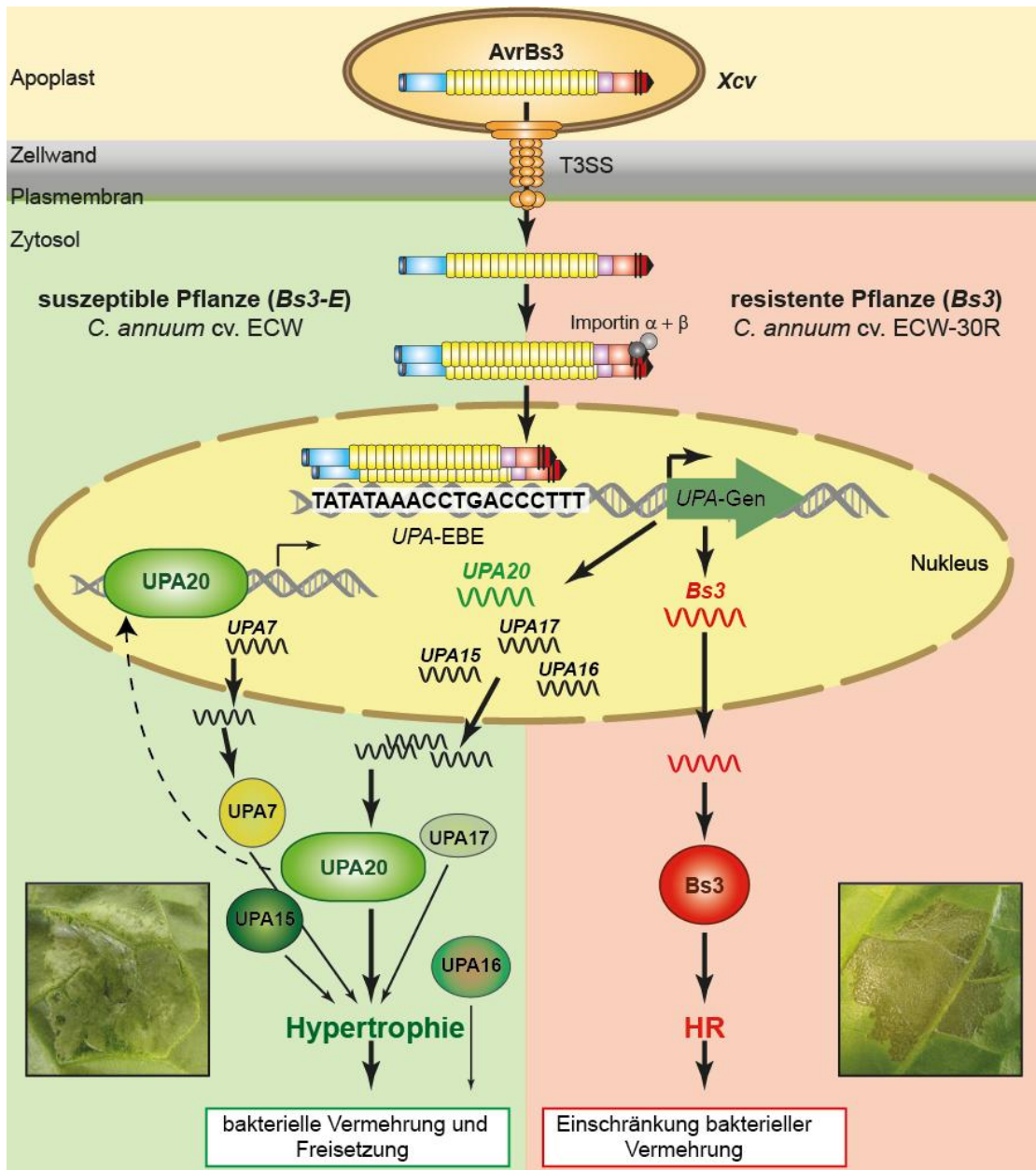


Abbildung 3: Modell der Wirkungsweise von AvrBs3

AvrBs3 wird über das T3SS von *Xcv* direkt ins Zytosol der pflanzlichen Zelle transloziert. Hier dimerisiert es und interagiert mit Importin α , das zusammen mit Importin β den Transport von AvrBs3 in den Nucleus vermittelt. In Abhängigkeit von der AD bindet AvrBs3 mit seiner *repeat*-Region direkt an das UPA-EBE in den Promotoren von UPA-Genen und induziert deren Expression. Der Schlüsselaktivator und bHLH-Transkriptionsfaktor UPA20 aktiviert unter anderem die Expression von UPA7 und löst die Hypertrophie in suszeptiblen Paprikapflanzen aus. UPA7 und weitere durch AvrBs3 induzierte Zielgene, wie UPA15 und UPA17, könnten an der Ausbildung der Hypertrophie beteiligt sein. Die Hypertrophie stellt vermutlich eine Virulenzfunktion dar, da die bakterielle Vermehrung und Freisetzung von *Xcv* gesteigert wird. Weitere Zielgene, wie UPA16 sind möglicherweise nicht an der Ausbildung der Hypertrophie beteiligt, könnten aber zur Virulenz von *Xcv* beitragen. In resistenten Paprikapflanzen induziert AvrBs3 das *Bs3*-Gen, was zur Auslösung der HR und einer Einschränkung der bakteriellen Vermehrung führt. Gezeigt ist jeweils die Blattunterseite: Es handelt sich um Laborphänotypen. Die Abbildung wurde verändert nach S. Hahn, 2009.

Einleitung

Ebenso induziert *AvrXa27* aus *Xoo* das korrespondierende *R*-Gen *Xa27* in Reis (Gu *et al.*, 2005). Hypertrophie konnte, wie für *AvrBs3* auf Paprika und Tomate, auch bei der Ausbildung von Zitruskrebs nach Infektion mit *Xac* beobachtet werden (Brunings und Gabriel, 2003). Die durch *Xac*-TALEs induzierte Pustelbildung geht mit einer Induktion des Transkriptionsfaktors *CsLOB1* einher (Pereira *et al.*, 2014) und verursacht ein Aufreißen der Epidermis und die Freisetzung der Bakterien an die Pflanzenoberfläche, was die bakterielle Verbreitung fördert (Brunings und Gabriel, 2003).

Eine weitere in den letzten Jahren sehr gut untersuchte Klasse von Zielgenen beinhaltet Mitglieder der SWEET/MtN3-Familie. Bei diesen handelt es sich um Suszeptibilitäts (*S*)-Gene, die durch TALEs induziert werden und zur Virulenz von Bakterien beitragen (Yang und White, 2004). Mitglieder dieser Familie kodieren für Membranproteine, die in Reproduktionsentwicklung, Seneszenz, Stressantwort und Ionen-/Zuckertransport involviert sind (Yuan und Wang, 2013). So konnte für die durch *Xoo*-TALEs induzierten Mitglieder der SWEET-Familie *OsSWEET11* und *OsSWEET14* aus Reis gezeigt werden, dass diese Glucose und Saccharose aus der Pflanzenzelle exportieren (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Nachdem gezeigt wurde, dass verschiedene TALEs aus *Xoo* entweder das gleiche oder verschiedene SWEET-Gene aktivieren, wurde die Bedeutung von SWEETs für die Virulenz von *Xoo* offensichtlich (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013). Ebenso induziert *TAL20* aus *Xam* den Zuckertransporter *MeSWEET10a* in Maniok und fördert die Virulenz der Bakterien (Cohn *et al.*, 2014). Die Expression der SWEET-Transporter an Stellen der bakteriellen Infektion im Wirt scheint einen Überschuss an Saccharose hervorzurufen, der in den Apoplasten transportiert wird und die Bakterien mit einer Kohlenstoffquelle versorgt (Chen, 2014). Das durch *AvrBs3* induzierte *UPA16*-Gen, kodiert ebenfalls für ein Mitglied der SWEET/MtN3-Familie (Kay und Bonas, 2009).

Im Laufe der Ko-Evolution von Phytopathogenen und Wirtspflanzen haben sich wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben Effektorfallen, wie der *Bs3*-Promotor, entwickelt. Dieser imitiert zwar das Virulenzziel des Effektors, endet aber in der Induktion von Abwehrreaktionen. Nach dem Köder-Modell wird die *Bs3*-vermittelte Erkennung von *AvrBs3* durch die spezifische Bindung an den *Bs3*-Promotor und nicht durch ein R-Protein vermittelt (Römer *et al.*, 2009). Ein ähnliches Prinzip wird für die Erkennung von *AvrXa27* aus *Xoo* vermutet (Gu *et al.*, 2005). Eine Ausnahme stellt jedoch der zu *AvrBs3* 97%-ige identische Effektor *AvrBs4* aus *Xcv* dar. Dieses Protein wird in resistenten Tomatenpflanzen unabhängig von seinen NLS und AD durch das NB-LRR R-Protein *Bs4* im Zytosol erkannt (Ballvora *et al.*, 2001; Schornack *et al.*, 2004).

Durch Sequenzvergleiche der Promotoren von verschiedenen *UPA*-Genen, *Bs3* sowie Mutantanalysen wurde ein konserviertes AvrBs3-aktivierbares Motiv identifiziert, welches als *UPA*-Box bezeichnet wurde, identifiziert (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009). Die *UPA*-Box wurde in dieser Arbeit weiterhin als *UPA*-EBE (*effector binding element*) bezeichnet. Tatsächlich wird die Spezifität der Erkennung einer Zielsequenz über die RVDs nach dem ein-*repeat*-ein-Basenpaar-Prinzip vermittelt (Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009). Dies wird durch die Projektion der hypervariablen AS von AvrBs3 auf die *UPA*-EBE-Konsensussequenz deutlich (Abbildung 2 B).

Die Auflösung der Kristall-Strukturen von AvrBs3, PthXo1 und artifiziellen TALEs und ihren Zielsequenzen zeigte den TALE-DNA-Komplex (Deng *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012; Stella *et al.*, 2013). Dabei bildet die *repeat*-Region eine rechtsgerichtete superhelikale Struktur, welche sich um die DNA wickelt und den *sense*-DNA-Strang bindet. Jeder *repeat* besteht wiederum aus zwei α -Helices, die durch einen *loop* verbunden sind, in dem sich die RVDs befinden (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Während die zweite AS der RVDs (Position 13) den direkten Kontakt zur großen Furche des *sense*-DNA-Strangs vermittelt, stabilisiert die erste AS (Position 12) die Konformation des RVD-loops (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Im N-terminalen Bereich konnten weiterhin vier degenerierte *repeats* (*repeat* -3 bis 0, AS 162-288) identifiziert werden, die eine erweiterte DNA-Bindedomäne darstellen (Gao *et al.*, 2012). Die Struktur des C-terminalen Bereiches ist bisher jedoch noch völlig unbekannt.

1.3.3. Funktionelle Rolle der C-terminalen Bereiches von AvrBs3-Homologen

Wie bereits beschrieben tragen, neben der zentralen *repeat*-Region, die NLS und AD im C-terminalen Bereich von AvrBs3 zur Virulenz- und Avirulenzaktivität bei (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Boch *et al.*, 2009). Vermutlich ist die an die *repeats* angrenzende Region von AvrBs3 und Homologen ebenfalls an der Geninduktion beteiligt. So wurden für *avrXa7* natürliche Varianten isoliert, welche Mutationen im 3'-Ende der Gene aufweisen. Diese Mutationen treten in, für Avirulenz und Virulenz, essentiellen Regionen auf (Vera Cruz *et al.*, 2000). Bevor bekannt war, dass sich AvrBs3 und Homologe als Transkriptionsfaktoren verhalten und Zielgene induzieren, erfolgten erste Studien zu chimären Proteinen. So zeigen Untersuchungen an Chimären von *avrBs3*-Homologen aus *Xoo* und *Xac*, dass ein 417 Bp-DNA-Fragment im 3'-Bereich, direkt angrenzend an die *repeat*-Region, die Ausbildung von Zitruskrebs-Symptomen, aber auch die HR in Reis beeinflusst (Ishihara *et al.*,

Einleitung

2003). Ebenso löst ein Hybridprotein aus den *repeats* von AvrBs3 und dem N- und C-terminalen Bereich von Hax2 aus *Xca* eine schwächere HR in resistenten Paprikapflanzen (*Bs3*) aus, als AvrBs3 (Kay *et al.*, 2005). Hybridproteine aus den *repeats* von AvrBs3 und den N- und C-terminalen Bereichen von Hax3 oder Hax4 zeigen dagegen keine verminderte HR-Auslösung (Kay *et al.*, 2005). Vergleiche der Aminosäuresequenz des ausgetauschten Proteinbereichs zeigen 16 AS-Substitutionen, die spezifisch für die Hax2-AvrBs3-Chimäre sind, wobei sich 15 AS-Substitutionen in den ersten 90 AS des an die *repeat*-Region anschließenden Bereiches befinden (Kay *et al.*, 2005) (Abbildung 4).

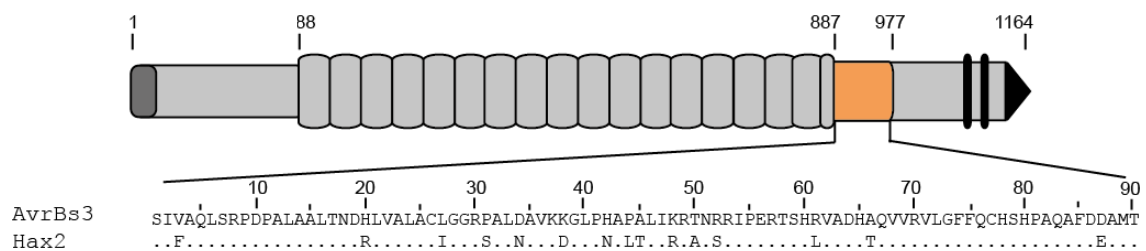


Abbildung 4: Aminosäuresequenzen der ersten 90 AS der C-terminalen Region von AvrBs3 und Hax2

Schematische Darstellung von AvrBs3. Der Bereich der AS 883-997 ist orange hervorgehoben. Darunter ist der mit Hilfe von BioEdit durchgeführte Sequenzvergleich der AS 883-997 von AvrBs3-WT, welcher die ersten 90 AS des C-terminalen Bereiches umfasst, mit den korrespondierenden AS von Hax2 dargestellt. AS-Substitutionen zwischen AvrBs3 und Hax2 sind im Einbuchstabencode angegeben und identische AS als Punkte dargestellt.

1.3.4. Der Mechanismus der Geninduktion durch AvrBs3 und Homologe

Obwohl, wie oben beschrieben, die Induktion von Zielgenen durch AvrBs3 und Homologe gezeigt wurde, war der Mechanismus der Transkriptionsinitiation zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Das betraf insbesondere die Interaktion von TALEs mit pflanzlichen Proteinen. Da TALEs als Transkriptionsfaktoren fungieren, waren vielversprechende Kandidaten solche, welche an der basalen Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind.

Die TATA-Box dient in vielen eukaryotischen Promotoren als Plattform für die Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC) zur Initiation der Transkription (Woychik und Hampsey, 2002). Vermittelt über das TATA-Bindeprotein (TBP) erfolgt die sequenzspezifische Bindung des generellen Transkriptionsfaktors (GTF) TFIID (Grünberg und Hahn, 2013). TFIIB stabilisiert den gekrümmten DNA-TBP Komplex und rekrutiert weitere GTFs, sowie die RNA-Polymerase II, welche die Transkription einleitet (Grünberg und Hahn, 2013). Eine TATA-Sequenz befindet

Einleitung

sich auch in den von AvrBs3 und AvrXa7 spezifisch gebundenen EBEs im Promotor von Zielgenen (Kay, 2008; Antony *et al.*, 2010). Da sich diese auch im passenden Abstand zum Transkriptionsstart von *UPA10* und *UPA20* befindet, wurde für die Wirkungsweise von AvrBs3 an pflanzlichen Promotoren zunächst die funktionelle bzw. molekulare Mimikry des TBP vorgeschlagen (Kay, 2008). Ebenso befindet sich die meisten der vorhergesagten EBEs der TALEs PthA und PthC aus *Xac* im Bereich von 30 Bp oder überlappend zu TATA-Elementen (Pereira *et al.*, 2014). AvrBs3 und Homologe könnten jedoch auch als regulatorische Transkriptionsfaktoren fungieren und z.B. über die Interaktion mit dem Mediator bzw. mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie die Assemblierung des PIC fördern (Kay, 2008).

Zur Identifizierung von AvrBs3-Interaktionspartnern wurden in vorangegangenen Arbeiten verschiedene Hefe-2-Hybrid Sichtungen durchgeführt, wodurch Importin α und ThiC (Thiaminbiosynthese-Protein C-Homolog) identifiziert wurden (Szurek *et al.*, 2001; Gürlebeck, 2007). Jedoch konnte bisher kein Interaktionspartner identifiziert werden, welcher im Kern lokalisiert ist und eine Rolle bei der Funktion von AvrBs3 als Transkriptionsfaktor spielen könnte. Dagegen konnten für die AvrBs3-Homologen PthA2, PthA3 und PthA4 aus *Xac*, mittels Hefe-2-Hybrid Sichtungen Interaktoren identifiziert werden, die eine Rolle bei der Kontrolle der Transkription, Ubiquitinierung und der DNA-Reparatur spielen könnten (Domingues *et al.*, 2010). Zu Beginn dieser Arbeit wurde nur für ein Cyclophilin aus *Citrus* (CsCyp), ein Thioredoxin mit Tetratricopeptid-Domäne (CsTDX) und ein Ubiquitin-konjugierendes-Enzym (CsUev) eine Interaktion mit verschiedenen PthAs gezeigt (Domingues *et al.*, 2010). Die Bedeutung dieser Interaktoren für die Transkriptionsinitiation durch PthAs war bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht geklärt.

1.3.5. Vorarbeiten und Zielstellung

Um zu untersuchen, ob die 16 AS-Unterschiede des Hax2-AvrBs3-chimären Proteins tatsächlich für den reduzierten HR-Phänotyp verantwortlich sind, wurden in Vorarbeiten Chimären aus *avrBs3* und *hax2* erstellt. Diese sind durch den Austausch des zuvor beschriebenen *HinClI*/*AgeI*-Fragments des 5'-Bereichs der C-terminalen Region gekennzeichnet (Sabine Thieme, unveröffentlichte Daten). Dieser direkt an die *repeat*-Region angrenzende 5' Bereich der C-terminalen Region von AvrBs3 und Homologen, welcher die AS 887 - 1044 umfasst, wird weiterhin als AR-Region (*adjacent to repeat*, benachbart zu *repeat*) bezeichnet. Die

Einleitung

entsprechenden AvrBs3-Chimären mit der AR-Region von Hax2 zeigten eine reduzierte Aktivierung eines Reporterkonstruktes, welches des $UPA20\text{-EBE}_{\text{AvrBs3}}$ im Promotor enthielt. Ebenso zeigten Hax2-Chimären mit der AR-Region von AvrBs3 eine reduzierte Aktivierung des $Hax2\text{-EBE}_{\text{Hax2}}$ (S. Thieme, unveröffentlichte Daten). Obwohl N- und C-terminale Bereiche von AvrBs3 für die Bindung an das $UPA\text{-EBE}$ nicht essentiell sind (Kay *et al.*, 2007; Hahn, 2009), unterstützt die AR-Region möglicherweise die Genaktivierung.

In eigenen Vorarbeiten wurde der Einfluss der AR-Region von AvrBs3 auf die Aktivierung eines Reportergens weiter analysiert. Es zeigte sich, dass AvrBs3-Chimären, welche die AR-Region der Homologen AvrXa7 bzw. AvrXa10 aus *Xoo* enthalten, eine vergleichbare Fähigkeit zur Induktion eines Reportergens mit der $UPA20\text{-EBE}_{\text{AvrBs3}}$ wie AvrBs3-WT aufweisen. Dagegen war die Fähigkeit zur Induktion des Reportergens bei AvrBs3-Chimären, welche die AR-Region von z.B. Hax2 oder AvrHah1 enthielten, stark reduziert. Da die AR-Region zwischen AvrBs3 und AvrXa7 bzw. AvrXa10, im Gegensatz zu Hax2 und AvrHah1, in den ersten 45 AS vollständig konserviert ist (Anhang 6), kann man vermuten, dass dieser Bereich eine Rolle bei der Aktivität von AvrBs3 und Homologen spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der AR-Region im C-terminalen Bereich von AvrBs3 bei der Aktivierung von Zielgenen näher untersucht werden. Durch Generierung von Chimären, Einzel-AS-Substitutionen und Deletionen im Bereich der AR-Region von AvrBs3 sollte dieser Bereich in GUS-Reporteraktivierungsstudien, DNA-Bindestudien, sowie durch *Xcv*-vermittelte Translokation in suszeptible und resistente Paprikapflanzen auf ihre Bedeutung für die AvrBs3-Aktivität bzw. DNA-Bindung analysiert werden. Dazu sollte auch das zwischen AvrBs3 und Homologen hoch konservierte imperfekte Leucin-Zipper-Motiv, welches sich im Bereich der AR-Region befindet, in Bezug auf die AvrBs3-Aktivität analysiert werden.

Das zweite große Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer pflanzlicher Interaktionspartner von AvrBs3. Da AvrBs3 als Transkriptionsfaktor fungiert, sollten gezielt Interaktoren identifiziert werden, die im Zellkern lokalisiert sind bzw. eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation spielen. Dazu sollte zum einen ein *pull-down*-Experiment mit immobilisiertem His₆-AvrBs3 und Extrakt aus Tomatenzellkernen durchgeführt werden. Zum Anderen sollten mit einem neuen experimentellen Ansatz im Hefe-2-Hybrid-System potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Durch Interaktionsstudien in Hefe, *in planta* und *in vitro* sollte die Interaktion zwischen AvrBs3 und potentiellen Interaktionspartnern untersucht und gegebenenfalls die biologische Relevanz positiver Interaktoren für die Aktivität von AvrBs3 analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Nährmedien und Antibiotika

Escherichia coli-Stämme wurden in LB-Medium (*Lysogenic-Broth*) (Miller, 1972) bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Kultivierung von *Xanthomonas*-Stämmen erfolgte in NYG-Medium (*Nutrient-Yeast-Glycerol*) (Daniels *et al.*, 1984) bei 30°C für 48 h. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf YEB-Medium (*Yeast-Extract-Broth*) (Vervliet *et al.*, 1975) bei 30°C für 48 h kultiviert. Feste Medien enthielten 1,5 % (w/v) Agar-Agar. Für die Kultivierung der *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme wurde Vollmedium (YEP, *Yeast-Extract-Peptide*) oder supplementiertes Minimalmedium (YNB, *Yeast-Nitrogen-Base*) verwendet und die Hefen bei 30°C 48-72 h angezogen. Das Minimalmedium, wurde mit einem L-Aminosäuren/Basen-Mix (je 20 mg/ l Adenosin, Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil, 30 mg/l Leucin, Lysin, Tyrosin, 50 mg/l Phenylalanin und 200 mg/l Threonin) supplementiert, wobei zur Selektion auf auxotrophe Marker die entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt wurde. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium 2% Glucose zugesetzt. Feste Medien enthielten 2 % (w/v) Agar-Agar. Alle Nährmedien, sowie Zucker- und die Aminosäure-Lösungen wurden mit einfach destilliertem Wasser hergestellt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. AIM (*Agrobacterium*-Inokulationsmedium) wurde zur Inokulation von Pflanzen mit *A. tumefaciens*-Stämmen verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung	Verwendungszweck
LB	1% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe Extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7,5	Anzucht von <i>E. coli</i>
NYG	0,5% Bakto-Pepton, 0,3% Hefe-Extrakt, 0,2% Glycerin	Anzucht von <i>Xanthomonas</i>
YEB	0,5% (w/v) Bakto-Fleisch-Extrakt, 0,1%(w/v) Bakto-Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) Bakto-Pepton; 0,5% (w/v) Saccharose, 0,2% 1 M MgSO ₄ , pH 7,2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>
YEP	2% (w/v) Bakto-Pepton, 1% Bakto-Hefe-Extrakt	Vollmedium zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>
YNB	0,67% (w/v) YNB w/o AA	Minimalmedium zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>
AIM	10 mM MES (pH 5,4), 10 mM MgCl ₂ , 150 µM Acetosyringon	Inokulation von <i>A. tumefaciens</i>

Material und Methoden

Zur selektiven Kultivierung von *E.coli*, *A. tumefaciens* bzw. *Xanthomonas* wurden die autoklavierten Nährmedien mit folgenden Antibiotika versetzt:

<u>Antibiotikum</u>	<u>End-Konzentration</u>
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml (feste Medien) bzw. 50 µg/ml (Flüssigmedium)
Spectinomycin (Spec)	30 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml (<i>E.coli</i>) bzw. 100µg/ml (<i>A. tumefaciens</i>)
Gentamycin (Gent)	15 µg/ml

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien bei - 80 °C wurden *E.coli*-, *A. tumefaciens*- bzw. *Xanthomonas*-Suspensionen mit 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt.

2.1.2. Biologisches Material

2.1.2.1. Pflanzenmaterial

Es wurden Tabakpflanzen der Art *Nicotiana benthamiana* verwendet. Von Paprika (*Capsicum annuum*) wurden Pflanzen der Kultivare (*cultivar*, *cv.*) Early Cal Wonder (ECW) und der fast isogenen Linie ECW-30R verwendet. ECW-30R ist homozygot für das *Bs3*-Gen (Minsavage *et al.*, 1990). Von Tomate (*S. lycopersicum*) wurde das Kultivar Moneymaker (MM) verwendet, welches das Resistenzgen *Bs4* enthält (Bonas *et al.*, 1993). Die Anzucht von *N. benthamiana* und *S. lycopersicum* erfolgte bei 23°C/19°C (Tag/Nacht) und für *C. annuum* bei 25°C/19°C im Gewächshaus mit einer 16-stündigen Lichtperiode und einer relativen Luftfeuchte von 40 – 60 %.

2.1.2.2. Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterien und Hefestämme

Stamm	Genotyp/ Eigenschaften	Referenz
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xcv)		
85-10	Paprika Tomatenrasse 2; Wildtyp; Rif ^r	(Canteros <i>et al.</i> , 1991)
85*ΔhpaB	hrpB Deletionsmutante von 85*; Rif ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i>		
OneShot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen; Groningen, Niederlande
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für die Konjugation; enthält Plasmid mit <i>tra</i> Funktion	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
ElectroMAX™ DH10B™	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL nupG</i>	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
BL21-CodonPlus-RIL	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Agilent Technologies Deutschland GmbH; Böblingen, Deutschland
<i>A. tumefaciens</i>		
GV3101	C58, Rifampicin ^R ; Ti-Plasmid: pMP90 (pTIC58ΔT-DNA) Gentamycin ^R , Gene für Nopalinsynthese	(Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
MaV103	<i>MAT a SPAL10::URA3 leu2-3,112 trp1-901</i> <i>his3Δ200 ade2-101 gal4Δ gal80Δ can1</i> ^r <i>cyh2</i> ^r <i>GAL1::HIS3@LYS2</i> <i>GAL1::lacZ@URA3</i>	(Vidal <i>et al.</i> , 1996)

^R-Resistenz

2.1.3. Verwendete Plasmide

Eine Tabelle der verwendeten Plasmide ist in Anhang 8 aufgeführt.

2.1.4. Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 9 aufgelistet und wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekulargenetische Standardmethoden

2.2.1.1. Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmiden aus *E.coli* erfolgte mittels *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte), sowie die Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* mit Hilfe des *EZ Yeast™ Plasmid Prep* (G-Biosciences, St.Louis, USA) jeweils nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden wenn nicht anders erwähnt mit 5 µl DNA-Ladepuffer (15 % Ficoll 400; Farbstoff: Orange G) versetzt und in 1%igen Agarose-Gelen mittels horizontaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Die Agarose-Lösung wurde mit Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml; 4 µl/100 ml) versetzt und die DNA unter UV-Licht im Transilluminator sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente eine 1 Kb-Leiter (*GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*; Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte).

2.2.1.3. Elution von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarose-Gelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und danach der Gelbereich, mit dem DNA-Fragment der entsprechenden Größe, auf einem UV-Tisch, mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Es folgte die Eluierung der DNA mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.2.1.4. Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen erfolgte mit der *Phusion*-Polymerase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben und wurde in

Material und Methoden

Temperaturzyklus-Steuergeräten mit Heizdeckel (*FlexCycler PCR Thermal Cycler*, Analytic Jena, Jena) durchgeführt.

Die Kolonie-PCR an *E.coli* erfolgte durch Zugabe von Bakterienzellen, ohne vorhergehende DNA-Isolation, direkt in den Reaktionsansatz mittels *Taq*-Polymerase in einem 25 µl PCR Ansatz (1 × PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 8,5); 0,25 mM Desoxyribonukleotide; 0,25 µM Oligonukleotid 1; 0,25 µM Oligonukleotid 2; 1 U *Taq*-Polymerase) unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung der DNA	94°C	5 min	} 32-35-Zyklen
Denaturierung der DNA	94°C	30 s	
Anlagerung der Oligonukleotide	50-70°C	30 s	
Elongation (DNA-Synthese)	72°C	40 s - 4 min	
Elongation	72°C	5 min	
	4°C		

2.2.1.5. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzreaktionen wurden nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des *Big DyeTM-Kit* (PE Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Sequenzieransätze, sowie das Sequenzierprogramm wurden nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Sequenzreaktion erfolgte im Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel. Danach wurde die in der Sequenzierreaktion enthaltene DNA durch Zugabe von 1 Volumen 7,5 M Ammonium-Acetat und 3 Volumen Ethanol gefällt und im Anschluss mit 70 %igen Ethanol gewaschen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des *ABI PRISM[®] 377 Genetic Analyzer*-Sequenzierautomaten (PE Applied Biosystems, Darmstadt), durch einen Arbeitsgruppen-internen Service, sowie die Auswertung der Daten mittels geeigneter Computersoftware (*Sequencher 4.6*, Gene Codes Corporation, USA).

2.2.1.6. Restriktionsanalysen

Die Spaltung von DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt, wobei die Wahl der Pufferbedingungen, der Reaktionstemperatur und der Enzymkonzentration nach Herstellerangaben erfolgte (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte bzw. New England

Biolabs; Frankfurt am Main). Anschließend wurde der Restriktionsverdau der DNA mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.2) kontrolliert.

2.2.1.7. Klonierung von DNA-Fragmenten (Klassische Klonierung)

Die Ligation von amplifizierter DNA in den Vektor pJet1.2/Blunt erfolgte mit dem *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.8. golden-gate-Klonierung

Die Klonierung von *avrBs3*, *hax2* und Derivaten erfolgte nach der *Golden TAL Technology* (Geissler *et al.*, 2011). DNA-Fragmente (Module) für den N- (864 Bp) und C-terminalen Bereich (370 Bp) von *avrBs3* bzw. *hax2* und der *repeat*-Region (1794 Bp) von *avrBs3* bzw. *hax2* (2265 Bp) sowie Module für die AR-Region (467 Bp) wurden wie unter Kapitel 2.2.1.4 beschrieben erstellt. Die Klonierung der Module in Expressionsvektoren erfolgte mittels *Bsal cut-ligation* (Engler *et al.*, 2008). Mutationen in der AR-Region wurden durch zielgerichtete Mutagenese mit den in Anhang 9 aufgelisteten Oligonukleotiden durchgeführt. Für BD_{Gal4}-Derivate wurden die Module für die BD_{Gal4} erstellt. Die Klonierung der BD_{GAL4} zusammen mit verschiedenen Modulen der AR-Region und des C-terminalen Bereiches von *avrBs3* erfolgte wie oben beschrieben. Für die potentiellen Interaktoren wurde jeweils ein Modul, wie zuvor beschrieben, in Expressionsvektoren kloniert. Die *cut-ligation* erfolgte parallel im Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (*FlexCycler PCR Thermal Cycler*, Analytic Jena, Jena) für 30 min bei 37°C und 30 min bei 16°C (5-30 Zyklen). Anschließend wurden die assemblierten Konstrukte in chemisch kompetente *E.coli* TOP10 transformiert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit Insert-spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2.2.1.9. Die Klonierung mittels des GATEWAY®-Systems (gateway-Klonierung)

Die PCR-Produkte mit 5' angehängten Nukleotiden (CACC) wurden gerichtet in den pENTR/D-TOPO-Vektor ligiert (*pENTR/D-TOPO Directional TOPO Cloning Kit*; Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte). Das klonierte PCR-Fragment liegt im pENTR/D-TOPO-Vektor (Donorvektor)

von attL-Rekombinationsstellen flankiert vor, so dass eine rekombinationsbasierte effiziente Klonierung in andere GATEWAY®-Vektoren (Expressionsvektoren) möglich wird.

2.2.1.10. Kompetente Zellen: Herstellung und Transformation

Herstellung und Transformation chemokompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E.coli* wurden zunächst 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Darauffolgend wurde eine Hauptkultur von frischem LB-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0.05 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 angezogen. Die Bakterienkultur wurde auf Eis für 15 min inkubiert und anschließend bei 4°C (4000 rpm) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1/3 Volumen gekühltem Puffer TFBI (30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂; 15% Glycerol; pH 5,8) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,04 Volumen kaltem Puffer TFBII (10 mM NaMOPS pH7; 75mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% Glycerol) resuspendiert und die aliquotierten Zellen bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die chemisch kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Der zu transformierenden Ligationsansatzes und 50 µl der Zellen wurden gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzschock bei 42°C im Wasserbad für 45 s und sofortiger Inkubation auf Eis für 2 min erfolgte die Aufnahme der Bakterien in 250 µl LB-Medium und Inkubation für 1 h bei 37°C. Der Transformationsansatz wurde auf ein, mit entsprechendem zur Selektion geeigneten Antibiotikum, LB-Festmedium ausplattiert.

Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E.coli*- und *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli* bzw. *A. tumefaciens*-Zellen wurden zunächst 10 ml LB- bzw. YEB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37° bzw. 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur mit der Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Kultur wurde für 10 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 Volumen des Ausgangsvolumens mit eisgekühltem 10%igem Glycerol resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 10 %iger Glycerin-Lösung (ca. 8 % des Ursprungsvolumen) resuspendiert. Die Lagerung der aliquotierten Zellen in 10%iger Glycerin-Lösung erfolgte bei -80°C. Jeweils 20 µl elektrokompetente *E.coli*-bzw. *A. tumefaciens*-Zellen wurden mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt

Material und Methoden

und in einer eisgekühlten 2 mm Elektroporations-Küvette ein elektrischer Puls gegeben und transformiert (*Electro Pulser*; BioRad GmbH, München). Anschließend wurde 250 µl LB- bzw. YEB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37° bzw. 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB- bzw. YEB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° bzw. 30°C inkubiert.

Herstellung und Transformation von chemokompetenten Hefezellen

Die Herstellung und Transformation von chemokompetenten Hefezellen erfolgte nach der *LiAc/ss carrier DNA/ PEG*- Methode (Gietz und Schiestl, 2007).

2.2.1.11. *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Transformation in *N. benthamiana*

Die zu untersuchenden *Agrobacterium*-Stämme wurden auf YEB-Festmedien mit entsprechenden Antibiotikazusätzen für 2 Tage bei 30°C angezogen. Zur Inokulation der Pflanzen erfolgte Resuspension der Bakterienzellen in AIM. Diese Bakterienlösung wurde, wenn nicht anders beschrieben, auf eine OD₆₀₀ von 0,8 (etwa 8 x 10⁸ Zellen/ml) eingestellt und mit einem *Agrobacterium*-Stamm GV3101(pBin61p19), der eine T-DNA mit dem *silencing*-Inhibitorgen *p19* enthielt, zu gleichen Teilen gemischt und mittels einer kanülenlosen Spritze die Bakterienlösung in die Interzellularräume des Blattgewebes der Blattunterseite von *N. benthamiana*-Blättern inokuliert.

2.2.1.12. *Xcv*-Inokulationsexperimente

Xcv-Stämme wurden zwei Tage auf selektiven NYG-Platten angezogen. Für die Inokulationen wurden die Bakterien in 10 mM MgCl₂ resuspendiert, auf eine optische Dichte von 0,4 (*Xcv* 85**ΔhpaB*) oder 0,05 (*Xcv* 85-10) eingestellt und mit einer kanülenlosen Spritze in die Blattunterseite von Paprikablätter inokuliert. Phänotypen wurden 3 bis 10 Tage nach Inokulation dokumentiert. Zur verbesserten Visualisierung des Phänotyps wurden die inokulierten Blätter des Kultivars ECW-30R in 70 %igem Ethanol gebleicht.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. Western-Blot-Analyse

2.2.2.1.1. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western-Blot

Für Protein-Extrakte von infizierten *N. benthamiana*-Blättern wurden drei Blattscheiben von verschiedenen Pflanzen (Durchmesser 0,9 cm) in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und mit 100 µl 2fach Lämmli (100 mM Tris, 10% Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 7,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,1 mg ml⁻¹ Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt. Für Proteinexpressions-Analysen von *Xcv* wurden die Bakterien für zwei Tage auf Festmedienplatten und anschließend über Nacht in Flüssigkultur angezogen. Eine 500 µl Kultur (OD₆₀₀ = 0,4) wurde geerntet und die Zellen in 50 µl 2-fach Lämmli resuspendiert. Für Proteinextrakte aus Hefezellen wurden die zu untersuchenden Hefestämme für zwei Tage in entsprechenden Flüssigkulturen angezogen. Zum Aufschluss der Zellen wurden 2,5 OD-Einheiten pelletiert und in 100 µl *aqua dest.* resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µl 2fach Lämmli resuspendiert. Proteinextrakte aus *E. coli*-Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben mit 2-fach Lämmli versetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 4%-igen Sammelgelen und 10%-igen Trenngelen. Die Probenvolumina betragen 20 µl. Die Elektrophorese wurde bei 140 V, 400 mA in 1 x Tank-Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) durchgeführt. Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher) diente als Molekulargewichtsstandard. Für Western-Blot Analysen erfolgte der Transfer in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,1 % SDS) auf eine Nitrocellulosemembran *Whatman* (Protran®, Schleicher und Schuell GmbH) bei 90 V, 400 mA und 4°C für 95 Minuten. Nach Blockieren der Membran für 1 h in 1 x TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20, pH 8,0) mit 5% Magermilchpulver und 3% BSA wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (Tabelle 3). Nach Zugabe des entsprechenden sekundären Antikörpers (Tabelle 3) erfolgte die Detektion der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz (*enhanced chemoluminescence*, ECL). Die Detektion der Signale erfolgte nach der Inkubation der Membran in ECL-Lösung (100 mM Tris-HCl, 225 nM p-Cumarinsäure, 1,25 mM 3-Aminophtalhydrazid, 0,3 % (v/v) H₂O₂, pH 8,5) durch Belichtung eines Biomax Light 1-Film (Eastman Kodak Company, Rochester, USA).

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Sekundärer Antikörper (1:10000)
anti-c-Myc	1:200	Santa Cruz, Heidelberg	anti-Kaninchen (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA)
anti-GFP	1:3000	Thermo Scientific, Schwerte	anti-Kaninchen
anti-FLAG	1:10000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Anti-Maus (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA)
anti-GroEL	1:1000	Stressgen, Victoria, Canada	anti-Kaninchen
anti-GST	1:10000	GE Healthcare, Freiburg	Anti-Ziege (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
anti-His	1:2000	Roche, Mannheim	Anti-Maus
anti-AvrBs3	1:10000	Knoop <i>et al.</i> , 1991	anti-Kaninchen
anti-BD _{Gal4}	1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	anti-Kaninchen
anti-AD _{Gal4}	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	anti-Kaninchen

2.2.2.1.2. Coomassie-Färbung

Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Gele kurz mit *aqua dest.* gespült und für 20 min in der Coomassie-Färbelösung (20% Ethanol, 2% Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250) geschwenkt. Das Entfärben der Gele erfolgte in *aqua dest.*, bis der Hintergrund des Gels relativ farblos war.

2.2.2.2. Reporteragenaktivierungsstudien (GUS-Assay)

A. tumefaciens GV3101-Stämme mit den zu untersuchenden Expressionskonstrukten, dem jeweiligen Reporter-Konstrukt und dem *silencing*-Inhibitor-Konstrukt wurden in AIM auf eine $OD_{600} = 0,8$ eingestellt, im Verhältnis 1:1:1 gemischt und, wie unter Kapitel 2.2.1.11 beschreiben, in jeweils ein Blatt von drei *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Zur Erzeugung von Triplikaten erfolgte 3 dpi die Ernte von 2 Blattscheiben (0,9 cm Durchmesser) je inokuliertes Blatt und anschließend die Bestimmung der GUS-Aktivität nach Kay *et al.*, 2007.

2.2.2.3. Leitfähigkeitsmessung

Für die Bestimmung der Leitfähigkeit wurden, wie unter Kapitel 2.2.1.12 beschrieben, Xcv 85-10-Stämme in resistente Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R inokuliert. Zur Erzeugung von

Triplikaten wurden 20 und 44 hpi 5 Blattscheiben (Durchmesser 0,9 cm) geerntet. Die Blattscheiben wurden am Boden eines 15 ml Reaktionsgefäßes platziert, Plastikgitter bedeckt, 7 ml deionisiertes Wasser hinzugegeben und die Blattscheiben 1 min vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf einem Überkopfschüttler 1 Stunde bei 100 rpm rotiert und die Leitfähigkeit mit einem Konduktometer (Knick, Berlin) ermittelt (spezifische Leitfähigkeit). Die Bestimmung der maximalen Leitfähigkeit erfolgte nach 15 minütigem Erhitzen der Probe auf 100 °C (totale Leitfähigkeit).

2.2.2.4. Herstellung und Reinigung von rekombinanten Proteinen

2.2.2.4.1. Herstellung von Proteinen in *E. coli*

Die Herstellung von AvrBs3 und Derivaten bzw. GFP erfolgte von pGGE6, pDEST17 bzw. pET-60 in *E. coli* Rosetta (DE3) RIL. Für Interaktionsstudien erfolgte die Herstellung der putativen Interaktoren vom Vektor pGGE2, sowie die Herstellung von GST und Importin α vom Vektor pDEST15. Die *E. coli*-Zellen wurden in Flüssig-LB-Medium über Nacht bei 37°C und 130 rpm vorgezogen. Eine Hauptkultur wurde auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und die Zellen zur Induktion der Proteinherstellung mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 20 Stunden bei 16°C und 130 rpm inkubiert, anschließend durch Zentrifugation 10 min bei 4000 rpm und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung dieser Temperatur gelagert.

2.2.2.4.2. Reinigung von AvrBs3 und Derivaten mit His₆-Epitop

Die unter Kapitel 2.2.2.4.1 erstellten Zellpellets wurden in 35 ml kaltem Zellaufschlusspuffer (50mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 10mM Imidazol, 0.1% Tween, pH 8.0) mit Zugabe von *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Mannheim) resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch viermalige Frost-Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff und anschließendem 37°C Wasserbad. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurden die aufgeschlossenen Zellen mit je 500 μ l DNaseI (1mg/ml) und RNaseA (1mg/ml) versetzt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 40 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Auftrennung des Überstandes (lösliche Fraktion, Lysat) erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Sepharose (Qiagen, Hilden) bei 4°C. Nach

Material und Methoden

Waschen mit Zellaufschlusspuffer wurden die His₆-markierten Proteine mit 3 ml Elutionspuffer (50 mM Tris, 10 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0.1% Tween20, pH 8.0) eluiert. Die Konzentrierung sowie der Pufferwechsel erfolgte mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Units* (Millipore, USA) mit einer Ausschlussgröße von 30.000 kDa und Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm. Die Proteinlösungen wurden mit Glycerin (Endkonzentration 10% (v/v)) versetzt und bis zur weiteren Verwendung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.2.4.3. Zwei-Schritt-Reinigung von AvrBs3 mit GST- und His₆-Epitop

Die unter Kapitel 2.2.2.4.1 erstellten Zellpellets wurden in 35 ml kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) mit Protease-Inhibitoren (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Mannheim; 0,4µM/ml AEBSF; 1µg/ml Pepstatin) resuspendiert und wie unter Kapitel 2.2.2.4.2 beschrieben aufgeschlossen. Der erste Schritt der Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) bei 4°C. Nach zweistündiger Inkubation der Glutathion-Sepharose mit dem Lysat auf einem Überkopffroller bei 4°C, erfolgten zwei Waschrissen mit 1 x PBS. Zur Abspaltung von His₆-markiertem AvrBs3 vom GST-Epitop wurde die Glutathion-Sepharose über Nacht mit 5 ml Thrombin Spaltungspuffer (1x PBS, 10 µM Heparin Lösung, 10 U/mg Protein) bei 22°C inkubiert und am nächsten Tag His-markiertes AvrBs3 mit 3 ml 1x PBS eluiert. Der zweite Schritt der Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) und die Konzentrierung wie unter Kapitel 2.2.2.4.2 beschrieben.

2.2.2.5. *In vitro* DNA-Bindestudien mittels *Electromobility Shift Assay* (EMSA)

Für DNA-Bindestudien wurden die, wie unter Kapitel 2.2.2.4.2 beschrieben, gereinigten Proteine über Nacht mit 10 mM DTT bei 4°C reduziert. Zur Erzeugung von doppelsträngiger DNA wurden komplementäre 5'-Biotin-markierte Oligonukleotide hybridisiert. Die Parameter der Bindereaktion waren: 10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 5% Glycerol, 33-133 fmol protein, 166 fmol DNA. Die Bindereaktion wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen (5% Acrylamid-Bisacrylam (37:5:1), 1% Glycerol, 0,045 M Tris, 0,045 M Borsäure, 1 mM EDTA). Die Auftrennung erfolgte bei 120V und 4°C für etwa 4 Stunden in EMSA-Laufpuffer (1% Glycerol, 0,045 M Tris, 0,045 M Borsäure,

1 mM EDTA). Der Transfer erfolgte in 0,5x TBE (0,045 M Tris, 0,045 M Borsäure, 1 mM EDTA) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) bei 100 V, 900 mA und 4°C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Membran durch Backen in einem Hybridofen für eine Stunde bei 95°C verlinkt. Die Detektion der Biotin-markierten DNA erfolgte mittels *LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit* (Thermo Scientific, Schwerte) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.6. Isolierung von Proteinen aus Tomatenzellkernen

Die Isolierung von Proteinen aus Tomatenzellkernen erfolgte mittels Percoll-Gradienten. Dazu wurden 20 g Tomatenblätter mit 180 ml kaltem Extraktionspuffer (2 M Hexylenglykol, 20 mM PIPES-KOH (pH7.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol) in einem Mixer (*Waring Blender*, Schütt Labortechnik, Göttingen) homogenisiert, anschließend durch eine Schicht *Mira cloth* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) filtriert und das entstandene Lysat mit 7,6 ml 25% Triton X-100 versetzt. Die Erstellung eines Percoll-Gradient erfolgte durch Unterschichtung von eine 30 % Percoll-Lösung (30 % Percoll, 0,5 M Hexylenglykol, 5 mM PIPES-KOH (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 % Triton X-100) mit einer 80 % Percoll-Lösung (80 % Percoll, 0,5 M Hexylenglykol, 5 mM PIPES-KOH (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 % Triton X-100). 30 ml Lysat wurden auf den Percoll-Gradienten pipettiert und 30 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellkerne, welche sich zwischen der 30 % und 80 % Percoll-Schicht akkumulierten, wurden mit einer dünnen Glaspipette vorsichtig aufgenommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Gradientenpuffer (0.5 M Hexylenglykol, 5 mM PIPES-KOH (pH7.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1% Triton X-100) auf 6 ml aufgefüllt. Die Zellkerne wurden 10 min mit 2000 x g bei 4°C pelletiert, anschließend in 1 ml Gradientpuffer gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min und 2000 x g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in 500 µl Zellaufschlusspuffer. Mittels Ultraschall wurden die Zellkerne des Pellets 6 min mit 160 W und einem Intervall von 5 s in einem Eisbad aufgeschlossen, anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.7. pulldown mit immobilisierten His₆-AvrBs3 und Extrakt aus Tomatenzellkernen

Für den *pulldown* wurden 1 mg des, wie unter Kapitel 2.2.2.4.3 beschrieben, gereinigten AvrBs3Δ2-His₆ bzw. des unter Kapitel 2.2.2.4.2 gereinigten His₆-GFP mit 50 μl Ni-NTA-Sepharose auf einer Polypropylen-Säule bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Nach Waschen mit 5 ml Zellaufschlusspuffer (siehe Kapitel 2.2.2.4.2) wurden isolierten Zellextraktes aus Tomatenzellkernen (siehe Kapitel 2.2.2.6) zugegeben und unter Rotieren bei 4°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 5 ml Zellaufschlusspuffer gewaschen. Um mögliche Interaktionspartner getrennt von AvrBs3Δ2-His₆ bzw. His₆-GFP zu isolieren wurden diese zunächst mit 300 μl 1 M NaCl eluiert. Anschließend erfolgte die Elution der immobilisierten Proteine mit 300 μl Elutionspuffer (siehe Kapitel 2.2.2.4.2).

2.2.2.8. Hefe-2-Hybrid-Sichtung

Die Sichtung der cDNA-Bank aus Paprika ECW-30R-Pflanzen (Szczesny *et al.*, 2010) erfolgte nach dem Prinzip des MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-2-Hybrid-Systems nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland). Zunächst erfolgte die Amplifikation von $3,6 \times 10^7$ koloniebildenden Einheiten (KBE) der Paprika cDNA-Bibliothek, welches einer fünffachen Abdeckung der cDNA-Bibliothek entspricht, nach der Methode der *Liquid gel amplification* (Elsaesser und Paysan, 2004). Anschließend wurden die Plasmide unter Verwendung des *Qiagen Plasmid Giga Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. In zwei unabhängigen Ansätzen wurde der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* MaV103 mit je 1 μg der Plasmid-DNA der cDNA-Bibliothek und den Köderplasmiden pAG424GPD:BD_{Gal4}C bzw. pAG424GPD:BD_{Gal4}CΔAD, wie unter Kapitel 2.2.1.10 beschrieben, ko-transformiert. Nach 3 h Inkubation in YEP bei 30 °C wurde je Köderplasmid ein Transformationsansatzes auf Minimalmedium zur Uracil-Selektion (ohne Leucin, Tryptophan und Uracil) und ein Transformationsansatzes auf Minimalmedium zur Histidin-Selektion (ohne Leucin, Tryptophan und Histidin) plattiert. Histidin-Selektionsmedium wurde mit 70 mM 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT) versetzt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Transformationseffizienz. Dazu wurde eine 10⁻⁴-Verdünnung auf Minimalmediumplatten plattiert und nach Inkubation ausgezählt. Zur Selektion des Beute- und Köderplasmide enthielten die Platten kein Leucin und Tryptophan. Die erhaltenen Transformanden wurden erneut auf das entsprechende Selektivmedium übergestrichen und

Material und Methoden

die Plasmide der positiven Transformanden isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1). Nach Transformation der Plasmide in den *E. coli*-Stamm ElectroMAX™ DH10B™ (Life Technologies GmbH; Darmstadt; siehe Kapitel 2.2.1.10) erfolgte eine erneute Plasmidisolierung (Kapitel 2.2.1.1).

2.2.2.9. Verwendete Datenbanken

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

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

TGI *database*: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi> (am 15.07.2014 außer Kraft gesetzt)
Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02215, USA

sol genomics network: <http://solgenomics.net/>
Sol Genomics Network, Ithaca, NY 14853, USA

2.2.2.10. Fluoreszenzmikroskopie

2.2.2.10.1. GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden *Agrobacterium*-Stämme wurden wie in Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert (siehe Kapitel 2.2.1.11). Nach drei Tagen wurden Blattproben am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM780 und *ZEN software* (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) mit einem GFP-Filter nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Visualisierung von Zellkernen wurde ca. 1 h vor der Analyse am LSM 0,1%ige DAPI-Lösung in die infizierten Bereiche infiltriert.

2.2.2.10.2. Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Interaktionsstudien mittels BiFC wurden unter Verwendung des gelb fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*, YFP) durchgeführt, welches in eine C-terminale und eine N-terminale Domäne geteilt wurde (YFP_N: AS 1-154, YFP_C: AS 155-239). *A. tumefaciens* GV3101-Stämme mit den zu untersuchenden Expressionskonstrukten mit der YFP_N-Fusion, den Expressionskonstrukten mit der YFP_C-Fusion und dem *silencing*-Inhibitor-Konstrukt wurden in AIM auf eine OD₆₀₀ = 0,8 eingestellt, im Verhältnis 1:1:1 gemischt und die Inokulierung erfolgte in jeweils ein Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen (siehe Kapitel 2.2.1.11). Nach drei Tagen wurden Blattproben am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM780 und *ZEN software* (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) mit spezifischen Filtern für YFP analysiert.

2.2.2.11. *In vivo* Interaktionsstudien mittels Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)

A. tumefaciens GV3101-Stämme mit den Expressionskonstrukten für die Interaktoren, einem Expressionskonstrukt für AvrBs3 und dem *silencing*-Inhibitor-Konstrukt, das den *silencing*-Inhibitor p19 (*p19*) kodiert, wurden in AIM auf eine OD₆₀₀ = 1,6 eingestellt, im Verhältnis 1:1:1 gemischt und mit einer kanülenlosen Spritze in jeweils ein Blatt von drei *N. benthamiana* Pflanzen inokuliert. Drei dpi wurden 8 Blattscheiben mittels Korkbohrer (d = 0,9 cm) geerntet und in *safelock*-Reaktionsgefäßen (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Homogenisierung des Blattmaterials wurde 1 ml KoIP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 µl Protease-Inhibitor-Mischung (*complete, EDTA-free*; Roche) zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen und 20 minütiger Zentrifugation wurde der Extraktüberstand mit 100 µl 10 %igem Nonidet-P40 versetzt, zu 20 µl Protein G-Agarose (Roche) gegeben und 1 h bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Das vorgeklärte Extrakt wurde anschließend mit 2 µg anti-c-Myc Antikörper (Roche) eine Stunde bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert, anschließend 30 µl Protein G-Agarose (Roche) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 50µl 2 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

2.2.2.12. Interaktionsstudien *in vitro* mittels GST-Pulldown

Die Zellpellets der unter Kapitel 2.2.2.4.1 synthetisierten Proteine wurden in 3 ml 1 x PBST resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch viermalige Frost-Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff und anschließendem 37°C Wasserbad. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurden die aufgeschlossenen Zellen mit je 50µl DNaseI (1mg/ml) und RNaseA (1mg/ml) versetzt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 40 000 x g und 4°C zentrifugiert. 600 µl des bakteriellen Proteinextraktes, welcher GST oder GST-Fusionsproteine enthielt, wurden mit 50 µl Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) versetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 4°C unter Rotieren und anschließend die Glutathion-Sepharose zweimal mit je 1 ml kaltem 1 x PBST gewaschen. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C mit je 600 µl des Lysates von *E. coli*-Zellen, welche His₆-AvrBs3Δ2 synthetisierten, wurde viermal mit je 1 ml kaltem 1 x PBST gewaschen. Die Elution spezifisch gebundener Proteine erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 20 °C mit 40 µl 10 mM reduziertem Glutathion, welches in 50 mM Tris-HCl pH 8,5 gelöst war. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

2.2.2.13. Interaktionsstudien in Hefe

Für Interaktionsstudien in Hefe wurden die Köder- und Beuteplasmide in den *Saccharomyces cerevisiae* MaV103 (siehe Kapitel 2.2.1.10) transformiert. Die Anzucht von einzelnen Transformanden erfolgte zwei Tage lang in Flüssigmedium zur Leucin- und Tryptophan-Selektion angezogen. Nach Einstellen einer OD₆₀₀ = 1,0 wurden 3 µl von Verdünnungsstufen in Zehnerschritten auf Minimal-Selektionsmedium getropft und für zwei bis fünf Tage inkubiert. Minimalmedium zu Histidin-Selektion enthielt verschiedene Konzentrationen an 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT).

2.2.2.14. Virus-induziertes-Gen-silencing (VIGS) in *N. benthamiana*

Das in dieser Arbeit verwendete VIGS-System basiert auf der Verwendung des *tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002). Das virale Genom wurde dabei als cDNA-Klon in zwei Ti-Plasmide kloniert. Auf dem pTRV1-Plasmid befinden sich unter der Kontrolle von zwei 35S-Promotoren

aus dem Blumenkohlmosaik-Virus die Gene für die RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ein *movement*-Protein (MP), ein 16 kDa großes Cystein reiches Protein (16K) und ein selbstschneidendes Ribozym (Rz). Das pTRV2-Plasmid enthält das virale Hüllprotein und eine *attR*-Kassette, in welche die zu untersuchenden Zielfragmente für das *silencing* durch *Gateway*-Rekombination kloniert werden können. Zur besseren Selektion von pTRV2 wurde eine Ampicillin-Resistenz integriert (T. Lahaye, P. Römer unveröffentlicht). Dieser Vektor wurde als pTRV2a bezeichnet.

Durch die Integration von beiden T-DNAs in die pflanzliche DNA erfolgt bei der Transkription in der Pflanze die Replikation der Viruskomponenten und eine Assemblierung von TRV. Dieses kann sich systemisch in der Pflanze ausbreiten und seine Erbinformation in weitere Zellen integrieren. Die bei der anschließenden Transkription synthetisierte mRNA der *silencing*-Fragmente löst ein posttranskriptionelles Gen-*silencing* aus.

2.2.2.14.1. Erstellung der *silencing*-Konstrukte

Etwa 400 Bp-Fragmente der *silencing*-Konstrukte wurden von *N. benthamiana*-cDNA amplifiziert und zunächst in pJET1.2 kloniert. Das Fragment für *siRED1* wurde direkt in den Entry-Vektor pENTR/D-TOPO kloniert. Die *silencing*-Fragmente in pJET1.2 wurden mittels *golden-gate*-Klonierung in das pENTR/D-Derivat pEGG(WOS) kloniert. Die Konstrukte wurden in *E. coli*-Zellen transformiert, re-isoliert und mit vektorspezifischen Oligonukleotiden sequenziert. Anschließend erfolgte die Rekombination aller *Entry*-Vektoren in pTRV2a. Die *silencing*-Konstrukte wurden wie unter Kapitel 2.2.1.10 in *A. tumefaciens* transformiert.

2.2.2.14.2. VIGS-Inokulation in *N. benthamiana* und *challenging* mit AvrBs3

Ein *A. tumefaciens*-Stamm mit dem Vektor pTRV1 und eine Kultur mit dem jeweiligen *silencing*-Konstrukt wurden in AIM auf eine $OD_{600} = 0,8$ eingestellt und zu gleichen Teilen gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in 4 Wochen alte *N. benthamiana* bzw. *Bs3*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Zwei Wochen nach *silencing* wurde ein *A. tumefaciens*-Stamm mit pGGA8:*avrBs3* bzw. pGGA8:*gfp* in AIM auf eine $OD_{600} = 0,8$ eingestellt und in die *silencing*-Pflanzen inokuliert (*challenging*).

2.2.2.15. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Extraktion von RNA aus Blattmaterial wurde mit dem *Qiagen RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei der DNase-Verdau auf der zweiten Säule erfolgte. Dazu wurden 10 Blattscheiben (je 0,28 cm²) geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und das gefrorene Blattmaterial mit einer Kugelmühle (Retsch GmbH; Haan) homogenisiert. Die cDNA-Synthese für RT-PCR-Analysen wurde mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*, cDNA-Synthese für qRT-PCR-Analysen mit dem *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kits for RT-qPCR* (beide Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben durchgeführt. Jeweils wurde 1µg RNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde für RT-PCR Analysen 1:10, für qRT-Analysen 1.50 verdünnt.

2.2.2.16. Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Alle qRT-PCR-Analysen wurden mit 4 ng cDNA, 10 µl (50%) *ABsolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix* (ABgene Limited, Hamburg, Germany) im iCycler IQ (BioRad, München), 1, 4 pmol forward und reverse Oligonukleotiden durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit dem MyiQ2 und CFX Connect System (Bio-Rad). Die Effizienz und Spezifität der PCR-Amplifikation wurde durch Standardkurven verschiedener Verdünnungsstufen der cDNA überprüft (Bs3: E = 1,825; E in % = 91,23; EF1α: E = 1,988; E in % = 99,40). Die Spezifität der Oligonukleotid-Paare wurde durch Schmelzkurven überprüft. Das durchschnittliche Transkriptlevel basierte auf technischen Duplikaten von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten. Eine Normalisierung erfolgte gegen das Transkript des Elongationsfaktors 1α (EF1α).

3.1.1 Genetische Analyse des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs in AvrBs3

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs in AvrBs3 für die Transkriptionsfaktor-Aktivität analysiert werden. Es ist bekannt, dass die Mutation von mehr als einem Leucin in dem Heptaden-Motiv die transkriptionellen Aktivierung verhindert, d.h. den Transkriptionsfaktor inaktiviert und Mutationen in der basischen Region die DNA-Bindung verhindern (Ransone *et al.*, 1989; Dwarki *et al.*, 1990). Um den Einfluss von Mutationen in dem Leucin-Zipper-Motiv von AvrBs3 zu untersuchen, wurden zwei AvrBs3-Derivate erstellt. Bei dem Derivat AvrBs3-LZm1 wurden die AS K935 und R936 der basischen Region und bei dem Derivat AvrBs3-LZm2 die Leucine an den Position 892, 899, 913 und 919 gegen Alanin ausgetauscht (Abbildung 6 A).

Zunächst wurden *golden-gate*-Module für den Bereich des putativen Leucin-Zipper-Motivs von AvrBs3 erstellt, welche die entsprechenden Substitutionen für die Erstellung der zwei AvrBs3-Derivate enthielten (pJet1.2:LZm1 und pJet1.2:LZm2). In eigenen Vorarbeiten waren bereits Module für den N-terminalen Bereich, der *repeat*-Region und dem C-terminalen Bereich von *avrBs3* erstellt worden (pJet1.2:N-*avrBs3*, pJet1.2:rep-*avrBs3* und pJet1.2:C-*avrBs3*). Zur Erstellung von entsprechenden Konstrukten zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen vierfachen c-Myc-Epitop, wurden die Module für *avrBs3* mittels der *golden-gate*-Klonierung in pGGA8 kloniert.

Die Fähigkeit von AvrBs3 und der hier erstellten Derivate zur transkriptionellen Induktion eines Reportergens erfolgte im *Agrobacterium*-vermittelten transienten Assay in Blättern von *N. benthamiana* nach dem Ko-Transfer der Effektor- und Reporterkonstrukte. Dies ist eine einfache und effiziente Methode zur Analyse von pflanzlichen Promotoren *in vivo* (Liu *et al.*, 2011). AvrBs3 induziert nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer in *Nicotiana benthamiana* Hypertrophiesymptome, wie sie auch für AvrBs3 aus *Xcv* in den suszeptiblen Wirtspflanzen Paprika und Tomate beobachtet werden kann (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). Als Reporterkonstrukt diente das *uidA*-Gen für β -Glucuronidase (GUS) unter Kontrolle des minimalen 74 Bp *Bs4*-Promotors mit dem *effector binding element* (EBE) des *UPA20*-Promotors (*UPA20*-EBE_{AvrBs3}; Abbildung 6 B). Die dadurch ermittelte GUS-Aktivität korreliert mit der Fähigkeit von AvrBs3 bzw. Derivaten, an das *UPA20*-EBE des GUS-Reportergenpromotors zu binden und das *uidA*-(GUS-)Gen zu aktivieren. Die GUS-Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 6 C). Als Negativkontrolle diente GFP. Wie die Abbildung 6 C zeigt, aktivierte das Derivat AvrBs3-LZm1 das *UPA20*-EBE vergleichbar zu AvrBs3-

Ergebnisse

WT. AvrBs3-LZm2 hingegen wies eine um 80 % reduzierte GUS-Aktivität im Vergleich zu AvrBs3-WT auf (Abbildung 6 C).

Um auf eine stabile Expression der AvrBs3-Derivate zu testen, wurde ein Immunblots mit c-Myc-spezifischem Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass für AvrBs3-LZm2 ein reduziertes Proteinlevel zu beobachten war (Abbildung 6 D), d.h. dass dies möglicherweise die geringere Aktivität im GUS-Assay erklärt.

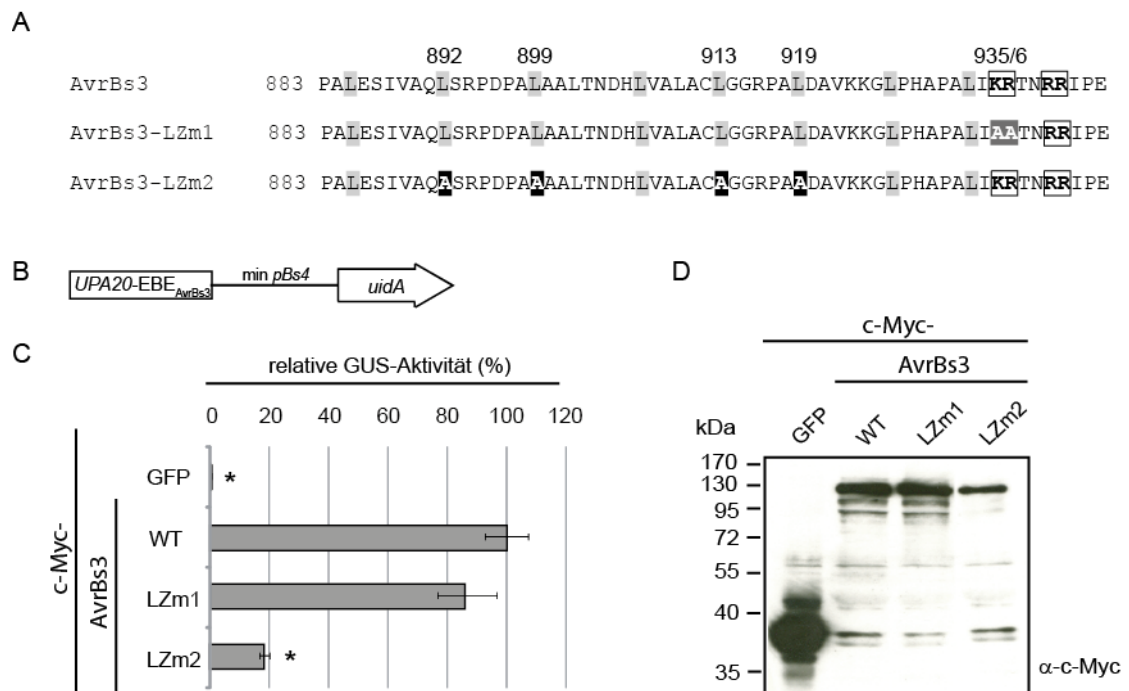


Abbildung 6: Analyse des imperfekten Leucin-Zipper-Motivs in AvrBs3

(A) Sequenz des Leucin-Zipper-Motivs von AvrBs3 (AS 883-943) und eingeführte Substitutionen (AvrBs3-LZm1 und AvrBs3-LZm2). Die basische Region ist mit Boxen markiert. Leucine sind hellgrau markiert, und die mit Alanin substituierten Leucine auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben. **(B)** Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts bestehend aus dem *uidA*-Gen unter Kontrolle des minimalen *Bs4*-Promotors (*min pBs4*) mit der *UPA20-EBE_{AvrBs3}* am 5' Ende. **(C)** *UPA20-EBE_{AvrBs3}*-vermittelte Reporteragenaktivierung durch AvrBs3 und Derivate in Blättern von *N. benthamiana*. Die GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer der Konstrukte für den Reporter und die zu untersuchenden AvrBs3-Derivate bestimmt. Dargestellt ist die relative GUS-Aktivität, bezogen auf die Induktion durch AvrBs3-WT, die auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (T-Test; *, $P < 0,05$). **(D)** Expression der c-Myc-AvrBs3-Fusionsproteine in Blättern von *N. benthamiana*. Proben wurden 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem T-DNA-Transfer aus denselben Inokulationsstellen der in (C) untersuchten Proben genommen und im Immunblot mit c-Myc spezifischem Antikörper analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Ergebnisse

AvrBs3 löst in suszeptiblen Paprikapflanzen des Kultivars ECW eine Hypertrophie und in resistenten Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R eine HR aus, die durch die AvrBs3-vermittelte Induktion von *UPA*-Genen, z. B. des Schlüsselregulators *UPA20*, induziert wird (Bonas *et al.*, 1989; Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). Da aufgrund des unterschiedlichen Proteinlevels von AvrBs3-LZm2 gegenüber AvrBs3-WT keine Rückschlüsse auf die Aktivität von AvrBs3-LZm2 geschlossen werden können, sollte untersucht werden, ob AvrBs3-LZm2 nach Translokation durch *Xcv* die Hypertrophie in suszeptiblen Paprikapflanzen und die HR in resistenten Paprikapflanzen induziert.

Der virulente *Xcv*-Stamm 85-10(*pavrBs3*), welcher ein Expressionsplasmid für AvrBs3 trägt, induziert in Paprikapflanzen des Kultivars ECW keine bzw. eine kaum sichtbare Hypertrophie (Marois *et al.*, 2002). Durch die Wirkung von anderen Effektoren und der damit verbundenen schnelleren Ausbildung von wässrigen Läsionen wird die durch AvrBs3 ausgelöste Hypertrophie wahrscheinlich überdeckt. Der nicht-pathogene *Xcv*-Stamm 85* Δ *hpaB*(*pavrBs3*) weist neben der konstitutiven Expression der *hrp*-Gene, aufgrund der *hrpG**-Mutation im Schlüsselregulator *hrpG*, eine Deletion des Typ-III-Chaperons *hpaB* auf. Dies führt zu einer reduzierten Translokation von AvrBs1 und AvrBs3, während die Translokation anderer Effektoren, z.B. XopJ und XopF1, nicht mehr nachweisbar ist (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). AvrBs3 löst bei Verwendung des *Xcv*-Stamms 85* Δ *hpaB* stärkere Hypertrophiesymptome, als bisher beschrieben, aus (Hahn, 2009). Aus diesem Grund wurde dieser Stamm in dieser Arbeit verwendet.

Zur Analyse auf Aktivität der AvrBs3-Derivate mit AS-Substitutionen im imperfekten Leucin-Zipper-Motiv wurden zur Expression von FLAG-Fusionsproteinen von AvrBs3 und den Derivaten die kodierenden Sequenzen in pGGX1 unter Kontrolle eines einfachen *lac*-Promotors kloniert und in die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85* Δ *hpaB* konjugiert. Als Negativkontrolle dienten *Xcv*-Stämme, die ein leeres pGGX1-Plasmid trugen. Die entsprechenden *Xcv* 85-10 bzw. 85* Δ *hpaB*-Stämme wurden in Blättern von Paprikapflanzen des Kultivars ECW bzw. ECW-30R inokuliert. Wie in Abbildung 7 A gezeigt, induziert der AvrBs3-exprimierende *Xcv*-Stamm 85* Δ *hpaB*(*pavrBs3*), wie bereits bekannt, 8 dpi eine Hypertrophie in der suszeptiblen Paprikapflanze ECW. In resistenten Paprikapflanzen ECW-30R induzierte der *Xcv*-Stamm 85-10 3 dpi die HR. *Xcv*-Stämme mit den Derivaten AvrBs3-LZm1 und AvrBs3-LZm2 induzierten ebenfalls eine Hypertrophie in ECW- bzw. die HR in ECW-30R-Paprikapflanzen (Abbildung 7 A). Da makroskopisch keine phänotypischen Unterschiede zwischen AvrBs3-WT und den AvrBs3-Derivaten zu beobachten waren, wurden RT-PCR Analysen von mit *Xcv*-infiziertem ECW-30R (*Bs3*)-Blättern durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Blattproben isoliert, in cDNA umgeschrieben

Ergebnisse

und durch Amplifikation des Resistenzgens *Bs3* mit genspezifischen Oligonukleotiden die Genexpression mittels RT-PCR ermittelt. Die Amplifikation des konstitutiv exprimierten Elongationsfaktors 1 α (EF1 α) diene als Kontrolle für gleiche cDNA-Mengen. Wie in Abbildung 7 B gezeigt, induzierten AvrBs3 und AvrBs3-Derivate vergleichbar das Resistenzgen *Bs3*. Die stabile Expression der AvrBs3-Derivate in *Xcv* wurde im Immunblot mit FLAG-spezifischem Antikörper nachgewiesen (Abbildung 7 C). Als Ladekontrolle diene das konstitutiv exprimierte Chaperon GroEL.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass AvrBs3-LZm2 eine ähnliche Aktivität, wie AvrBs3-WT besitzt und somit der postulierte Leucin-Zipper von AvrBs3 nicht maßgeblich zur Aktivität beiträgt.

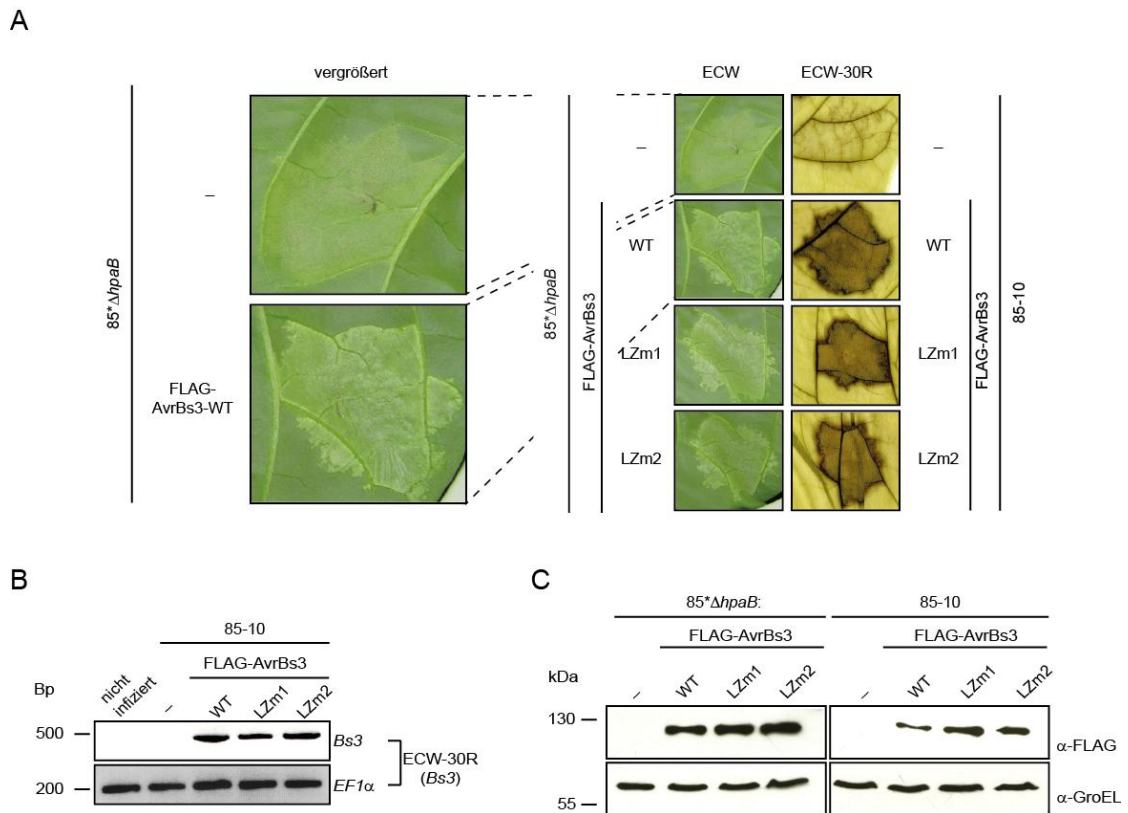


Abbildung 7: AvrBs3-WT und LZ-Derivate induzieren Hypertrophie bzw. HR in Paprika

(A) *Xcv* 85* Δ *hpaB* mit pGGX1:LV, pGGX1:*avrBs3*, pGGX1:*avrBs3-LZm1* bzw. pGGX1:*avrBs3-LZm2* wurden in suszeptible ECW-Paprikapflanzen inokuliert. *Xcv* 85-10 mit pGGX1:LV (Leervektor, –), pGGX1:*avrBs3*, pGGX1:*avrBs3-LZm1* bzw. pGGX1:*avrBs3-LZm2* wurde in resistente ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Die ECW-Blätter wurden 8 dpi fotografiert und die ECW-30R-Blätter 3 dpi geerntet und in Ethanol gebleicht, um die HR besser zu visualisieren. Die mit *Xcv* 85* Δ *hpaB*(pGGX1:LV) bzw. 85* Δ *hpaB*(pGGX1:*avrBs3*) infizierten Blattareale wurden zusätzlich vergrößert dargestellt. **(B)** RT-PCR von *Bs3*-cDNA von nicht-infizierten und mit den in (A) *Xcv*-infizierten Paprika ECW-30R-(*Bs3*)-Blättern 10 hpi. Die Amplifikation der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α)-cDNA diene als Kontrolle. **(C)** Immunoblot mit FLAG-spezifischem Antikörper zum Nachweis der stabilen Expression der AvrBs3-Derivate in *Xcv* 85* Δ *hpaB* und 85-10. GroEL diene als Ladekontrolle. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.2 Einfluss der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3

Wie oben beschrieben, weisen AvrBs3 und Homologe einen stark konservierten C-terminalen Bereich auf (Kapitel 1.3.3). AS-Unterschiede innerhalb des C-terminalen Bereiches sind hauptsächlich in der AR-Region zu finden, welche in AvrBs3 die AS 887 bis 1044 umfasst. Einige AS-Unterschiede sind zwischen verschiedenen Untergruppen der Homologen konserviert (Anhang 6).

Untersuchungen chimärer Proteine von AvrBs3 und Homologen bezüglich pflanzlicher Reaktionen ergaben, dass die AS-Unterschiede in der AR-Region vermutlich einen Einfluss auf deren Aktivität haben (Ishihara *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005). In eigenen Vorarbeiten wurde gezeigt, dass AvrBs3-Chimären, welche die AR-Region der Homologen AvrXa7 bzw. AvrXa10 aus *Xoo* enthalten, eine vergleichbare Fähigkeit zur Induktion eines Reportergens mit der UPA20-EBE_{AvrBs3} wie AvrBs3-WT aufweisen (Kapitel 1.3.5). Dagegen war die durch AvrBs3-Chimären, welche die AR-Region von z.B. Hax2 oder AvrHah1 enthielten, induzierte Reportergenaktivität stark reduziert (Kapitel 1.3.5). Da die AR-Regionen von AvrBs3, AvrXa7 und AvrXa10, im Gegensatz zu Hax2 und AvrHah1, in den ersten 45 AS vollständig konserviert sind (Anhang 6), lässt dies einen Beitrag der ersten 45 AS zur Aktivität von AvrBs3 und Homologen vermuten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Rolle der AR-Region für die AvrBs3-Aktivität näher charakterisiert werden.

3.2.1 Einfluss von AS-Substitutionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3

Um zu untersuchen, ob die ersten 45 AS der AR-Region einen Einfluss auf die Aktivität von AvrBs3 haben, wurden zunächst Konstrukte zur Expression von AvrBs3-Hax2-Chimären erstellt. Aus eigenen Vorarbeiten lagen bereits Konstrukte für chimäre Proteine von AvrBs3 und Hax2 vor, bei denen die gesamte AR-Region (158 AS) getauscht war (pGGA8:*avrBs3AR*₁₋₁₅₈ und pGGA8:*hax2AR*₁₋₁₅₈) (Abbildung 8 A). Diese Chimären weisen 15 AS-Substitutionen im Bereich der AR-Region auf. Weiterhin wurden neue AvrBs3-Hax2-Chimären erstellt, in denen die AS 1-45 bzw. 46-158 der AR-Region zwischen AvrBs3 und Hax2 getauscht wurden (Abbildung 8 A). Dazu wurden zunächst je zwei neue Module für die entsprechenden Bereiche der AR-Regionen von AvrBs3 und Hax2 erstellt (pJet1.2: *avrBs3AR*₁₋₄₅, pJet1.2: *avrBs3AR*₄₆₋₁₅₈, pJet1.2: *hax2AR*₁₋₄₅

Ergebnisse

und pJet1.2: *hax2AR*₄₅₋₁₅₈). Die Klonierung der kodierenden Sequenzen für die *avrBs3-hax2*-Chimären erfolgte in pGGA8. Die entsprechenden AvrBs3-Hax2-Chimären AvrBs3AR₁₋₄₅ und Hax2AR₁₋₄₅ bzw. AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈ und Hax2AR₄₆₋₁₅₈, mit dem Austausch der AS 1-45 bzw. 46-158, wiesen somit neun bzw. sechs Substitutionen im Vergleich zum jeweiligen WT-Protein auf. Als Kontrollen dienten jeweils Konstrukte zur Expression von AvrBs3-WT und Hax2-WT (pGGA8:*avrBs3* und pGGA8:*hax2*), sowie ein Konstrukt zur Expression der Negativkontrolle GFP (pGGA8:*gfp*). Als Reporterkonstrukte dienten *UPA20*-EBE_{AvrBs3} bzw. *Hax2*-EBE_{Hax2} (Abbildung 8 A).

Nach Ko-Transfer von AvrBs3, Hax2 oder Chimären und entsprechenden Reporterkonstrukten wurde die Aktivierung des GUS-Reportergens im GUS-Assay in Blättern von *N. benthamiana* analysiert (Abbildung 8 A). Die durch AvrBs3-WT bzw. Hax2-WT induzierte Aktivität wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Wie die Abbildung 8 A zeigt, weisen die AvrBs3-Chimären AvrBs3AR₁₋₄₅ und AvrBs3AR₁₋₁₅₈ eine GUS-Aktivität von nur 10 % auf. Das AvrBs3-Chimär AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈ aktivierte dagegen das *UPA20*-EBE_{AvrBs3} vergleichbar wie AvrBs3-WT. Ähnliches konnte für die entsprechenden Hax2-chimären Proteine beobachtet werden (Abbildung 8 A). Allerdings wiesen diese Chimären eine höhere Aktivität als die entsprechenden AvrBs3-Chimären auf. Lediglich für das Hax2-Chimär Hax2AR₁₋₄₅ konnte eine signifikante reduzierte Aktivierung des GUS-Reportergens beobachtet werden (Abbildung 8 A). Immunoblot-Analyse der Proteine *in planta* unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers zeigte, dass alle Proteine stabil exprimiert wurden und in ähnlichen Mengen vorlagen (Abbildung 8 B). Da ähnliche Mengen geladen wurden, sind beobachtete Aktivitäts-Unterschiede somit nicht auf unterschiedliche Syntheseraten der Proteine zurückzuführen.

Es war bekannt, dass die Bindung von AvrBs3 an die Promotorregion von *Bs3* und *UPA20* zur transkriptionellen Induktion der entsprechenden Gene führt (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Die DNA-Bindung erfolgt über die *repeat*-Region von AvrBs3, wobei der C-terminale Bereich nicht zur DNA-Bindung beiträgt (Hahn, 2009). Ob die reduzierte Aktivität der AvrBs3-Chimäre AvrBs3AR₁₋₄₅ auf eine reduzierte DNA-Bindung des Proteins an die *UPA20*-Box zurückzuführen ist, sollte mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) *in vitro* ermittelt werden. Die entsprechenden Konstrukte für AvrBs3-WT und AvrBs3AR₁₋₄₅ (Abbildung 9 A) wurden in pGGE6 zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem sechsfachen His-Epitop kloniert, die His₆-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Für die Protein-DNA-Interaktions-Analyse wurden von der *UPA20*-Promotorsequenz abgeleitete, 5'-Biotin-markierte, 36-Bp DNA-Fragmente eingesetzt (Abbildung 9 B). Wie in der Abbildung 9 C gezeigt, ist die für His₆-AvrBs3AR₁₋₄₅ detektierte

Ergebnisse

Bindung an das DNA-Fragment zu AvrBs3-WT vergleichbar. Dies lässt den Schluss zu, dass die zuvor beschriebene reduzierte Aktivität von AvrBs3AR₁₋₄₅ nicht auf reduzierte DNA-Bindung zurückzuführen ist.

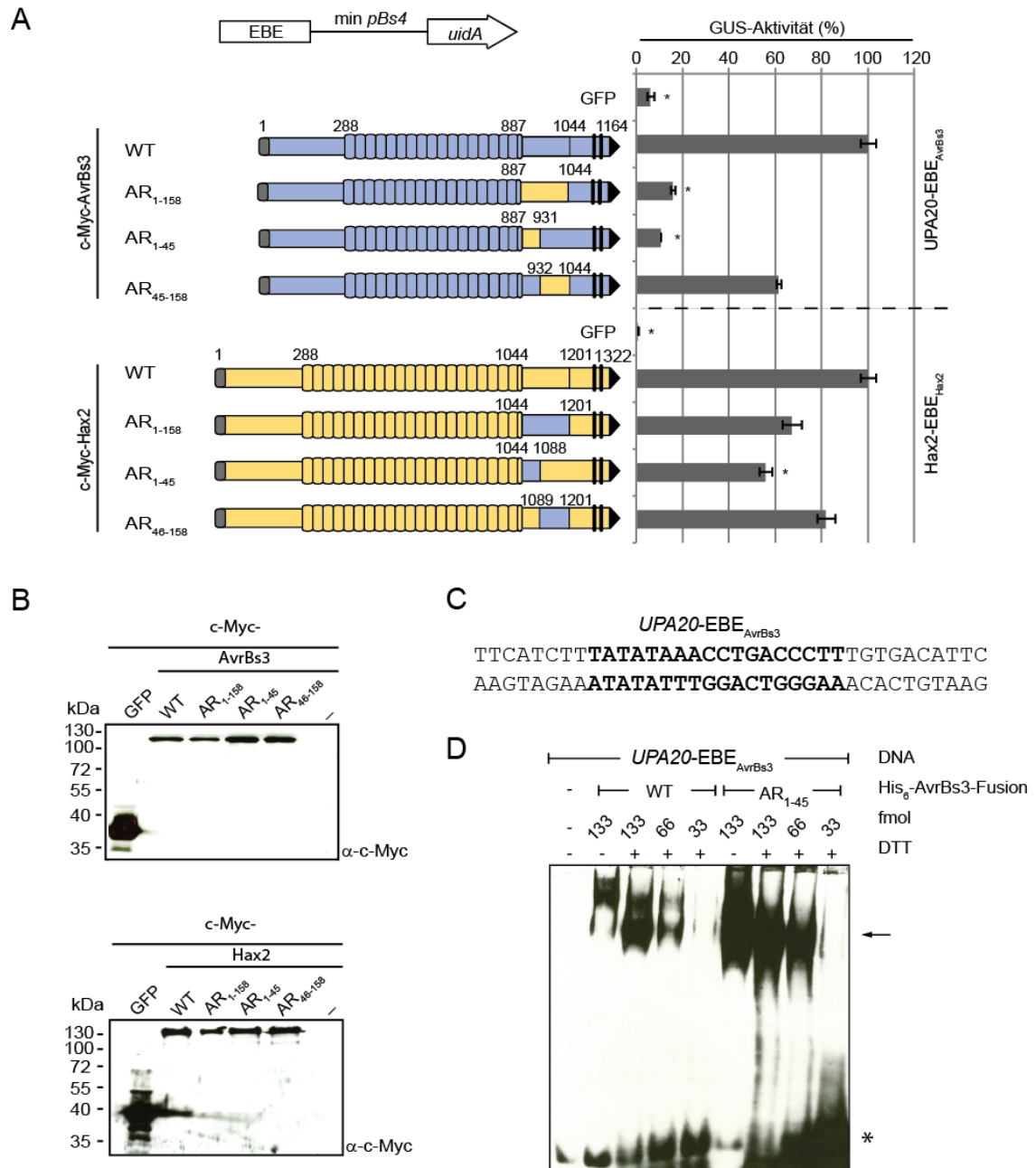


Abbildung 8: Analyse der Aktivität von AvrBs3-Hax2-Chimären sowie der DNA-Bindung von AvrBs3-WT und AvrBs3AR₁₋₄₅

Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

Ergebnisse

Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 8:

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts bestehend aus dem *uidA*-Gen unter Kontrolle des minimalen *Bs4* (*minpBs4*) Promotors mit dem EBE am 5' Ende. Graphische Darstellung von AvrBs3 und Hax2, sowie der AvrBs3- bzw. Hax2-Chimären. Bereiche von AvrBs3 sind blau und Bereiche von Hax2 gelb dargestellt. Links: Relative GUS-Aktivität der Reporter-Gen-Induktion des *UPA20*-EBE_{AvrBs3} bzw. *Hax2*-EBE_{Hax2} durch die Chimären im Vergleich zu AvrBs3-WT bzw. Hax2-WT. GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer der Konstrukte für den Reporter und *gfp*, oder *avrBs3*, *hax2* bzw. Derivaten bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT und Hax2-WT wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (T-Test; *, P < 0,05). **(B)** Expression der c-Myc-AvrBs3- bzw. c-Myc-Hax2-Fusionsproteine in Blättern von *N. benthamiana*. Proben wurden aus denselben Inokulationsstellen der in (A) analysierten Proben genommen und im Immunblot mit c-Myc-spezifischem Antikörper analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. **(C)** Von der *UPA20*-Promotorsequenz abgeleitetes DNA-Fragment. Das *UPA*-EBE_{AvrBs3} von *UPA20* ist fett hervorgehoben. **(D)** EMSA. AvrBs3-WT und AvrBs3AR₁₋₄₅ wurden über Nacht ohne (-) und mit 10mM DTT (+) bei 4°C reduziert. 16,6 fmol 5'-Biotin-markiertes doppelsträngige DNA-Fragmente (siehe (B)) wurden mit 133, 66 und 33 fmol His₆-AvrBs3 oder His₆-AvrBs3AR₁₋₄₅ inkubiert und im EMSA analysiert. Die gebundene DNA ist durch einen Pfeil, freie DNA durch einen Stern gekennzeichnet. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, löst AvrBs3 in ECW-Paprikapflanzen eine Hypertrophie und in ECW-30R-Paprikapflanzen die HR aus. Da die Analyse der Aktivität des chimären Proteins im transienten GUS-Assay in *N. benthamiana* eine reduzierte GUS-Aktivierung aufwies, sollte die Fähigkeit dieses Chimärs zur Auslösung einer Hypertrophie in suszeptiblen Paprikapflanzen bzw. einer HR auf resistenten Paprikapflanzen überprüft werden. Für die Expression von FLAG-Fusionsproteinen von AvrBs3AR₁₋₄₅ bzw. AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈ wurden die kodierenden Sequenzen in pGGX1 kloniert und in die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85**ΔhpaB* konjugiert. Als Kontrollen dienten, die in Kapitel 3.1.1 erstellten, *Xcv*-Stämme. Die entsprechenden *Xcv* 85-10 bzw. 85**ΔhpaB*-Stämme wurden in ECW- und ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Wie in der Abbildung 9 A gezeigt, induzierte der *Xcv*-Stamm mit AvrBs3AR₁₋₄₅ eine im Vergleich zu *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT reduzierte Hypertrophie bzw. HR. Für *Xcv*-Stämme mit AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈ sind die induzierten Reaktionen vergleichbar mit AvrBs3-WT.

Zur Quantifizierung der beobachteten HR-Unterschiede in ECW-30R-Paprikapflanzen wurden Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt. Die Leitfähigkeit wurde als prozentualer Wert der maximalen Leitfähigkeit der Blattprobe dargestellt. Die Abbildung 9 B zeigt, dass 44 Stunden nach Infektion durch den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈ eine Leitfähigkeit wie für den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT zu beobachten war. Für die Blattprobe, welches durch den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3AR₁₋₄₅ infiziert wurde, war eine reduzierte Leitfähigkeit zu beobachten. Neben Leitfähigkeitsmessungen wurden auch RT-PCR-Analysen von mit *Xcv*-infiziertem ECW-30R (*Bs3*)-Blättern, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Wie die Abbildung 9 C zeigt, bestätigen die RT-PCR-Analysen, dass die Induktion des Resistenzgens *Bs3* nach Infektion durch den *Xcv*-

Ergebnisse

Stamm mit *AvrBs3AR₁₋₄₅* im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit *AvrBs3-WT* reduziert war. Die Induktion des Resistenzgens *Bs3* nach Infektion durch den *Xcv*-Stamm mit *AvrBs3AR₄₆₋₁₅₈* war vergleichbar mit der Induktion durch den *Xcv*-Stamm mit *AvrBs3-WT*. Die stabile Expression der Proteine in *Xcv* wurde im Immunblot mit FLAG-spezifischem Antikörper bestimmt. Alle Proteine wurden stabil exprimiert und lagen in ähnlichen Mengen vor (Abbildung 9 C). Als Ladekontrolle diente das Chaperon GroEL. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die ersten 45 AS der AR-Region von *AvrBs3* eine Rolle bei der Aktivierung von Zielgenen spielen.

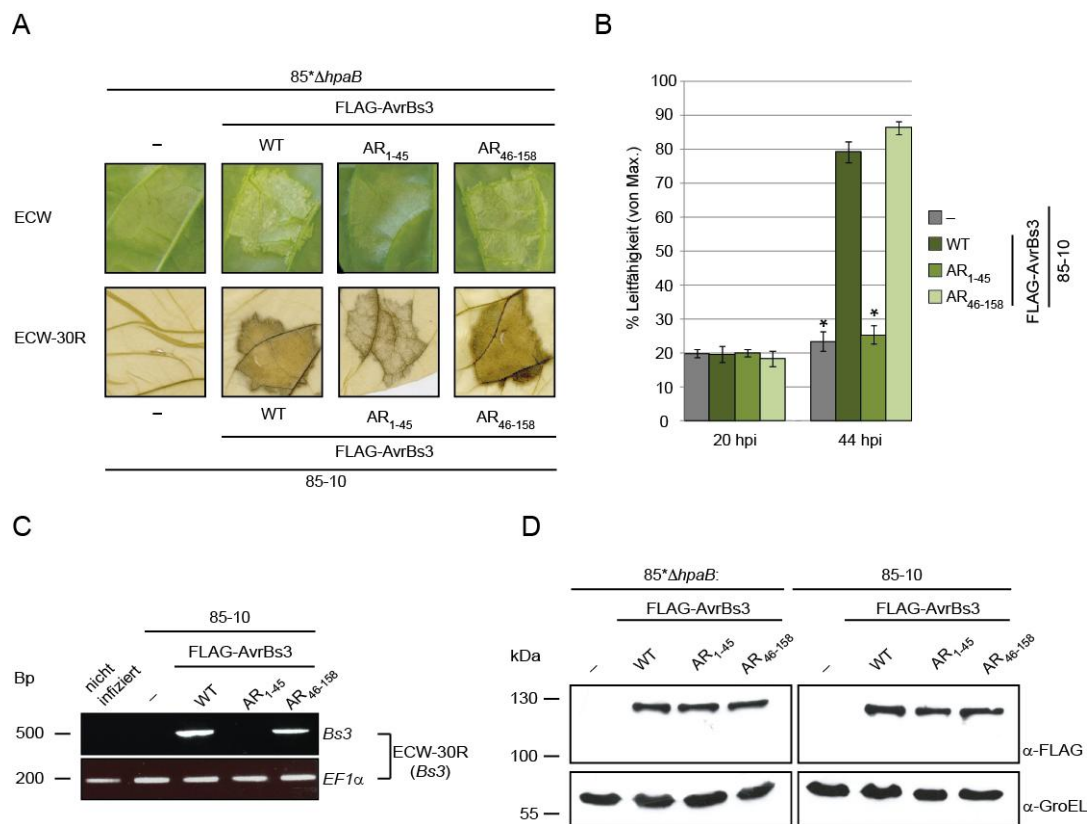


Abbildung 9: Induktion von Hypertrophie bzw. HR in Paprika durch *AvrBs3*-WT und *AvrBs3*-Chimären

(A) *Xcv* 85**ΔhpaB* bzw. *Xcv* 85-10 bzw. mit pGGX1:LV(Leervektor; —), pGGX1:*avrBs3*, pGGX1:*avrBs3AR₁₋₄₅* und pGGX1:*avrBs3AR₄₆₋₁₅₈* wurden in ECW-Paprikapflanzen bzw. in ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Die Blätter der ECW-Paprikapflanzen wurden 8 Tage nach Inokulation fotografiert und die ECW-30R-Blätter 3 Tage nach Inokulation geerntet und Ethanol gebleicht, um die beobachtete HR besser zu visualisieren. **(B)** Leitfähigkeitsmessung der unter (A) in resistente Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R inokulierten Bereiche 20 und 44 hpi. Die Leitfähigkeit wurde als prozentualer Wert der maximalen Leitfähigkeit des Blattmaterials dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (T-Test; *, $P < 0,05$). **(C)** RT-PCR von *Bs3*-cDNA aus nicht-infiziertem und mit den in (A) *Xcv*-infizierten Paprika ECW-30R-(*Bs3*)-Blättern 10 hpi. Die Amplifikation der Elongationsfaktor 1α (*EF1α*)-cDNA diente als Kontrolle. **(D)** Immunblot mit FLAG-spezifischem Antikörper zum Nachweis der stabilen Expression der *AvrBs3*-Derivate in *Xcv* 85**ΔhpaB* und 85-10. GroEL diente als Ladekontrolle. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. RT-PCR-Analysen und Leitfähigkeitsmessungen wurden zweimal, alle anderen Ergebnisse dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.2.2 Untersuchung von Einzel-Aminosäure-Substitutionen in der AR-Region von AvrBs3

Aufgrund der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Ergebnisse wurde vermutet, dass die Substitution von neun AS in den ersten 45 AS der AR-Region für die reduzierte Aktivität in der AvrBs3-Chimäre AvrBs3AR₁₋₄₅ verantwortlich ist. Um zu untersuchen, ob und welche einzelnen AS eine Rolle für die Aktivität spielen, wurden AvrBs3-Einzel-AS-Substitutionen erstellt, wobei die Substitutionen jeweils zu der entsprechenden AS von Hax2 erfolgte (Abbildung 10 A). Insgesamt wurden neun weitere AvrBs3-Derivate generiert, die als AvrBs3AR-V3F, -H20R, -L27I, -P31S, -D34N, -K38D, -H42N, -P44L und A45T bezeichnet wurden. Die Aktivität der Einzel-AS-Substitutionen wurde, wie zuvor beschrieben, im GUS-Assay in Blättern von *N. benthamiana* ermittelt. Die Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt. Wie die Abbildung 10 B zeigt, induzierten AvrBs3-Derivate mit Einzel-AS-Substitutionen in der AR-Region das GUS-Reportergen unter Kontrolle des *UPA20*-EBE_{AvrBs3} unterschiedlich stark. Während die Aktivierung durch AvrBs3AR-V3F, -P31S, -K38D bzw. -H42N vergleichbar mit AvrBs3-WT war, wiesen AvrBs3AR-H20R, -L27I, -D34N, -P44L und -A45T eine um ca. 20 % reduzierte Aktivität auf (Abbildung 10 B). Allerdings konnte auf Grund der großen Standardabweichung kein signifikanter Einfluss der AS-Substitutionen in AvrBs3 auf die Aktivierung der *UPA20*-EBE_{AvrBs3} gezeigt werden. Die Immunblot-Analyse der Proteine *in planta* unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers zeigte, dass alle Proteine stabil exprimiert wurden (Abbildung 10 D).

Da die Einzel-AS-Substitutionen in der AR-Region von AvrBs3 keinen Einfluss auf die Aktivität von AvrBs3 hatten, war anzunehmen, dass mehrere AS in dieser Region zur Aktivität beitragen. Um dies weiter zu analysieren, wurden erneut AvrBs3-Chimären erstellt, wobei die AS 1-28 bzw. 29-45 der AR-Region von AvrBs3 gegen die entsprechenden AS von Hax2 getauscht wurden (Abbildung 10 A). Die resultierenden Chimären wurden als AvrBs3AR₁₋₂₈ bzw. AvrBs3AR₂₉₋₄₅ bezeichnet und wiesen drei bzw. sechs AS-Substitutionen auf. Analog dazu wurden Hax2-Chimären erstellt, Hax2AR₁₋₂₈ und Hax2AR₂₉₋₄₅. Diese wiesen die entsprechenden AS der AR-Region von AvrBs3 auf. Die Ermittlung der Aktivität von den AvrBs3- und Hax2-Chimären hinsichtlich der Aktivierung des GUS-Reportergens unter Kontrolle der *UPA20*-EBE_{AvrBs3} bzw. *Hax2*-EBE_{Hax2} erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Aktivität des AvrBs3- bzw. Hax2-WT Proteins wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Wie in der Abbildung 10 C gezeigt, wiesen AvrBs3AR₁₋₂₈ und AvrBs3AR₂₉₋₄₅ eine Aktivität von ca. 30 % und ca. 50 % auf. D.h. die GUS-Aktivität war höher als im Fall von AvrBs3AR₁₋₄₅. Die GUS-Aktivität der entsprechenden Hax2-

Ergebnisse

Chimären Hax2AR₁₋₂₈ und Hax2AR₂₉₋₄₅ war ebenfalls höher als im Fall von Hax2AR₁₋₄₅ (Abbildung 10 C). Jedoch konnte auf Grund der hohen Standardabweichung keine genaue Aussage getroffen werden. Die GUS-Aktivität von Hax2AR₁₋₂₈ und Hax2AR₂₉₋₄₅ betrug im Vergleich zu Hax2-WT 70 % bis 90 % (Abbildung 10 C). Zum Nachweis der stabilen Expression der Proteine wurde ein Immunblot mit c-Myc-spezifischem Antikörper durchgeführt (Abbildung 10 D). Zusammenfassend zeigte sich, dass einzelne AS-Substitutionen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von AvrBs3 hatten. AvrBs3-Chimären, welche durch Substitutionen von lediglich drei oder sechs AS gekennzeichnet waren, hatten eine stärkere Aktivität, als die AvrBs3-Chimäre mit Substitution aller neun AS in der AR-Region von AvrBs3.

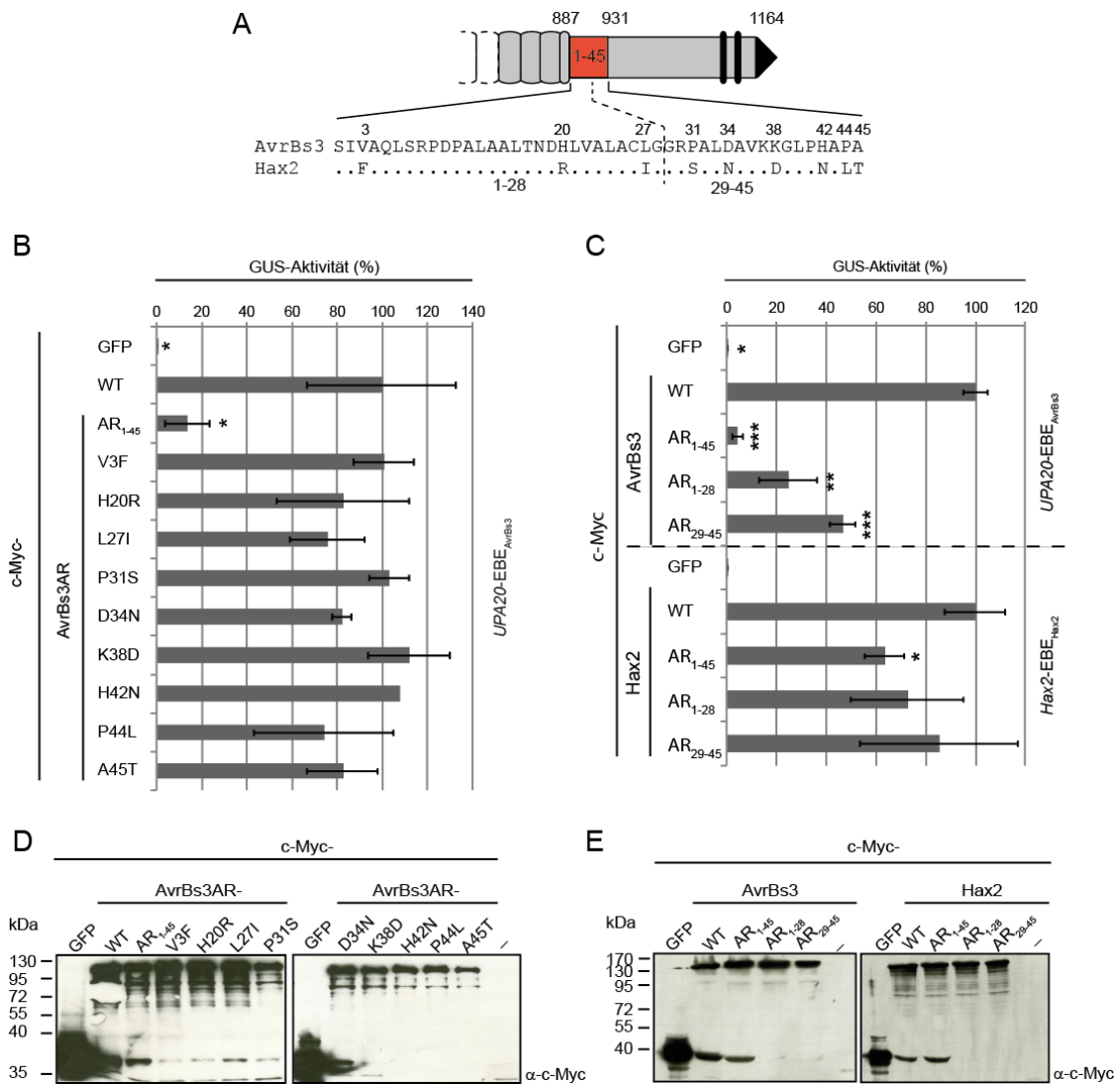


Abbildung 10: Analyse des Einflusses von Einzel-AS-Substitutionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3

Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 10:

(A) Schematische Darstellung des C-terminalen Bereiches von AvrBs3. Die Positionen der ersten 45 AS der AR-Region in AvrBs3 sind rot hervorgehoben. Darunter ist der mit Hilfe von BioEdit durchgeführte Sequenzvergleich der AS 883-931 von AvrBs3-WT, welche die ersten 45 AS der AR-Region umfassen, mit den korrespondierenden AS von Hax2 dargestellt. AS-Substitutionen zwischen AvrBs3 und Hax2 sind im Einbuchstabencode angegeben und identische AS als Punkte dargestellt. **(B)** *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*-vermittelte Reporteraktivierung durch AvrBs3, AvrBs3AR₁₋₄₅ und AvrBs3-Einzel-AS-Substitutions-Derivate (AvrBs3AR-V3F, -H20R, -L27I, -P31S, -D34N, -K38D, -H42N, -P44L und A45T) in Blättern *N. benthamiana*. GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer der Konstrukte für den Reporter, GFP, *avrBs3* bzw. Derivaten bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. **(C)** *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*- bzw. *Hax2*-*EBE_{Hax2}*-vermittelte Reporteraktivierung durch die Chimären im Vergleich zu AvrBs3-WT bzw. Hax2-WT. GUS-Aktivität wie unter (B) bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT bzw. Hax2-WT wurde 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (T-Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$). **(D und E)** Expression der c-Myc-AvrBs3-Fusionsproteine in *N. benthamiana*. Proben wurden den in (B und C) analysierten Proben genommen und im Immunblot mit c-Myc-spezifischem Antikörper analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.2.3 Einfluss von Deletionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3

Da die Substitution von neun AS in den ersten 45 AS der AR-Region von AvrBs3 zur reduzierten Aktivität des Proteins führte, aber nicht zu einer schlechteren DNA-Bindung an das *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*, kann vermutet werden, dass die Bindung von Interaktionspartnern eine essentielle Rolle bei der Aktivität spielen könnte. Durch die Erstellung von Deletionsderivaten von AvrBs3 sollte dies untersucht werden. Die Aufteilung der AR-Region in zwei Teile erfolgte analog zu den in Kapitel 3.2.1 untersuchten AS der AvrBs3-Chimären. Zum Einen wurden die AS 2-46 (AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆) und zum Anderen die AS 45-155 der AR-Region von AvrBs3 (AvrBs3 Δ AR₄₆₋₁₅₅) deletiert werden (Abbildung 11 A). Weiterhin erfolgte die Deletion der AS 3-155, welche der gesamten AR-Region von AvrBs3 (AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅) entsprechen (Abbildung 11 A). Die AvrBs3-Deletionsderivate wurden in pGGA8 kloniert und die Aktivität hinsichtlich der Aktivierung des GUS-Reportergens unter Kontrolle der *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*, wie zuvor beschrieben, ermittelt. Die Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt. Wie aus der Abbildung 11 A hervorgeht, war die GUS-Aktivität der AvrBs3-Deletionsderivate im Gegensatz zu AvrBs3-WT reduziert. Während nach Expression von AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ noch etwa 50 % GUS-Aktivität detektiert wurden, lag die GUS-Aktivität im Fall von AvrBs3 Δ AR₄₆₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ nur bei 5 %. Das lässt den Schluss zu, dass die Aktivität von AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ im Vergleich zu AvrBs3-WT stark verringert ist. Um auf stabile Expression der Proteine zu testen, wurden Immunblot Analysen durchgeführt. Wie die Abbildung 11 B zeigt, war für AvrBs3 Δ AR₄₆₋₁₅₅ ein reduziertes

Ergebnisse

Proteinlevel zu detektieren. Eine geringere Syntheserate von AvrBs3 Δ AR₄₆₋₁₅₅ im Vergleich zu AvrBs3-WT könnte die geringere Aktivität im GUS-Assay erklären.

Können die AvrBs3-Deletionsderivate nach ihrer Typ-III-Translokation durch *Xcv in planta* eine Hypertrophie bzw. die HR in Paprikapflanzen induzieren? Für die Expression von FLAG-Fusionsproteinen der AvrBs3-Deletionsderivate AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆, AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ bzw. AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ wurden die entsprechenden Gene in pGGX1 kloniert und in die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85* Δ *hpaB* konjugiert. Als Kontrollen dienten die in Kapitel 3.1.1 erstellten *Xcv*-Stämme. Die entsprechenden *Xcv* 85-10 bzw. 85* Δ *hpaB*-Stämme wurden in Paprikapflanzen des Kultivars ECW bzw. ECW-30R inokuliert. Wie in der Abbildung 11 A gezeigt, induzierten die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ eine im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT reduzierte Hypertrophie bzw. HR. Ebenso war die für den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ induzierte Hypertrophie, im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT, reduziert (Abbildung 11 C). Dagegen induzierte der *Xcv*-Stamm mit AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ nur in einigen Fällen eine im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT reduzierte HR (Abbildung 11 C). Zum Nachweis der stabilen Expression der Proteine in *Xcv* wurden Immunblot-Analysen durchgeführt. Alle Proteine wurden in ähnlichen Mengen exprimiert (Abbildung 11 D). Als Ladekontrolle diente das Chaperon GroEL. Beobachtete Unterschiede sind somit nicht auf unterschiedliche Syntheseraten der Proteine zurückzuführen.

Ergebnisse

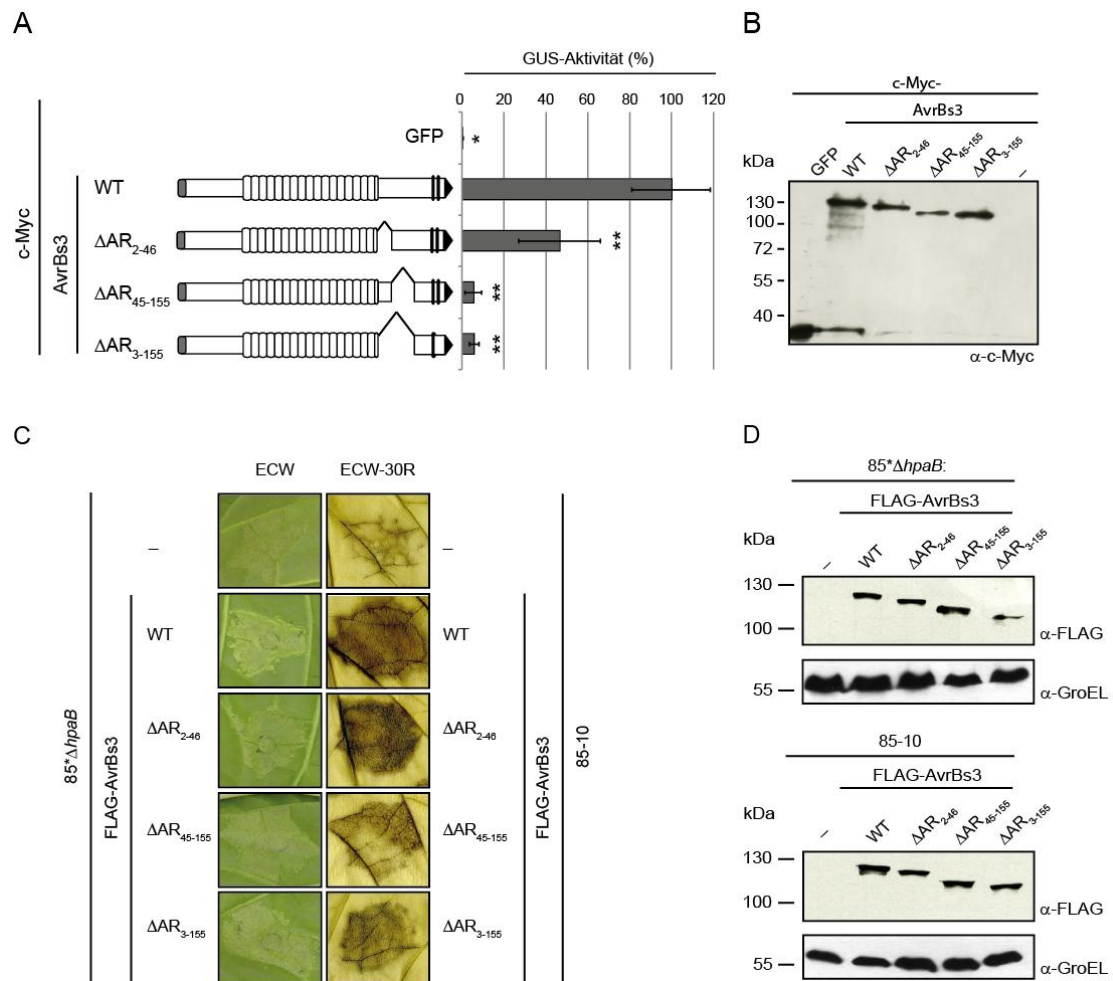


Abbildung 11: Analyse des Einflusses von Deletionen in der AR-Region auf die Aktivität von AvrBs3

(A) Schematische Darstellung von AvrBs3 bzw. AvrBs3-Deletionsderivaten mit Angabe der deletierten AS in der AR-Region, sowie *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*-vermittelte Reporteragenaktivierung durch AvrBs3 und AvrBs3-Deletionsderivate im Vergleich zu AvrBs3-WT. GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer der Konstrukte für den Reporter, *gfp*, *avrBs3* oder Derivaten bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$). **(B)** Expression der c-Myc-AvrBs3-Fusionsproteine in Blättern von *N. benthamiana*. Proben wurden den in (A) analysierten Proben entnommen und im Immunblot mit c-Myc-spezifischem Antikörper analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. **(C)** *Xcv* 85* $\Delta hpaB$ bzw. 85-10 mit pGGX1:LV (Leervektor, —), pGGX1:*avrBs3*, pGGX1:*avrBs3* ΔAR_{2-46} , pGGX1:*avrBs3* ΔAR_{45-155} bzw. pGGX1:*avrBs3* ΔAR_{3-155} wurden in ECW- bzw. ECW-30R- Paprikapflanzen inokuliert. Die Blätter der ECW-Paprikapflanzen wurden 8 dpi Inokulation fotografiert und die ECW-30R-Blätter 3 dpi geerntet und in Ethanol gebleicht. **(D)** Immunblot mit FLAG-spezifischem Antikörper zum Nachweis der Expression der AvrBs3-Derivate in *Xcv* 85* $\Delta hpaB$ und 85-10. GroEL diente als Ladekontrolle. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Um die für die *Xcv*-Stämme mit den AR-Deletionsderivaten beobachtete reduzierte HR genauer zu analysieren, wurden diese *Xcv*-Stämme in ECW-30R-Pflanzen inokuliert und die Ausbildung der HR zu früheren Zeitpunkten (24, 46, 54 und 72 hpi) dokumentiert (Abbildung 12 A). Während 24 hpi makroskopisch noch keine Reaktion zu beobachten war, wurde die durch den

Ergebnisse

Xcv-Stamm mit AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ induzierte HR 46 und 54 hpi sichtbar. Die HR war zu diesen Zeitpunkten noch nicht für die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ beobachtbar (Abbildung 12 A). 72 Stunden nach Infektion induzierten alle *Xcv*-Stämme eine HR. Die HR war für die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3-Deletionsderivaten im Vergleich zum *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT deutlich reduziert (Abbildung 12 A).

Zur Quantifizierung der HR in resistenten Paprikapflanzen wurden Leitfähigkeitsmessungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Kapitel 3.2.1). Die Abbildung 12 B zeigt, dass 44 Stunden nach Infektion eine reduzierte Leitfähigkeit durch die *Xcv*-Stämme mit den AvrBs3-Deletionsderivaten zu beobachten war, im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT. Die beobachtete Leitfähigkeit der Blattprobe, welches durch den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ infiziert wurde, war im Vergleich zu Blattmaterial, das durch den *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT infiziert wurde, um ca. 30 % reduziert (Abbildung 12 B). Dagegen war die Leitfähigkeit der Blattproben, welche durch die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ infiziert wurden, mit der Blattprobe vergleichbar, die durch den *Xcv*-Stamm mit dem Leervektor infiziert wurde (Abbildung 12 B). Eine Bestimmung der Leitfähigkeit zu späteren Zeitpunkten war durch die fortschreitende HR des infizierten Blattgewebes hierbei nicht möglich. Weiterhin wurden RT-PCR-Analysen von mit *Xcv*-infizierten ECW-30R-Blättern, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (3.1.1). Wie die Abbildung 12 C zeigt, bestätigen die RT-PCR-Analysen, dass die Induktion des *Bs3*-Resistenzgens nach Infektion durch *Xcv*-Stämme mit AvrBs3-Deletionsderivaten im Vergleich zu dem *Xcv*-Stamm mit AvrBs3-WT reduziert war.

Nur für die Blattprobe, die durch die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3-WT und AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ infiziert wurde, konnte das *Bs3*-Transkript 6 hpi ermittelt werden. Dagegen war 10 hpi auch *Bs3*-Transkript für die Blattproben, welche durch die *Xcv*-Stämme mit AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ infiziert wurden, nachweisbar (Abbildung 12 C). Die *Bs3*-Transkriptmenge für Blattproben, die durch *Xcv*-Stämme mit AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ infiziert wurden, war jedoch geringer als für Blattproben, welche durch *Xcv*-Stämme mit AvrBs3-WT und AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆ infiziert wurden (Abbildung 12 C). Die nachgewiesenen *Bs3*-Transkriptmengen in Blattproben von ECW-30R-Paprikapflanzen, welche durch *Xcv*-Stämme mit AvrBs3, AvrBs3 Δ AR₂₋₄₆, AvrBs3 Δ AR₄₅₋₁₅₅ und AvrBs3 Δ AR₃₋₁₅₅ infiziert wurden, korrelieren mit den beobachteten reduzierten Reaktionen.

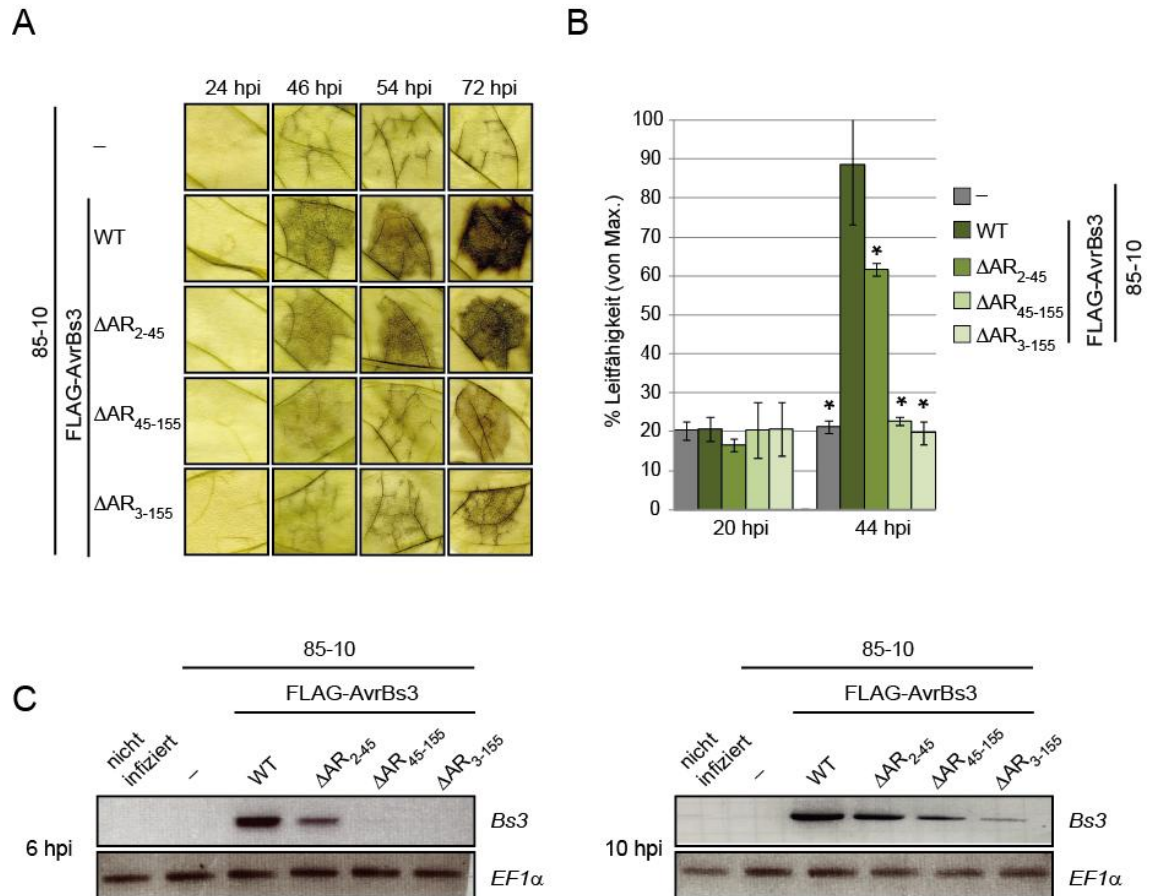


Abbildung 12: Untersuchung der durch AvrBs3-WT und AvrBs3-Deletionsderivate induzierten HR in ECW-30R-Paprikapflanzen.

(A) *Xcv* 85-10 mit pGGX1:LV(Leervektor; —, pGGX1:*avrBs3*, pGGX1:*avrBs3* ΔAR_{2-45} , pGGX1: *avrBs3* ΔAR_{45-155} bzw. pGGX1: *avrBs3* ΔAR_{3-155} wurden in ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 24, 46, 54, 72 hpi in Ethanol gebleicht. (B) Leitfähigkeitsmessung der unter (A) inokulierten Bereiche 20 und 44 hpi. Die Leitfähigkeit wurde als prozentualer Wert der maximalen Leitfähigkeit des Blattmaterials dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (T-Test; *, $P < 0,05$). (C) RT-PCR von *Bs3*-cDNA aus nicht-infiziertem und mit den in (A) *Xcv*-infizierten Paprika ECW-30R-(*Bs3*)-Blättern 6 und 10 hpi. Die Amplifikation der Elongationsfaktor 1 α (*EF1* α)-cDNA diente als Kontrolle. Alle Ergebnisse wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.2.4 Untersuchung der Wechselwirkung von *repeat*- und AR-Region in AvrBs3

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, besteht die zentrale *repeat*-Region von AvrBs3 und Homologen aus direkten, fast identischen Sequenzwiederholungen (*repeats*) eines meist 34 AS umfassenden Motivs (Boch und Bonas, 2010). Der letzte *repeat* von AvrBs3 und Homologen besteht nur aus 19 oder 20 AS und wird meist als halber oder partieller *repeat* bezeichnet (Boch und Bonas, 2010). Ausgehend davon konnte vermutet werden, dass Teile der

Ergebnisse

AR-Region den partiellen *repeat* vervollständigen oder es eine Wechselwirkung zwischen der *repeat*- und AR-Region gibt.

Die Bedeutung des partiellen 18. *repeat*, welcher aus 20 AS besteht, für die Aktivität von AvrBs3 sollte deshalb näher analysiert werden. Dazu wurden ein AvrBs3-Derivat mit einer Deletion des 18. *repeats* (AvrBs3-CR1) und ein AvrBs3-Derivat mit der Vervollständigung des 18. *repeats* auf 34 AS (AvrBs3-CR2) erstellt (Abbildung 13 A). Ausgehend von der publizierten Zählweise der *repeats*, 17 vollständige gefolgt von einem partiellen *repeat* in AvrBs3, kann auch eine alternative Zählweise angenommen werden. Hierbei beginnt die *repeat*-Region mit einem partiellen gefolgt von 17 vollständigen *repeats*. Ausgehend davon wurde ein weiteres AvrBs3-Derivat erstellt, welches die fehlenden 14 AS N-terminal der *repeat*-Region (AvrBs3-NR) enthält (Abbildung 13 A). Die Erstellung der entsprechenden Konstrukte für AvrBs3-NR und AvrBs3-CR2 wurde im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Jacob Haase begonnen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Konstrukte jedoch erneut analysiert. Die AvrBs3-Derivate wurden in pGGA8 kloniert und im GUS-Assay in Blättern von *N. benthamiana* auf die Aktivierung des GUS-Reportergens unter Kontrolle des $UPA20\text{-EBE}_{\text{AvrBs3}}$ getestet. Die Aktivität des AvrBs3-WT Proteins wurde auf 100 % gesetzt. Wie aus Abbildung 13 A hervorgeht, war die GUS-Aktivität von AvrBs3-NR im Vergleich zu AvrBs3-WT auf 60 % reduziert. Für AvrBs3-CR1 und AvrBs3-CR2 war die GUS-Aktivität vergleichbar mit AvrBs3-WT (Abbildung 13). Obwohl alle Proteine in Western Blot mit c-Myc-spezifischem Antikörper nachgewiesen werden konnten, waren die AvrBs3-Derivate AvrBs3-NR, AvrBs3-CR1 und AvrBs3-CR2 schwächer als AvrBs3-WT exprimiert (Abbildung 13 B). Weiterhin wurde auf die HR-Induktion der AvrBs3-Derivate AvrBs3-NR, AvrBs3-CR1 und AvrBs3-CR2 getestet. Hierzu ergab eine durch *A. tumefaciens*-vermittelt transiente Expression der AvrBs3-Derivate AvrBs3-NR, AvrBs3-CR1 und AvrBs3-CR2 in ECW-30R-Paprikapflanzen, dass diese eine zu AvrBs3-WT vergleichbare HR auslösten (Abbildung 13 C). Der partielle 18. *repeat* in AvrBs3 ist somit nicht essentiell für die Funktion.

Ergebnisse

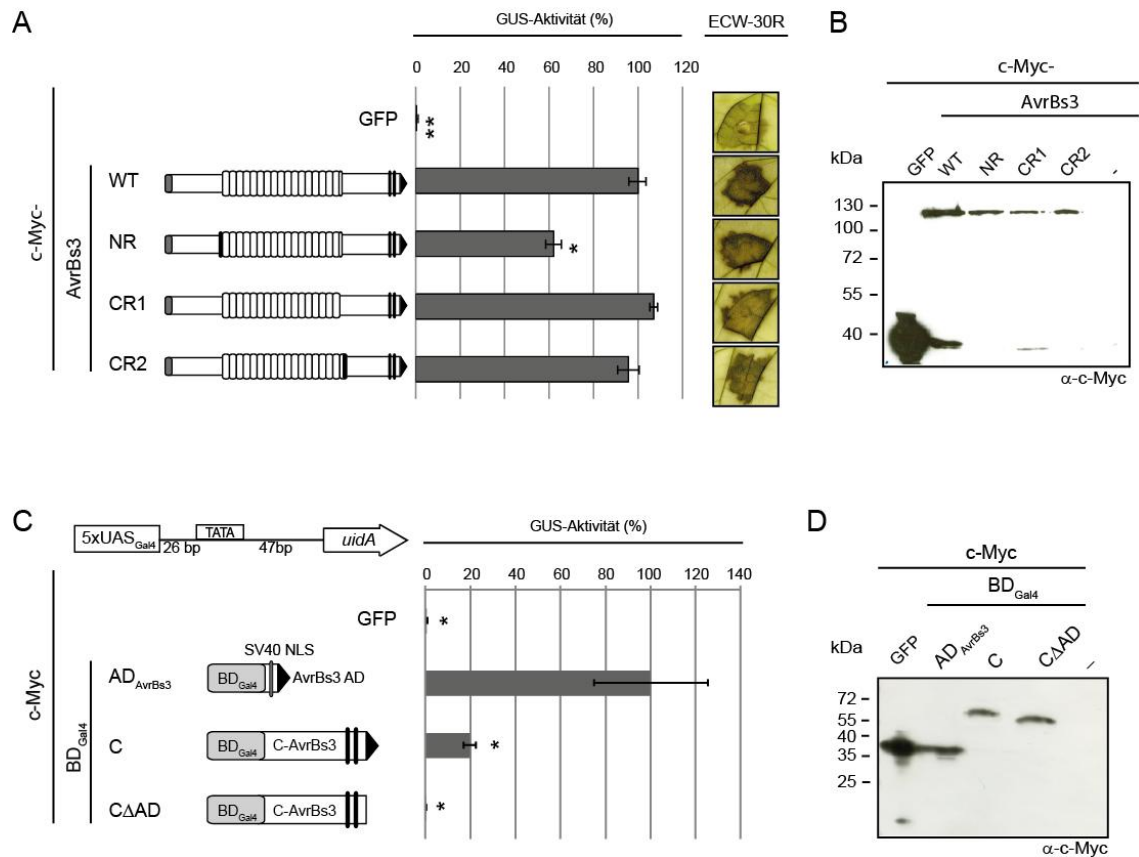


Abbildung 13: Analyse der Wechselwirkung von *repeat*- und AR-Region AvrBs3

(A und B) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte bestehend aus dem *uidA*-Gen unter Kontrolle des (A) *UPA20*-EBE_{AvrBs3} bzw. (B) *5xUAS*_{Gal4}. (A) Graphische Darstellung von AvrBs3 und Derivaten. Die *repeats* von AvrBs3 sind als weiße Ovale dargestellt. Die Vervollständigung des partiellen 18. *repeats* in AvrBs3-NR und AvrBs3-CR2 ist durch ein schwarzes Oval gekennzeichnet. (B) Graphische Darstellung von BD_{Gal4}-Fusionen. Als Positivkontrolle (BD_{Gal4}AD_{AvrBs3}) diente die Fusion der AS 1-147 der BD_{Gal4} (hellgrau) mit der SV40-NLS (dunkelgrau) und der AD von AvrBs3 (schwarzes Dreieck). Fusion der BD_{Gal4} (hellgrau) mit den AS 887-1164 (BD_{Gal4}C) bzw. 887-1132 (BD_{Gal4}CΔAD) von AvrBs3 (weißer Kasten). GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer der Konstrukte für den Reporter, *gfp*, *avrBs3* oder Derivaten bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT (A) bzw. BD_{Gal4}AD_{AvrBs3} (B) wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Test; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$). Die unter (A) gezeigten AvrBs3-Derivate wurden zusätzlich in ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Zur besseren Visualisierung wurden die Blätter 3 dpi geerntet und in Ethanol gebleicht. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. **(C und D)** Expression der c-Myc-Fusionsproteine in *N. benthamiana*. Die in (A und B) analysierten Proben wurden im Immunoblot mit c-Myc-spezifischem Antikörper analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Da der partielle 18. *repeat* von AvrBs3 keinen Einfluss auf die Transkriptionsfaktor-Aktivität hatte, stellte sich die Frage, ob die AR-Region unabhängig von der *repeat*-Region von AvrBs3 ein Reporter gen aktivieren kann. Erste Hinweise darauf gab es durch die Erstellung von AvrBs3-Derivaten, in denen die *repeat*-Region von der AR-Region durch AS-Insertion getrennt wurde. Durch die Einführung eines His₆-Epitop zwischen *repeat*- und AR-Region in AvrBs3 wurde eine Reporter genaktivierung von noch 50 % detektiert (Anhang 1).

Ergebnisse

Um die Vermutung weiter zu untersuchen, dass die AR-Region unabhängig von der *repeat*-Region ein Reporter gen induzieren kann, wurde die AR-Region vollständig von der *repeat*-Region getrennt. Da die DNA-Bindung von AvrBs3 als Voraussetzung zur Geninduktion normalerweise durch die *repeat*-Region vermittelt wird (Kay *et al.*, 2007), wurden die AS 1-147 der Gal4-Bindedomäne (BD_{Gal4}) als alternative Bindedomäne verwendet (Giniger *et al.*, 1985). Zunächst wurden entsprechende Konstrukte für BD_{Gal4} -Derivate erstellt und in pGGA8 kloniert. Das Derivat $BD_{Gal4}C$ enthielt die AD von AvrBs3, wogegen in Derivat $BD_{Gal4}C\Delta AD$ die AD deletiert wurde (Abbildung 13 B). Als Positivkontrolle diente das Konstrukt $BD_{Gal4}AD_{AvrBs3}$, eine Fusion der BD_{Gal4} mit der SV40-NLS und der AD von AvrBs3. Als Reporterkonstrukt diente das *uidA*-Gen unter Kontrolle eines fünffachen UAS-Elementes ($5xUAS_{Gal4}$), welches Gal4-Bindestellen darstellt (Abbildung 13 B). Die Analyse der Reporter genaktivierung des $5xUAS_{Gal4}$ -Reporters erfolgte im GUS-Assay in Blättern von *N. benthamiana*. Aus Abbildung 13 geht hervor, dass die Positivkontrolle GUS-Aktivität zeigt, während für die Negativkontrolle GFP diese nicht werden konnte. Die BD_{Gal4} mit Fusion der AS 887-1164 von AvrBs3 ($BD_{Gal4}C$) zeigte GUS-Aktivität, jedoch war diese geringer im Vergleich zur Positivkontrolle $BD_{Gal4}AD_{AvrBs3}$. Möglicherweise kann das auf einen möglichen effizienteren Kernimport durch die SV40-NLS im Vergleich zur natürlichen NLS von AvrBs3 zurückgeführt werden. Die Fusion der BD_{Gal4} mit den AS 887-1132 von AvrBs3 ($BD_{Gal4}C\Delta AD$), bei der die AD deletiert war, zeigte dagegen keine GUS-Aktivität (Abbildung 13 B). Die Immunblot-Analyse der exprimierten Proteine *in planta* ergab, dass alle Proteine stabil synthetisiert wurden (Abbildung 13 D).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die C-terminalen AS und somit die AR-Region von AvrBs3 nicht in direktem Zusammenhang mit der *repeat*-Region stehen und als eigenständige Region von AvrBs3 ein Reporter gen aktivieren kann.

3.3 Identifizierung kernlokalisierter Interaktionspartner von AvrBs3

Wie ausführlich in Kapitel 1.3.2 beschrieben, stellt AvrBs3 einen Transkriptionsaktivator in eukaryotischen Zellen dar. Da die Induktion von Genen durch die AD im C-terminalen Bereich von AvrBs3 vermittelt wird (Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Szurek *et al.*, 2001; Yang und White, 2004), rekrutiert die AD vermutlich pflanzliche Proteine, die an der Transkriptionsinitiation beteiligt sind (z.B. Komponenten des PIC). Die in Kapitel 3.2 gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die AR-Region im C-terminalen Bereich von AvrBs3 an der Bindung an pflanzliche Interaktionspartner beteiligt ist.

In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Hefe-2-Hybrid-Sichtungen mit AvrBs3 als Köder durchgeführt, die zur Identifizierung von Importin α , ThiC (Thiaminbiosynthese-Protein C-Homolog) und fünf weiteren potentiellen AvrBs3-Interaktoren führten (Szurek, 2001; Szurek *et al.*, 2001; Gürlebeck, 2007). Es wurde allerdings kein Interaktionspartner identifiziert welcher im Kern lokalisiert ist oder der eine Rolle bei der Funktion von AvrBs3 als Transkriptionsfaktor spielen könnte. Wie in der Einleitung unter Kapitel 1.3.4 beschrieben, konnten pflanzliche Interaktoren der AvrBs3-Homologen PthA2, PthA3 und PthA4 mit verschiedenen Funktionen, wie z.B. Kontrolle der Transkription und der DNA-Reparatur, aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtungen identifiziert werden (Domingues *et al.*, 2010). Außerdem wurde in Hefe die Interaktion von PthA1, 2, 3 und 4 mit der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II aus *Citrus* sowie die direkte Interaktion von PthA2 *in vitro* mittels GST-pulldown Experiment gezeigt (Domingues *et al.*, 2012). Die Interaktion von PthA1, 2, 3 bzw. 4 und der CTD wurde durch die LRR (*leucine rich repeat*)-Domäne vermittelt, welche der AR-Region von AvrBs3 entspricht (Domingues *et al.*, 2012). Da die AR-Region in AvrBs3 einen Einfluss auf die Induktion von Zielgenen hat und die AD essentiell für die Transkriptionsaktivierung ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion der CTD der RNA-Polymerase II mit AvrBs3-Regionen analysiert werden.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Interaktion von AvrBs3 mit der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate (*Solanum lycopersicum*). Bei Bestätigung, sollte diese Interaktion mit der AD und AR-Region von AvrBs3 näher analysiert werden. Die Identifizierung weiterer Zellkern-lokalisierter Interaktionspartner von AvrBs3 sollte über verschiedenen Ansätze erfolgen.

3.3.1 Analyse der Interaktion von AvrBs3 mit der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate

Wie oben erwähnt, wurde für das AvrBs3-Homolog PthA2 eine direkte Interaktion mit der CTD der Polymerase II aus *Citrus* (CsCTD) gezeigt (Domingues *et al.*, 2012). Da AvrBs3 und Homologe sowohl in der Struktur, als auch in ihrer Wirkungsweise als Transkriptionsaktivatoren konserviert sind, wurde vermutet, dass AvrBs3 mit der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate (SICTD) interagiert. Die CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate und *Citrus* zeigt auf AS-Ebene 77 % Identität (Anhang 2). Ob AvrBs3 mit der SICTD interagiert sollte *in vitro* mittels GST-pulldown und *in vivo* mittels Hefe-2-Hybrid-System untersucht werden. Dazu wurde die kodierende Sequenz für die SICTD von cDNA aus Tomate amplifiziert und ein Modul für die SICTD erstellt, welches für AS 1528 bis 1846 des RNA-Polymerase II kodiert (pJet1.2:SICTD). Nach der Klonierung in pGGE2, der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen GST-Epitop in *E.coli* erlaubt, erfolgte die Analyse der Interaktion von AvrBs3 und der SICTD sollte *in vitro* mittels GST-pulldown .

Als Positivkontrolle für eine direkte Interaktion diente die bereits bekannte Interaktion von Importin $\alpha 1$ aus Paprika (Calmp $\alpha 1$) und AvrBs3 (Szurek *et al.*, 2001). Anstelle von AvrBs3 wurde das Derivat AvrBs3 $\Delta 2$, auch „356“ genannt, welches die Deletion der AS 2-153 im N-terminalen Bereich aufweist, verwendet (Szurek *et al.*, 2001). Dieses Derivat löst nach transienter Expression in ECW-30R-Pflanzen die HR vergleichbar zu AvrBs3-WT aus (Szurek *et al.*, 2002), ist aber in größeren Mengen rekombinant in *E.coli* synthetisierbar (S. Hahn, F. List und U. Bonas; unveröffentlichte Daten). Nach Immobilisierung der in *E. coli* synthetisierten Proteine GST, GST-Calmp α , GST-SICTD an eine Glutathion-Sepharose und anschließender Inkubation mit dem *E. coli*-Lysat, welches His₆-AvrBs3 $\Delta 2$ enthielt, erfolgte die Elution der Proteine und Analyse im Immunblot unter Verwendung eines GST- und His-spezifischen Antikörpers. Wie die Abbildung 14 A zeigt, wurden die GST-Fusionsproteine GST, GST-Calmp α bzw. GST-SICTD nach der Elution von der Glutathion-Sepharose unter Verwendung eines GST-spezifischen Antikörpers detektiert. Falls eine Interaktion zwischen den GST-fusionierten Proteinen und His₆-AvrBs3 $\Delta 2$ stattfand, sollte diese mit His-spezifischem Antikörper nachweisbar sein. Die Abbildung 14 A zeigt, dass außer einem Signal für die Positivkontrolle GST-Calmp α auch ein Signal für His₆-AvrBs3 $\Delta 2$ detektiert wurde. Dagegen wurde nach der Elution von der Negativkontrolle und GST-SICTD kein Signal für His₆-AvrBs3 $\Delta 2$ detektiert werden (Abbildung 14 A). Somit konnte hier keine Interaktion von AvrBs3 mit der SICTD gezeigt werden.

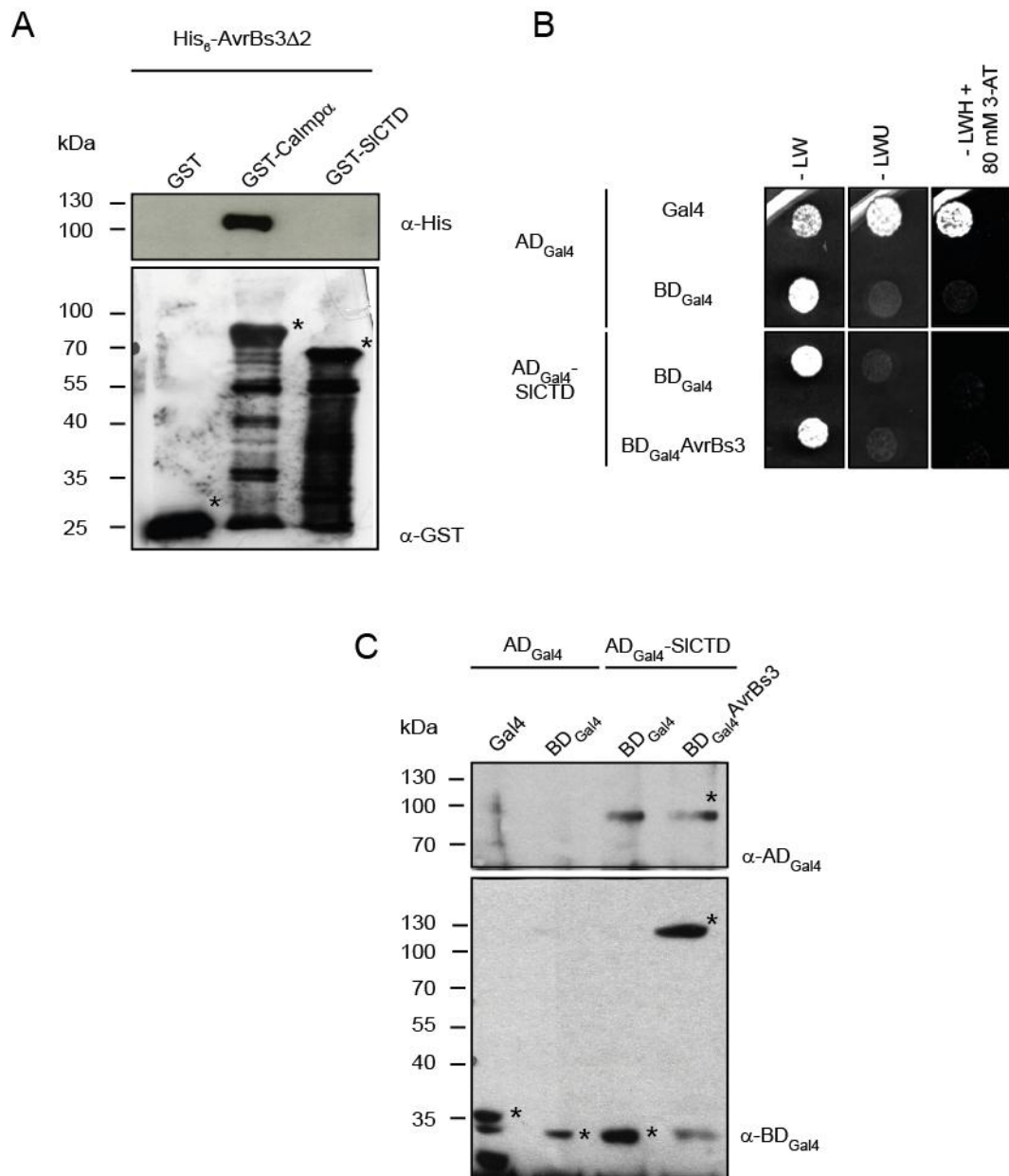


Abbildung 14: Analyse der Interaktion zwischen AvrBs3 und der SICTD *in vitro* und in Hefe

(A) GST-pulldown zur Untersuchung der Interaktion zwischen AvrBs3Δ2 und SICTD. An die Glutathion-Sepharose gebundenes rekombinantes GST, GST-Calmpα und bzw. GST-SICTD wurde mit rekombinantem His₆-AvrBs3Δ2 inkubiert. 20 μl der Eluate wurden im Immunblot mit His- und GST-spezifischem Antikörper analysiert. GST bzw. vollständige GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern (*) markiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. **(B)** Tropftest zur Analyse der Interaktion zwischen AvrBs3 und SICTD in Hefe. Transformanten des *S. cerevisiae*-Stammes MaV103, welche Konstrukte für AD_{Gal4} und Gal4 bzw. BD_{Gal4}, sowie AD_{Gal4}-SICTD und BD_{Gal4} bzw. BD_{Gal4}-AvrBs3 enthielten, wurden auf Minimalmedium ohne Leucin (-LW), Minimalmedium zur Uracil (-LWU)- bzw. Histidin-Selektion (-LWH), welches mit 80 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) versetzt wurde, getropft. **(C)** Immunoblot mit AD_{Gal4}- und BD_{Gal4}-spezifischem Antikörper zum Nachweis der stabilen Expression der Köder- und Beute-Fusionsproteine (*) der in (B) gezeigten Hefe-Transformanten. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit je zwei Transformanten und ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Es ist jeweils nur eine Transformante dargestellt.

Ergebnisse

Da der Nachweis der Interaktion von den AvrBs3-Homologen PthA1, 2, 3 und 4 mit der CsCTD im Gal4-Hefe-2-Hybrid-System geführt wurde (Domingues *et al.*, 2012), sollte dies auch für AvrBs3 und der SICTD untersucht werden. Interaktionsanalysen des vollständigen AvrBs3 waren bisher in Hefe nicht möglich, da AvrBs3-WT autoaktiv ist (Szurek *et al.*, 2001). In unserer Arbeitsgruppe wurden kürzlich zwei interne überlappende Aktivierungsdomänen (iAD) im N-terminalen Bereich von AvrBs3 an AS-Position 233 bis 245 identifiziert, welche nur in Hefe funktional sind (D. Blüher und u. Bonas; unveröffentlichte Daten). Mutationen innerhalb dieser Aktivierungsdomäne führen zum Verlust der Autoaktivität in Hefe (D. Blüher, unveröffentlichte Daten), haben jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins *in planta* (Anhang 3). Daher wurde in dieser Arbeit das Derivat AvrBs3iAD zur Analyse von AvrBs3 und möglichen Interaktoren in Hefe verwendet. Das Gen für AvrBs3iAD wurde in den Gateway-kompatiblen Ködervektor pGBST7 kloniert, der die konstitutive Expression von Fusionsproteinen mit N-terminaler DNA-Bindedomäne von Gal4 (BD_{Gal4}) ermöglicht ($BD_{Gal4}AvrBs3iAD$). Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt, welches nur die BD_{Gal4} exprimiert (pGBST7:LV), als Positivkontrolle diente die Fusion der BD_{Gal4} mit der AD von Gal4 (Gal4). Das Gen für die SICTD wurde in pEGG und anschließend in den Beutevektor pACT2.2gtwy kloniert, der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminaler AD von Gal4 (AD_{Gal4}) erlaubt. Ebenso wurde das Plasmid pACT2.2LV erstellt, welches nur die AD_{Gal4} exprimiert. Nach Ko-Transformation von Köder- und Beuteplasmiden in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm MaV103, welcher die Reportergene *URA3* und *HIS3* trägt, erfolgte die Analyse auf verschiedenen Medien. Ein Wachstum auf dem Selektivmedium ist mit einer Induktion des Reportergens *HIS3* oder *URA3* zurückzuführen. Es wurden Verdünnungsstufen (10^0 und 10^{-1}) einer Flüssigkultur von den zu untersuchenden Hefestämmen auf Festmedium getropft. Als Wachstumskontrolle diente das Wachstum auf Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Köder- und Beutefusionsproteinen erfolgte durch Wachstumsanalyse auf Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Uracil (Uracil-Selektion) bzw. ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (Histidin-Selektion). Dem Histidin-Selektionsmedium wurde 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT) zugesetzt, um die Induktion des *HIS3*-Reportergens und somit Hintergrundwachstum zu unterdrücken. Wie in Abbildung 14 B gezeigt ist, wuchs die Positivkontrolle Gal4 auf Uracil- bzw. Histidin-Selektionsmedium. Hefe-Transformanden mit Konstrukten für die Negativkontrolle (BD_{Gal4} und AD_{Gal4}) wuchsen dagegen nicht auf Uracil- bzw. Histidin-Selektionsmedium. Ebenso war das auch für Hefe-Transformanden mit Konstrukten für $AD_{Gal4}SICTD$ und die BD_{Gal4} , bzw. $AD_{Gal4}SICTD$ und das $BD_{Gal4}AvrBs3$ auf Uracil-

bzw. Histidin-Selektionsmedium der Fall (Abbildung 14 B). Wie die Abbildung 14 C zeigt, wurden alle Köder- und Beuteproteine stabil synthetisiert.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt, dass im Rahmen dieser Arbeit weder durch *in vitro*-Analyse im GST-*pulldown* noch durch *in vivo*-Analysen in Hefe eine Interaktion zwischen AvrBs3 und der SICTD beobachtet werden konnte.

3.3.2 Biochemischer Ansatz zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern aus *Solanum lycopersicum*

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Rolle der AR-Region im C-terminalen Bereich von AvrBs3 bei der Bindung an Interaktionspartner, wurden verschiedene Ansätze durchgeführt, um Zellkern-lokalisierte Interaktionspartner von AvrBs3 zu identifizieren. Zuerst wurde ein *pulldown*-Experiment mit rekombinantem His₆-markierten AvrBs3 und Extrakt von aus Blattmaterial isolierten Zellkernen von *S. lycopersicum* durchgeführt werden. Um größere Mengen von AvrBs3 *E. coli* herzustellen wurde das Derivat AvrBs3Δ2 verwendet. Da gereinigtes AvrBs3 aus *E. coli* einen starken Abbau zeigt (Abbildung 15 A), erfolgte die Expression von AvrBs3Δ2 mit einem N-terminalen GST- und C-terminalen His₆-Epitop (pET-60-DEST:356). Durch zwei Reinigungsschritte sollte GST-AvrBs3Δ2-His₆ angereichert und für das *pulldown*-Experiment eingesetzt werden. Zusätzlich enthielt das Fusionsprotein zwischen dem GST-Epitop und AvrBs3Δ2 eine Thrombin-Schnittstelle. Im ersten Reinigungsschritt wurde GST-AvrBs3Δ2-His₆ einer Glutathion-Matrix immobilisiert, das GST-Epitop abgeschnitten und AvrBs3Δ2-His₆ eluiert (Abbildung 15 B). Im zweiten Reinigungsschritt wurde AvrBs3Δ2-His₆ an eine NiNTA-Matrix immobilisiert und eluiert. Fraktionen der verschiedenen Affinitätsreinigungsschritte wurden im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Eine Coomassie-Färbung zeigte, dass AvrBs3Δ2-His₆ in voller Länge und nur wenigen Abbaubanden gereinigt wurde (Abbildung 15 B).

Ergebnisse

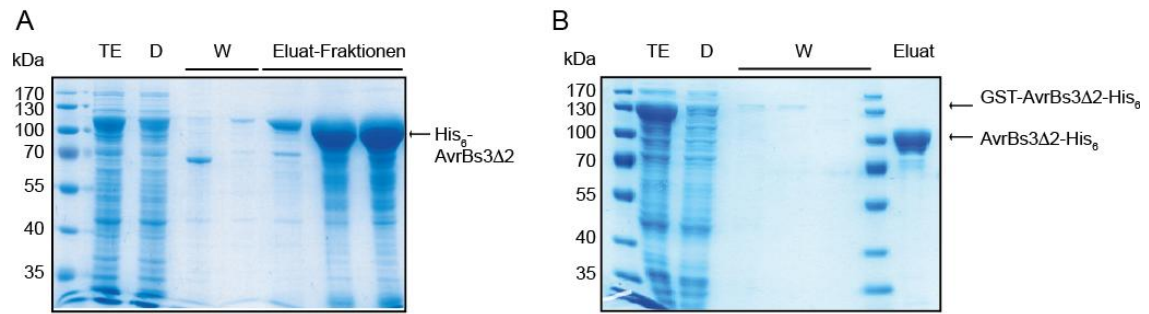


Abbildung 15: Vergleich der Reinigung von rekombinantem AvrBs3 Δ 2 mittels verschiedener Affinitätsreinigungen.

(A) Ein-Schritt Reinigung von His₆-AvrBs3 Δ 2. His₆-AvrBs3 Δ 2 wurde in *E.coli* exprimiert und unter Verwendung von Ni-NTA Agarose aus bakteriellen Lysaten gereinigt. Totalextrakte (TE), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W) und von der Matrix eluiertes Protein (E) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung analysiert. **(B)** Zwei-Schritt-Reinigung von AvrBs3 Δ 2-His₆. Rekombinantes GST-AvrBs3 Δ 2-His₆ wurde aus *E.coli* gereinigt. Nach Inkubation mit Thrombin und Abschneiden des GST-Epitop wurde AvrBs3 Δ 2-His₆ unter Verwendung von Ni-NTA Agarose gereinigt. Totalextrakte (TE), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W) und von der Matrix eluiertes Protein nach Reinigung über Glutathion Sepharose (E₁) und nach Reinigung über Ni-NTA Agarose (E₂) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung analysiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Experimente wurden mehr als dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Zur Identifizierung von AvrBs3-Interaktionspartnern aus Tomate wurde Kernextrakt aus Tomatenblättern isoliert (Kapitel 2.2.2.6). Für das *pulldown*-Experiment wurde AvrBs3 Δ 2-His₆ bzw. His₆-GFP an eine NiNTA-Matrix immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Kernextrakt aus Tomate. Nach mehreren Waschschritten wurde AvrBs3 Δ 2-His₆ von der NiNTA-Matrix eluiert. Fraktionen der verschiedenen Affinitätsreinigungsschritte wurden im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Durch Analyse im Massenspektrometer sollten Unterschiede, der durch AvrBs3 Δ 2-His₆ und His₆-GFP ko-immobilisierten Proteine sichtbar, gemacht werden. Die Analyse der Coomassie-gefärbten SDS-Gele zeigten jedoch, dass AvrBs3 Δ 2-His₆ nach der Elution kaum zu detektieren, d.h. durch starken Abbau gekennzeichnet war (Daten nicht gezeigt). Auch nach dreimaliger Wiederholung des Experimentes war AvrBs3 Δ 2-His₆ kaum zu detektieren.

Weiterhin erfolgte die Durchführung eines *pulldown*-Experiment mit einem rekombinantem His₆-markierten AvrBs3-Derivat, welches nur die C-terminalen 278 AS enthält wie oben beschrieben. Trotz Verwendung von verschiedener Epitope und Optimierung der Expression, konnte dieses Protein nicht in löslicher Form aus *E. coli* isoliert werden. Somit war eine biochemische Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von AvrBs3 nicht möglich.

3.3.3 Hefe-2-Hybrid-Sichtungen zur Identifizierung von AvrBs3-Interaktionspartnern

3.3.3.1 Wahl der cDNA-Bank und der Köderproteine

Um Interaktionspartner von AvrBs3 zu ermitteln, wurde die cDNA-Bank aus Paprika ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen (*Capsicum annuum*) verwendet (Szczesny *et al.*, 2010). Die Sichtung der cDNA-Bank erfolgte nach dem Prinzip des MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-2-Hybrid-Systems nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland). Im Unterschied zu vorangegangenen Studien, bei der die Sichtung der cDNA-Bank durch Paarung von zwei Hefe-Stämmen, welche Köderkonstrukt bzw. die cDNA-Bank enthielten, erfolgte die Sichtung in dieser Arbeit durch Ko-Transformation von Köderkonstrukt und der cDNA-Bank. Dazu wurde die cDNA-Bank zunächst in *E.coli* amplifiziert und die Plasmid-DNA isoliert. Der Titer der cDNA-Bank entsprach $7,2 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten (KBE) und wurde im fünffachen Überschuss eingesetzt.

Um gezielt Interaktoren des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 zu identifizieren, wurden zwei Konstrukte für Gal₄^{BD}-Derivate erstellt, bei denen die AS 1-147 der BD_{Gal4} mit dem C-terminalen Bereich von AvrBs3 fusioniert wurden. Das Derivat BD_{Gal4}C enthielt die AD von AvrBs3, welches die C-terminalen 278 AS von AvrBs3 enthielt, wogegen die AD in Derivat BD_{Gal4}CΔAD deletiert wurde. Die entsprechenden Module wurden bereits unter 3.2.4 erstellt. Zunächst erfolgte die *golden-gate*-Klonierung der Konstrukte in pEGG. Nach Klonierung der kodierenden Sequenzen für BD_{Gal4}C und BD_{Gal4}CΔAD in pAG424GPD erfolgte die Transformation in den *S. cerevisiae*-Stamm MaV103. Dieser trägt, wie oben beschrieben, die Reportergene *URA3*, *HIS3* und *lacZ*. Um auszuschließen, dass die AvrBs3-Derivate Autoaktivität zeigen, wurde ein Tropftest durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt, welches nur die BD_{Gal4} exprimiert (pAG424:BD_{Gal4}), als Positivkontrolle die Fusion der BD_{Gal4} mit AD_{Gal4} (pAG424:Gal4). Für den Tropftest wurden, wie zuvor beschrieben, Verdünnungsstufen einer Flüssigkultur von den zu untersuchenden Hefestämmen mit den entsprechenden Köderkonstrukten auf Festmedium getropft. Als Wachstumskontrolle diente das Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan. Die Untersuchung möglicher Autoaktivität der Köderproteine erfolgte durch Wachstumsanalyse auf Minimalmedium ohne Tryptophan und Uracil (Uracil-Selektion) bzw. ohne Tryptophan und Histidin (Histidin-Selektion) oder durch Zugabe von X-α-Gal zur Blau-Weiß-Selektion. Dem Histidin-Selektionsmedium wurde 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT) zugesetzt, um die unspezifische Induktion des *HIS3*-Reportergens und somit Hintergrundwachstum zu unterdrücken. Wie erwartet, wuchs die in die Positivkontrolle

Ergebnisse

Gal4 auf Uracil- bzw. Histidin-Selektionsmedium (Abbildung 16 A). Ebenso zeigte die Positivkontrolle eine Blaufärbung auf Minimalmedium zur Blau-Weiß-Selektion. Die Negativkontrolle BD_{Gal4} konnte dagegen nicht auf Uracil- bzw. Histidin-Selektionsmedium wachsen bzw. zeigte keine Blaufärbung auf Minimalmedium zur Blau-Weiß-Selektion (Abbildung 16 A). Hefetransformanden mit dem Köderprotein $BD_{Gal4}C$ wuchsen nicht auf Uracil-Selektionsmedium bzw. nur wenig auf Histidin-Selektionsmedium. Dieses Hintergrundwachstum wurde durch Zugabe von höheren Konzentrationen an 3-AT unterdrückt (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigten Hefetransformanden mit dem Köder $BD_{Gal4}C$ eine leichte Blaufärbung auf Minimalmedium zur Blau-Weiß-Selektion (Abbildung 16 A). Hefetransformanden mit dem Köder $BD_{Gal4}C\Delta AD$ wuchsen nicht auf Uracil- bzw. Histidin-Selektionsmedium und zeigten keine Blaufärbung auf Minimalmedium zur Blau-Weiß-Selektion (Abbildung 16 A). Der Nachweis der stabilen Expression der Proteine in den untersuchten Hefe-Transformanden konnte unter Verwendung eines BD_{Gal4} -spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 16 B).

Basierend auf dem oben dargestellten Ergebnissen wurde für eine Sichtung der cDNA-Bank aus Paprika die Induktion der Reportergene *URA3* und *HIS3* analysiert.

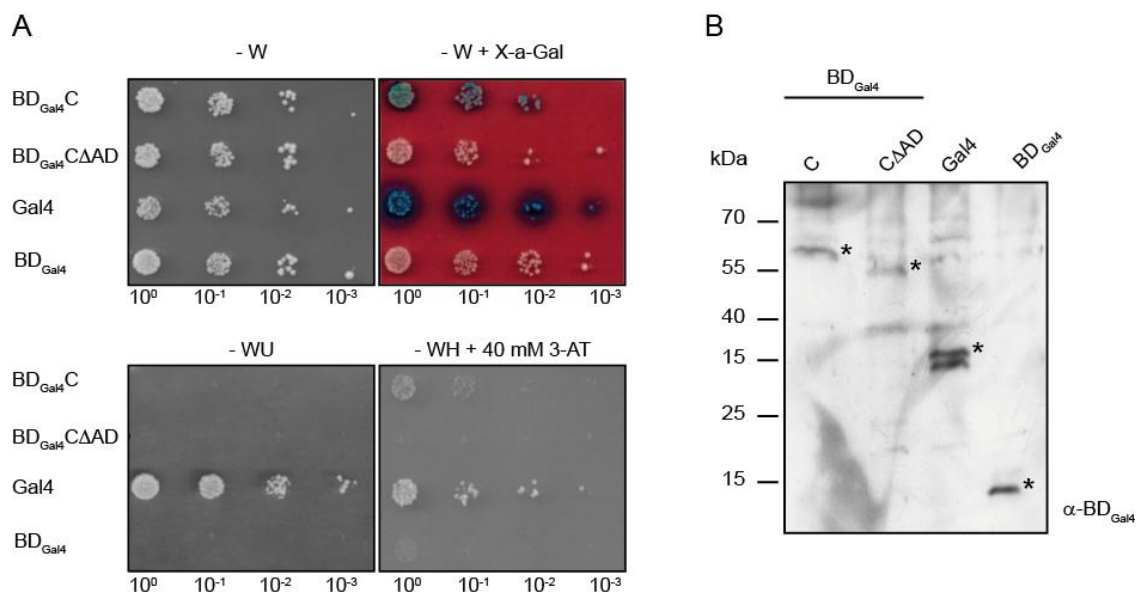


Abbildung 16: Untersuchung der Autoaktivität der Köderproteine $BD_{Gal4}C$ und $BD_{Gal4}C\Delta AD$ in Hefe

(A) Tropftest zur Analyse der Autoaktivität der Köderproteine $BD_{Gal4}C$ und $BD_{Gal4}C\Delta AD$. Transformanden des *S. cerevisiae*-Stammes MaV103, welche Konstrukte für $BD_{Gal4}C$, $BD_{Gal4}C\Delta AD$, sowie die Positivkontrolle Gal4 und die Negativkontrolle BD_{Gal4} enthielten, wurden auf Tryptophan-Selektivmedium (-W), Uracil-Selektivmedium (-WU) bzw. Histidin-Selektivmedium (-WH), welches mit 40 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) versetzt wurden, getropft. **(B)** Immunoblot mit BD_{Gal4} -spezifischem Antikörper zum Nachweis der stabilen Expression der Köderproteine (*) der in (A) gezeigten Transformanden. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Experimente wurden dreimal mit je zwei Transformanden und ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Es ist jeweils nur eine Transformande dargestellt.

3.3.3.2 Sichtung der cDNA-Bank aus Paprika

Für die Sichtung der cDNA Bank aus Paprika wurde der *S. cerevisiae*-Stamm MaV103 mit der cDNA-Bank und den Köderplasmiden für BD_{Gal4}C bzw. BD_{Gal4}CΔAD ko-transformiert. Insgesamt wurden für den Köder BD_{Gal4}C $4,3 \times 10^6$ bzw. für den Köder BD_{Gal4}CΔAD $2,9 \times 10^6$ KBE gesichtet. Die Effizienz lag somit unter dem Titer der cDNA-Bank von $7,2 \times 10^6$ KBE. Die Transformanden wurden auf Minimalmedium zur Uracil- und zur Histidin-Selektion plattiert. Das Histidin-Selektionsmedium enthielt 70 mM 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT). Die erhaltenen Transformanden wurden erneut auf das entsprechende Selektivmedium übergestrichen, die Plasmide isoliert und in *E.coli* transformiert. Nach Plasmidisolation erfolgte die Transformation in MaV103-Zellen, welche bereits die Köder BD_{Gal4}C, BD_{Gal4}CΔAD bzw. BD_{Gal4} enthielten und die Analyse auf dem entsprechenden Selektionsmedium. Es sollte somit eine spezifische Interaktion mit dem jeweiligen Köder überprüft bzw. die unspezifische Interaktion mit der Negativkontrolle BD_{Gal4} ausgeschlossen werden. Die Anzahl der selektierten Transformanden nach den Hefe-2-Hybrid-Sichtungen und der resultierenden spezifischen Transformanden ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Anzahl der durch Hefe-2-Hybrid-Sichtungen selektierten und spezifischen Transformanden

Köder	Selektierte Transformanden		Spezifische Transformanden ^a	
	- Uracil	- Histidin	- Uracil	- Histidin
BD _{Gal4} C	151	650	60 (9) ^b	-
BD _{Gal4} CΔAD	7	146	-	14

^a – nach Isolierung des jeweiligen Plasmids und Spezifitätstest von Hefestämmen, welche die Köder BD_{Gal4}C, BD_{Gal4}CΔAD bzw. BD_{Gal4} enthielten; ^b – auf Uracil-Selektionsmedium selektierte Transformanden

Die Inserts der verbleibenden 73 Kandidaten wurden sequenziert und die Sequenzen mit Einträgen in NCBI- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) und EST (*expressed sequence tags*)-Datenbanken für *S. lycopersicum* und *C. annuum* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>) verglichen, um für die kodierenden Proteine Homologie zu bekannten Proteinen zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Anhang 4 aufgeführt.

Von besonderem Interesse unter den Kandidaten sind solche, welche an der Transkriptionsmaschinerie bzw. an der Anordnung der Chromatinstruktur beteiligt sein könnten, sowie eine vorhergesagte Kernlokalisierung aufweisen. Von diesen Kriterien ausgehend wurden acht Kandidaten ausgewählt, deren Interaktion mit AvrBs3 näher analysiert werden sollte (Tabelle 5).

Ergebnisse

Zu diesen Kandidaten zählten ein Zinkfingerprotein (ZF), ein RNA-bindendes Protein mit einer KH-Domäne (KH), ein Chromatin-bindendes Protein mit einer RED-Domäne (RED = Arginin, Glutamin- und Asparaginsäure). Weitere Kandidaten sind die C-Untereinheit des Transkriptionsfaktors Y (NF-YC), ein CONSTANS-interagierendes Protein (CIP6) und der bZIP-Transkriptionsfaktor RF2b (RF2b), deren Interaktion mit AvrBs3 in dieser Arbeit analysiert werden sollte. Eine Proteinkinase (PK) und ein Homöobox-Protein (HBP) sollten im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Monique Warlich analysiert werden. Alle cDNA-Fragmente wurden mit dem Köder BD_{Gal4}C identifiziert. Das cDNA-Fragment für RED konnte zusätzlich mit dem Köder BD_{Gal4}CΔAD identifiziert werden.

Tabelle 5: Mit den Ködern BD_{Gal4}C und BD_{Gal4}CΔAD interagierende Proteinfragmente aus Tomate

Name	Homologie	Größe der cDNA in Bp	AS-Homologie in % ^c	Anzahl cDNA-Fragmente
SIZF^a	Protein mit Zink-Finger Domäne	1200	43 %	2
SIKH^a	Protein mit KH-Domäne	1500	100 %	1
CaRED^{a,b}	Protein RED	1700	97 %	2
CaNF-YC^a	Untereinheit C-4 des Transkriptionsfaktor Y	750	94 %	1
CaCIP6^a	CONSTANS-interagierendes Protein 6	1550	92%	1
CaRF2b^a	Transkriptionsfaktor RF2b	970	76 %	1
SIPK^a	Serine/Threonine-Kinase	1450	84 %	1
SIHBP^a	Homöobox-Protein	1300	72 %	1

^a – Interaktor von BD_{Gal4}C; ^b – Interaktor von BD_{Gal4}CΔAD; ^c - Homologie zu EST aus der Tomate-EST-Datenbank

3.4 Analyse der Kandidaten für AvrBs3-Interaktionspartner

Wie in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben, wurden mit einem veränderten experimentellen Hefe-2-Hybrid-Ansatz, Interaktoren des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 aus Paprika identifiziert, deren Lokalisierung im Zellkern vorhergesagt ist. Zur näheren Analyse der Interaktion von AvrBs3 mit den Kandidaten ZF, KH, RED, NF-YC, CIP6 und RF2b sollten zunächst die entsprechenden vollständigen kodierenden Sequenzen für die Kandidaten isoliert werden. Für alle Kandidaten wurden vollständige ESTs in Paprika (*C. annuum*) bzw. Tomate (*S. lycopersicum*) mittels NCBI-Blast identifiziert. Die kodierenden Sequenzen der Kandidaten RED,

Ergebnisse

NF-YC, CIP6 und RF2b wurden aus cDNA von *C. annuum* und die kodierenden Sequenzen der Kandidaten ZF und KH aus cDNA von *S. lycopersicum* amplifiziert (Anhang 5). Die PCR-Fragmente wurden zunächst in pJet1.2 kloniert und sequenziert. Anschließend erfolgte die Klonierung der entsprechenden ORFs für die Kandidaten in verschiedene Vektoren, die die Expression der Kandidaten SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 und CaRF2b in Hefe, *E. coli*, sowie die *Agrobacterium*-vermittelte Expression *in planta*, erlauben.

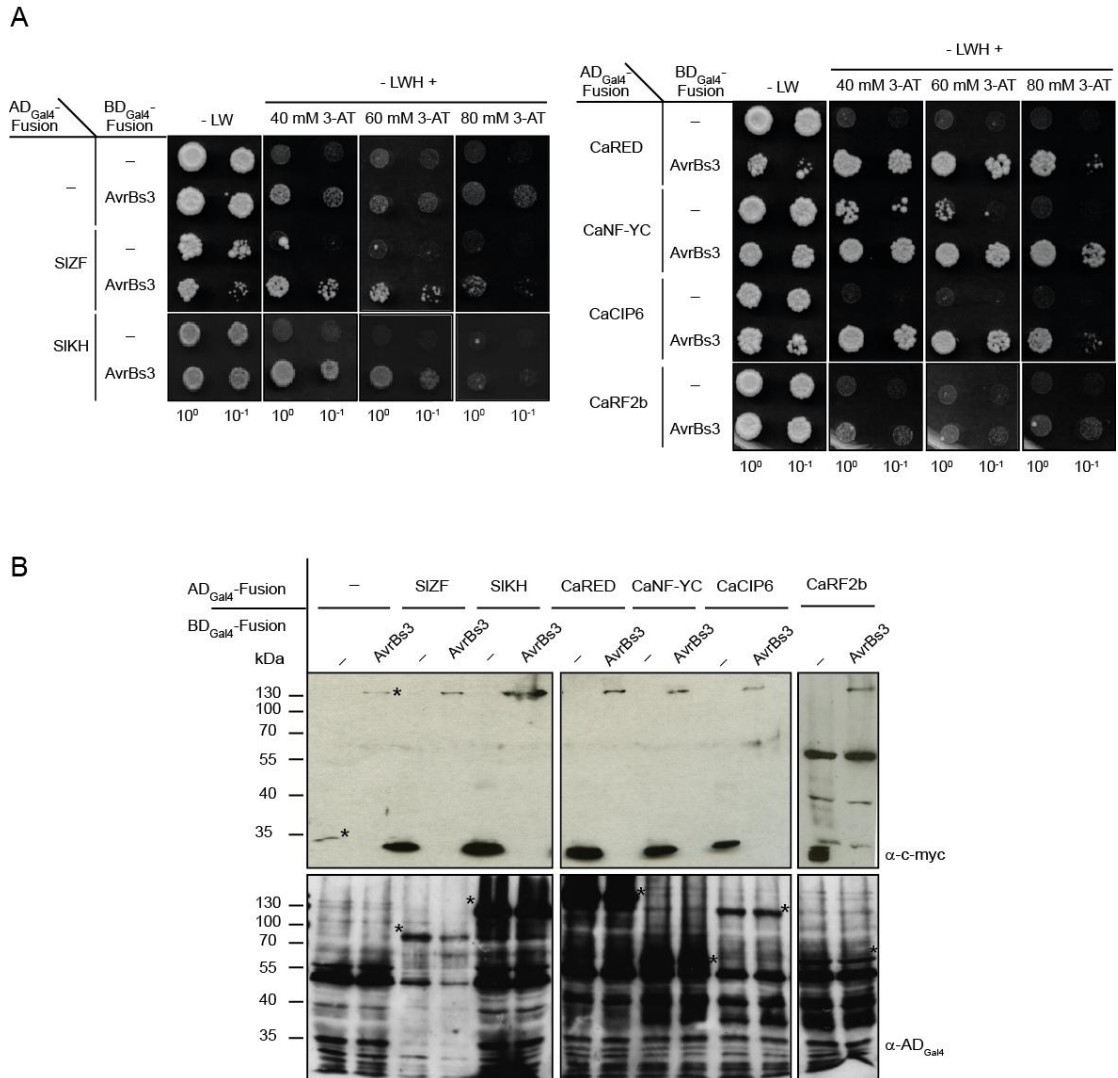
3.4.1 Verifizierung der AvrBs3-Interaktionen mit den Kandidaten in Hefe

Zur Analyse der Interaktion von AvrBs3 mit den Kandidaten SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 und CaRF2b in Hefe, wurden die vollständigen kodierenden Sequenzen in pACT2.2gtwy kloniert, welcher die Fusion der Proteine an die AD_{Gal4} ermöglicht. Für AvrBs3 wurde wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, das Derivat AvrBs3iAD verwendet (BD_{Gal4}AvrBs3iAD), welches in Hefe keine Autoaktivität zeigt. Als Negativkontrolle diente die BD_{Gal4}. Der Hefestamm MaV103 wurde mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert und die Hefe-Transformanden auf Histidin-Selektionsmedium, wie zuvor beschrieben, analysiert. Das Medium enthielt verschiedene Konzentration (40, 60 bzw. 80 mM) von 3-AT. Wie die Abbildung 17 A zeigt, war kein Wachstum der Köder BD_{Gal4} und BD_{Gal4}AvrBs3iAD auf Histidin-Selektionsmedium zu beobachten. Hefe-Transformanden mit Konstrukten für die AD_{Gal4}-Fusionsproteine der zu untersuchten Kandidaten und der Negativkontrolle BD_{Gal4} wuchsen nicht auf Histidin-Selektionsmedium. Dagegen war für Hefe-Transformanden mit Konstrukten für AD_{Gal4}-Fusionsproteine der Kandidaten SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC bzw. CaCIP6 und BD_{Gal4}AvrBs3iAD ein Wachstum auf Histidin-Selektionsmedium zu beobachten (Abbildung 17 A). Für Hefe-Transformanden mit Konstrukten für AD_{Gal4}-CaRF2b und BD_{Gal4}AvrBs3iAD konnte kein Wachstum beobachtet werden. Enthielt das Medium höhere Konzentrationen an 3-AT, wuchsen nur Hefe-Transformanden mit Konstrukten für die AD_{Gal4}-Fusionsproteine von CaRED, CaNF-YC bzw. CaCIP6 und BD_{Gal4}AvrBs3iAD (Abbildung 17 B). Die stabile Synthese der Köder- und Beutefusionsproteine in den untersuchten Hefetransformanden wurde im Immunblot unter Verwendung eines c-Myc- und BD_{Gal4}-spezifischen Antikörpers gezeigt (Abbildung 17 B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die vollständigen Proteine für die Kandidaten SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC und CaCIP6 mit AvrBs3 in voller Länge in Hefe interagieren. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Interaktionen zwischen AvrBs3 und SIZF bzw. SIKH schwächer zu sein scheinen, als mit CaRED, CaNF-YC und CaCIP6. Eine Interaktion für AvrBs3 und CaRF2b konnte

Ergebnisse

in Hefe nicht gezeigt werden. Ob die Proteine der potentielle Interaktoren auch *in planta* mit AvrBs3 interagieren, sollte als Nächstes analysiert werden.



3.4.2 Untersuchung der Lokalisierung der potentiellen Interaktoren in *N. benthamiana*

Um die Interaktion der zuvor beschriebenen potentiellen Interaktoren mit AvrBs3 *in planta* zu analysieren, sollte zunächst ihre Lokalisierung in der pflanzlichen Zelle bestimmt werden. Die Lokalisierung der potentiellen Interaktoren erfolgte durch Untersuchung von Fusionsproteinen zwischen dem potentiellen Interaktor und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) mit Hilfe des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops (LSM). Die kodierenden Sequenzen für die entsprechenden potentiellen Interaktoren wurden in pGGA2 kloniert, der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen GFP-Epitop erlaubt. Als Kontrollen dienten GFP-AvrBs3 Δ 2, welches, wie bekannt, in den Zellkern lokalisiert (Szurek *et al.*, 2002) und GFP welches sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma lokalisiert (Böhm *et al.*, 2006). Die Expressionskonstrukte für GFP, GFP-AvrBs3 Δ 2 bzw. die potentiellen Interaktoren wurden *Agrobacterium*-vermittelt in Blättern von *N. benthamiana*-Pflanzen exprimiert. Etwa 3 dpi nach Inokulation wurden Gewebeproben am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) untersucht. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) infiltriert, welches sich an AT-reiche Sequenzen der DNA anlagert (Kapuscinski, 1995). Wie die Abbildung 18 A zeigt, lokalisiert AvrBs3 Δ 2 im Zellkern, während GFP sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma lokalisiert. Alle untersuchten potentiellen Interaktoren lokalisierten im Zellkern (Abbildung 18 A). Die potentiellen Interaktoren SIZF und CaRED zeigten zusätzlich eine Lokalisierung im Zytoplasma. Ein Immunblot zeigte die stabile Expression der Proteine (Abbildung 18 B). Somit wurde die Lokalisierung der potentiellen Interaktoren SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 und CaRF2b in Zellkernen von *N. benthamiana*-Blättern bestätigt.

Ergebnisse

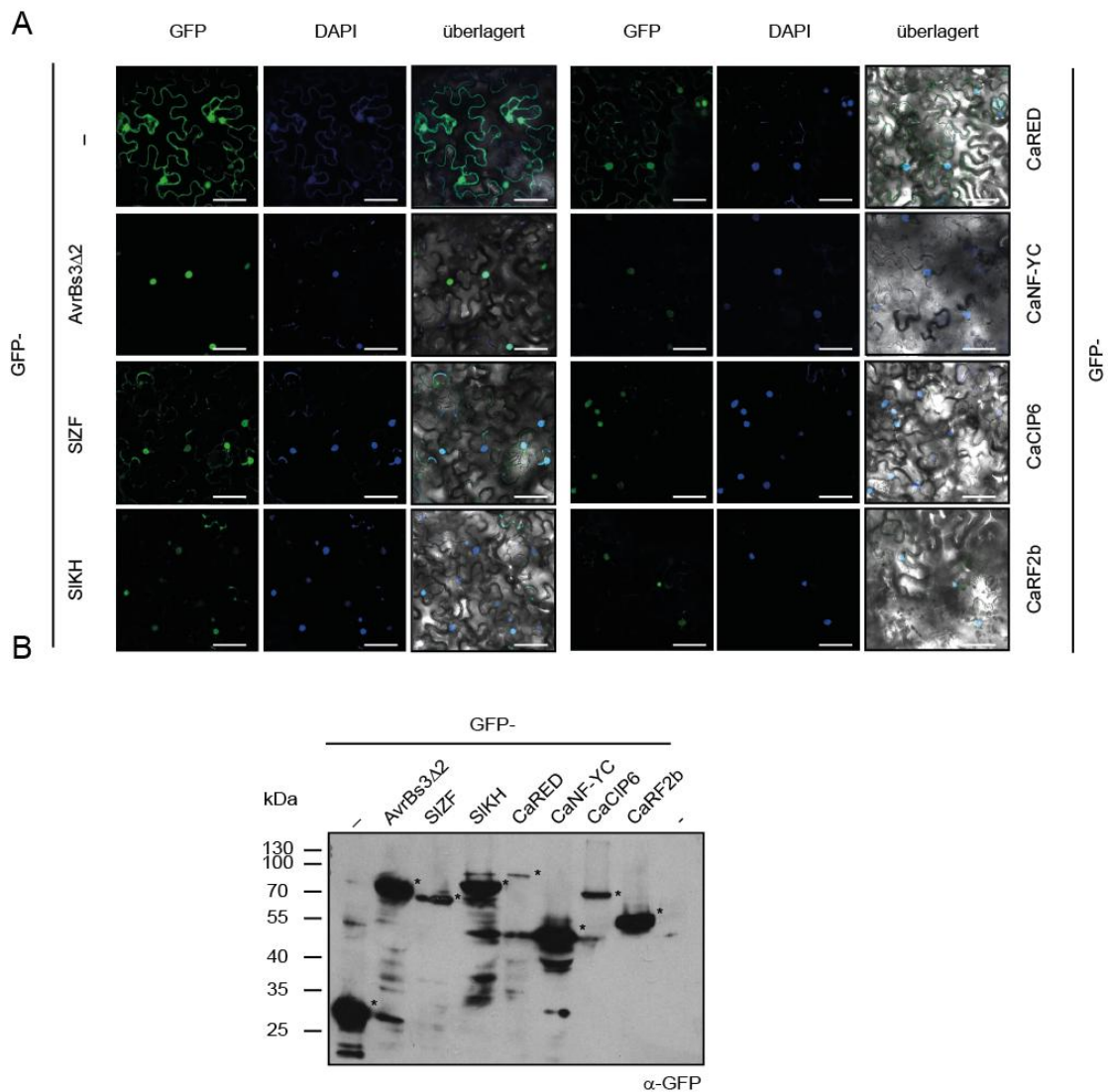


Abbildung 18: Lokalisierung der potentiellen Interaktoren in Zellen von *N. benthamiana*

(A) Analyse der Lokalisierung der potentiellen Interaktoren SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 und CaRF2b als GFP-Fusionsproteine in *N. benthamiana*. 3 dpi nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression der putativen Interaktoren, AvrBs3 Δ 2 bzw. GFP in *N. benthamiana* erfolgte die Visualisierung der Zellkerne durch eine Infiltration mit DAPI-Lösung. Blattmaterial wurde mikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops unter Verwendung spezifischer Filter für EGFP und DAPI ausgewertet. Der Größenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m. **(B)** Immunoblot der unter (A) untersuchten GFP-Fusionsproteine unter Verwendung eines GFP-spezifischem Antikörpers. Die erwarteten molekularen Massen sind mit einem Stern (*) markiert und in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.4.3 Analyse der Interaktion von potentiellen Interaktoren und AvrBs3 *in planta*

3.4.3.1 BiFC zur Analyse der Interaktion *in planta*

Eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion in Pflanzen ist die Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation (*bimolecular fluorescence complementation*; BiFC). Dabei wird ein Interaktionspartner mit den N-terminalen 155 AS des gelb fluoreszierenden Proteins YFP (*yellow fluorescent protein*, YFP_N) fusioniert und der andere Interaktionspartner mit den C-terminalen 84 AS des YFP (YFP_C). Kommen die N- und C-terminalen Fusionsproteine durch direkte oder indirekte Interaktion in räumliche Nähe zueinander, bilden sie einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 500 nm angeregt werden kann. Für die BiFC-Analysen wurde die kodierenden Sequenzen für die potentiellen Interaktoren in pGGA30 (*YFP_C-C-Myc₄-Gen*) und die kodierende Sequenz für AvrBs3 in pGGA28 (*YFP_N-3xHA-Gen*) kloniert. Als Positivkontrolle diente die Ko-Expression von AvrBs3 und Importin α . Als Negativkontrollen dienten der Leervektor bzw. die BD_{Gal4}. Es stellte sich heraus, dass nach *Agrobacterium*-vermittelter Ko-Expression von AvrBs3 und den Negativkontrollen eine Fluoreszenz im Zellkern beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Aus Zeitgründen wurden die BiFC-Experimente nicht weiter optimiert.

3.4.3.2 Ko-Immunopräzipitation zur Untersuchung der Interaktion der potentiellen AvrBs3-Interaktoren

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion *in planta* ist die Ko-Immunopräzipitation (KoIP). Dazu wurden die kodierenden Sequenzen der potentiellen Interaktoren in pGGA8 kloniert, der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen vierfachen c-Myc-Epitop erlaubt. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen AvrBs3 und Importin α (Gürlebeck, 2007). Die kodierende Sequenz für AvrBs3 Δ 2 lag, wie bereits in Kapitel in 3.4.2 beschrieben, in pGGA2 vor, welcher die Expression von GFP-Fusionen erlaubt. Drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Ko-Expression von GFP-AvrBs3 Δ 2 und den c-Myc₄-Fusionsproteinen von Calp α , SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 bzw. CaRF2b in *N. benthamiana*-Blättern wurden Proteinextrakte hergestellt und die c-Myc₄-Fusionsproteine mittels ProteinG-Agarose und eines c-Myc-Antikörpers immunopräzipitiert (Abbildung 19 A). Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunblot mit einem c-Myc- und AvrBs3-spezifischem Antikörper. Wie in Abbildung 19 B gezeigt, konnten alle c-Myc₄-Fusionsproteine immobilisiert

Ergebnisse

und präzipitiert werden. Die Interaktion zwischen AvrBs3 und Importin α wurde, wie erwartet bestätigt (Abbildung 19 B). GFP-AvrBs3 Δ 2 wurde mit c-Myc₄-SIZF, -CaRED und -CaCIP6, aber nicht mit c-Myc₄-SIKH, -CaNF-YC und -CaRF2b, ko-immunopräzipitiert. Die Reproduzierung der Ergebnisse war schwierig, da die c-Myc-Fusionsproteine nicht immer detektiert werden konnten. Ebenso wurde ein Ansatz durchgeführt, bei dem c-Myc₄-AvrBs3 Δ 2 mittels ProteinG-Agarose und eines c-Myc-Antikörpers immunopräzipitiert wurde. Die potentiellen Interaktoren, welche in diesem Fall als GFP-Fusionsproteine vorlagen, sollten ko-immunopräzipitiert werden, wenn diese mit c-Myc₄-AvrBs3 Δ 2 interagierten. Jedoch waren die GFP-Fusionsproteine, inklusive der Positivkontrolle GFP-Calmp α , schlecht bis gar nicht zu detektieren, so dass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden konnte. Somit konnte die Interaktion von AvrBs3 und SIZF, CaRED bzw. CaCIP6 *in planta* gezeigt werden.

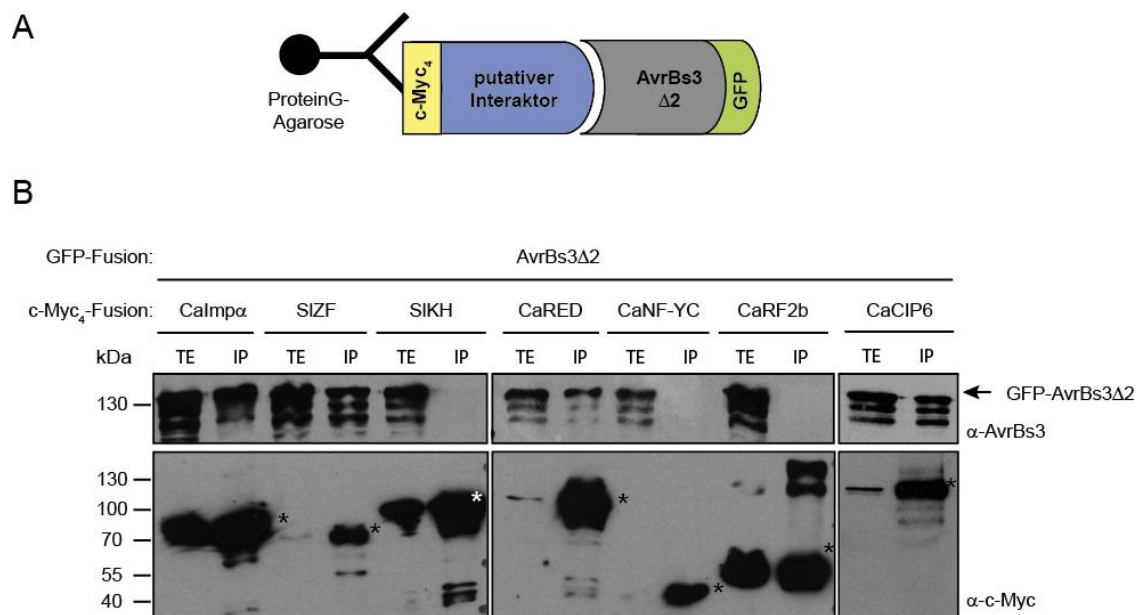


Abbildung 19: Ko-Immunopräzipitation von AvrBs3 Δ 2 mit potentiellen pflanzlichen Interaktoren

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes. Die c-Myc₄-markierten Interaktionspartner wurden mit GFP-AvrBs3 Δ 2 *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Als Positivkontrolle diente c-Myc₄-Calmp α . Nach 3 Tagen wurde Blattmaterial aufgeschlossen und die c-Myc-markierten Interaktionspartner mittels Protein G-Agarose und c-Myc-Antikörper immobilisiert. **(B)** Immunoblot zur Detektion der Proteine. Die Detektion der Proteine von Totalextrakt (TE) und nach der Ko-Immunopräzipitation (IP) erfolgte unter Verwendung eines c-Myc- bzw. AvrBs3-spezifischen Antikörpers. Die erwarteten molekularen Massen der potentiellen pflanzlichen Interaktoren sind mit einem Stern (*), GFP-AvrBs3 Δ 2 mit einem Pfeil markiert. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.4.4 GST-pulldown-Analysen zur Untersuchung der direkten Interaktion zwischen AvrBs3 und pflanzlichen Proteinen

Mittels GST-pulldown-Experimenten sollte überprüft werden, ob die in Hefe beobachtete Interaktion zwischen AvrBs3 und SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC und CaCIP6 bestätigt werden kann. Die kodierenden Sequenzen für die entsprechenden potentiellen Interaktoren wurden in pGGE2 kloniert, der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen GST-Epitop erlaubt. Als Positivkontrolle für eine *in vitro*-Interaktion dienten, wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, GST-Calmp α und His₆-AvrBs3 Δ 2. Alle Proteine wurden rekombinant aus *E. coli* gereinigt, mit *E. coli*-Lysat, welches His₆-AvrBs3 Δ N2 enthielt, inkubiert und gebundene Proteine mit reduziertem Glutathion eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte im Immunblot unter Verwendung eines GST- und His-spezifischen Antikörpers. Wie zu erwarten, wurde ein Signal für His₆-AvrBs3 Δ 2 im Eluat der Positivkontrolle GST-Calmp α detektiert. Auch im Eluat von CaRED wurde ein Signal für His₆-AvrBs3 Δ 2 detektiert, was jedoch nicht reproduzierbar war (Daten nicht gezeigt). Die GST-Fusionsproteine von SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC und CaCIP6 waren jedoch schlecht exprimiert und nicht mit ihrer erwarteten molekularer Masse zu detektieren.

Somit ist unbekannt, ob die Interaktion zwischen AvrBs3 und SIZF, CaRED, und CaCIP6 *in planta* auf eine direkte Interaktion zurückzuführen ist.

3.4.5 Identifizierung der Interaktionsdomänen in AvrBs3

Wie in Kapitel 3.4.1 und 3.4.3.2 beschrieben, konnte eine Interaktion von AvrBs3 und SIZF, CaRED bzw. CaCIP6 in Hefe und *in planta* gezeigt werden. Als weiteres sollte bestimmt werden, welche Regionen von AvrBs3 mit den Interaktoren interagieren. Wie bereits in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben, wurden die cDNA-Fragmente dieser Interaktoren mit dem Köder BD_{Gal4}C und das cDNA-Fragment für RED zusätzlich mit BD_{Gal4}C Δ AD in Hefe identifiziert.

Zunächst sollte mittels Hefe-2-Hybrid-System untersucht werden, ob die Interaktoren in voller Länge mit den C-terminalen 278 AS von AvrBs3 interagieren. Als Köder dienten der vollständige C-terminale Bereich von AvrBs3 (BD_{Gal4}C) bzw. der C-terminale Bereich ohne AD (BD_{Gal4}C Δ AD) (Kapitel 3.3.3.1 und Abbildung 20 A). Es wurde vermutet, dass die AS 1-45 der AR-Region einen Einfluss auf die Aktivität haben und eine Rolle bei der Bindung von Interaktionspartnern spielen könnten (siehe Kapitel 3.2). Als weiterer Köder sollte daher der C-

Ergebnisse

terminale Bereich von AvrBs3 mit Deletion der AS 2-45 der AR-Region verwendet werden ($BD_{Gal4}C\Delta AR$, Abbildung 20 A). Da die stabile Synthese von $BD_{Gal4}C\Delta AR$ nicht nachgewiesen werden konnte, entfiel der Interaktionstest. Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt, welches nur die BD_{Gal4} exprimiert ($pAG424:BD_{Gal4}$). Die Interaktoren lagen in voller Länge als AD_{Gal4} -Fusionskonstrukte vor (siehe Kapitel 3.4.1). Der Hefestamm MaV103 wurde mit den entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert und ein Tropftest, wie zuvor beschrieben, auf Histidin- und Uracil-Selektionsmedium durchgeführt. Wie die Abbildung 20 B zeigt, wuchsen Hefe-Transformanden, mit Konstrukten für die Negativkontrolle BD_{Gal4} und AD_{Gal4} -SIZF, AD_{Gal4} -CaCIP6 bzw. AD_{Gal4} -CaRED, nicht auf Histidin- und Uracil-Selektionsmedium. Bei Hefe-Transformanden, mit Konstrukten für $BD_{Gal4}C$ und AD_{Gal4} -SIZF, AD_{Gal4} -CaCIP6 bzw. AD_{Gal4} -CaRED, wurde ein Wachstum auf Histidin- und Uracil-Selektionsmedium beobachtet (Abbildung 20 B). Hierbei war das Wachstum auf Uracil-Selektionsmedium jedoch schwächer. Hefe-Transformanden, mit Konstrukten für $BD_{Gal4}C\Delta AD$ und AD_{Gal4} -SIZF bzw. AD_{Gal4} -CaCIP6, wuchsen dagegen nicht auf Histidin- und Uracil-Selektionsmedium. Dagegen wuchsen Hefe-Transformanden, mit $BD_{Gal4}C\Delta AD$ und AD_{Gal4} -CaRED, auf Histidin-Selektionsmedium, jedoch nicht auf Uracil-Selektionsmedium (Abbildung 20 B). Alle analysierten Hefe-Transformanden zeigten normales Wachstum auf den Kontrollplatten zur Selektion der transformierten Plasmide (Abbildung 20 B).

Aus diesem Ergebnis sich folgende Schlussfolgerung: SIZF, CaCIP6 und CaRED interagieren in Hefe abhängig von der AD von AvrBs3. Für CaRED wurde zusätzlich eine Interaktion mit der C-terminalen AvrBs3-Region ohne AD beobachtet. Da diese Interaktion nur für das *HIS3*-Reportergen zu beobachten war, deutet dies auf eine schwache Interaktion hin.

Nachdem in Hefe gezeigt wurde, dass SIZF, CaCIP6 und CaRED der AD von AvrBs3 interagieren, sollte die Interaktion mittels KoIP *in planta* analysiert werden. Dazu wurde ein weiteres AvrBs3-Derivat ohne AD erstellt ($AvrBs3\Delta 2\Delta AD$) und in pGGA2 (GFP-Fusionsvektor) kloniert.

Die entsprechenden kodierenden Sequenzen der Interaktoren lagen, wie zuvor beschrieben, im Vektor pGGA8 vor (Kapitel 3.4.3.2), der die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen vierfachen c-Myc-Epitop erlaubt. Als Positivkontrolle diente c-Myc₄-Calmp α , welches mit der NLS2 von AvrBs3 interagiert (Szurek *et al.*, 2001). Die KoIP wurde wie in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben durchgeführt. Wie die Abbildung 20 B zeigt, konnten alle c-Myc₄-Fusionsproteine immunopräzipitiert werden. Wie zu erwarten ko-immunopräzipitierten GFP-AvrBs3 $\Delta 2$ bzw. GFP-AvrBs3 $\Delta 2\Delta AD$ und die Positivkontrolle c-Myc₄-Calmp α . Während GFP-AvrBs3 $\Delta 2$ und c-Myc₄-SIZF, -CaRED bzw. -CaCIP6 ko-immunopräzipitierten, wurde keine Ko-Immunopräzipitation von GFP-AvrBs3 $\Delta 2\Delta AD$ und den Interaktoren beobachtet.

Ergebnisse

Somit konnte *in planta* eine Interaktion von SIZF, CaCIP6 und CaRED in Abhängigkeit von der AD von AvrBs3 gezeigt werden.

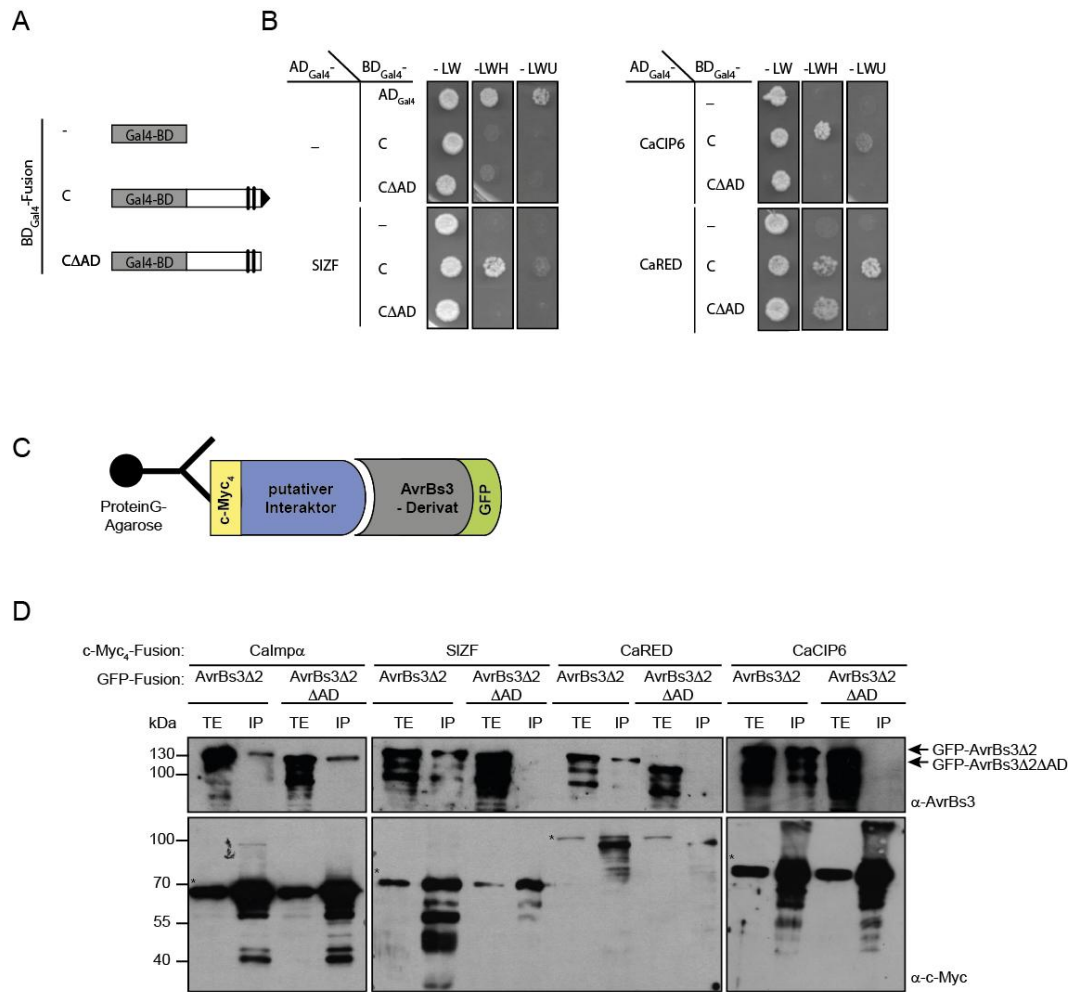


Abbildung 20: Analyse der Interaktion von SIZF, CaCIP6 und CaRED mit der Aktivierungsdomäne von AvrBs3

(A) Graphische Darstellung der BD_{Gal4}-Fusionen. Als Negativkontrolle (BD_{Gal4}) dienen die AS 1-147 der BD_{Gal4} (hellgrau). Fusion der BD_{Gal4} mit den AS 887-1164 (BD_{Gal4}C) bzw. 887-1132 (BD_{Gal4}CΔAD) von AvrBs3. **(B)** Tropftest zur Analyse der Interaktion zwischen BD_{Gal4}-Fusionen und den Kandidaten SIZF, CaCIP6 und CaRED in Hefe. Transformanten des *S. cerevisiae*-Stammes MaV103, welche Konstrukte für BD_{Gal4} (—), BD_{Gal4}C bzw. BD_{Gal4}CΔAD und die AD_{Gal4} (—) bzw. die AD_{Gal4}-Fusionkonstrukte für die zu untersuchenden Kandidaten enthielten, wurden auf Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan (-LW), Histidin- Selektionsmedium (-LWH), welchem 40 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zugesetzt wurden und Uracil-Selektionsmedium (-LWU) getropft. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt, es wurden je zwei Transformanten analysiert. Zu Vereinfachung ist jeweils nur eine Transformante dargestellt. **(C)** Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes. Die c-Myc₄-markierten Interaktionspartner (SIZF, CaRED und CaCIP6) wurden mit GFP-AvrBs3ΔN2 bzw. mit GFP-AvrBs3ΔN2ΔAD *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Als Positivkontrolle diente c-Myc₄-Calmpα. Nach 3 Tagen wurde Blattmaterial aufgeschlossen und die c-Myc₄-markierten Interaktionspartner unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers an ProteinG-Agarose immobilisiert. **(D)** Immunoblot zur Detektion der Proteine. Die Detektion der Proteine von Totalextrakt (TE) und nach der Koimmunopräzipitation (IP) erfolgte mit c-Myc- bzw. AvrBs3-spezifischem Antikörper. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.4.6 Biologische Relevanz der AvrBs3-Interaktoren

Eine weitere Aufgabe bestand darin, die Rolle der Interaktoren hinsichtlich der von AvrBs3-induzierten Hypertrophie bzw. der HR in Paprika bzw. *N. benthamiana* zu untersuchen. Es wurde deshalb Virus-induziertes Gen-silencing (VIGS) der Transkripte von SIZF, CaRED und CaCIP6 in *N. benthamiana* auf Basis des *tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002) bzw. die Über-Expression der Interaktoren durchgeführt und die Ausbildung der durch AvrBs3-induzierten HR analysiert.

3.4.6.1 Gen-silencing von AvrBs3- Interaktionspartnern in *N. benthamiana*

Mittels VIGS in *N. benthamiana*- bzw. *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen sollten die Transkripte der korrespondierenden Interaktorgene reduziert werden. Zur Anwendung kam dafür das Tabakrattle-Virus (TRV)-basierte *silencing*. Bei dem TRV-System befindet sich das Genom des TRV auf zwei Binärvektoren. Der pTRV1 trägt auf der T-DNA den größten Teil der TRV-Gene. Auf der T-DNA von pTRV2a befindet sich neben den Virusgenen eine *Gateway*-Klonierungsstelle für die *silencing*-Fragmente. Das *silencing* sollte in *N. benthamiana*-Pflanzen erfolgen, da AvrBs3 in diesen Pflanzen eine Hypertrophie auslöst (Marois *et al.*, 2002). Nach *silencing* des AvrBs3-induzierten *UPA20*-Gens in *N. benthamiana* wurde eine reduzierte AvrBs3-abhängige Hypertrophie beobachtet (Kay *et al.*, 2007).

Für das *silencing* von *NbZF* und *NbRED* wurden jeweils zwei verschiedene Fragmente von ca. 400 Bp langen genspezifischen Bereichen der korrespondierenden kodierenden Sequenzen von *N. benthamiana*-cDNA amplifiziert (Abbildung 21 A) und in pTRV2a kloniert. Die *silencing*-Konstrukte für *NbZF* wurden als *siZF1* und *siZF2* und *silencing*-Konstrukte für *NbRED* als *siRED1* und *siRED2*, bezeichnet. Für *NbCIP6* konnten keine Konstrukte erstellt werden, da die PCR Amplifikation nicht gelang. Als *silencing*-Kontrolle diente ein Fragment des Gens für die Phytoendesaturase (*Pds*). Die Blätter wurden in Folge des *Pds-silencing* weiß, welches den Zeitpunkt für phänotypische Tests angibt. Als weitere Kontrollen dienten *silencing*-Konstrukte für *gfp* und *UPA20*. Je VIGS-Konstrukt wurden fünf *N. benthamiana* und *Bs3*-transgene *N. benthamiana* mit den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen infiziert. Es erfolgte keine Behandlung von jeweils drei *N. benthamiana*- bzw. *Bs3*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen. Nach etwa 10 Tagen begannen die *Pds-silencing*-Pflanzen weiß zu werden. Zwei Wochen nach Inokulation der *silencing*-Stämme wurde AvrBs3 *Agrobacterium*-vermittelt exprimiert. Wie die Abbildung 21 B zeigt, war 3 dpi eine AvrBs3-abhängige HR auf nicht-behandelten und *gfp*-

Ergebnisse

silencing Bs3-transgenen *N. benthamiana*-Kontrollpflanzen zu beobachten. Die in den Blättern von *NbZF*- und *NbRED silencing*-Pflanzen beobachtete HR war mit den Kontrollpflanzen vergleichbar (Abbildung 21 B). Die AvrBs3-abhängige Hypertrophie auf Blättern von *siZF1*-, *siZF2*-, *siRED1*- und *siRED2-silencing*-Pflanzen war ebenso mit der AvrBs3-abhängigen Reaktion in den Kontrollpflanzen vergleichbar, während die Hypertrophie in *UPA20-silencing* Pflanzen reduziert war (Daten nicht gezeigt).

Um nachzuweisen, dass die Transkripte von *NbZF* und *NbRED* nach VIGS reduziert waren, erfolgten quantitative qRT-PCR-Analysen. Da das *silencing*-Konstrukt selbst nicht amplifiziert werden sollte, wurden spezifische Oligonukleotide für *NbZF* und *NbRED* gewählt, die nicht im *silencing*-Fragment binden (Abbildung 21 A). Von allen *silencing*-Pflanzen, sowie den nicht inokulierten und *gfp-silencing Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen, wurde Blattmaterial geerntet, RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert. Die nach qRT-PCR-Analysen erhaltenen Transkriptmengen für *NbZF* und *NbRED* wurden auf 100% gesetzt. Wie die Abbildung 21 C zeigt, war das nachgewiesene Transkript für die *Bs3*-transgenen *siZF1*-, *siZF2*-, *siRED1*- und *siRED2-silencing*-Pflanzen reduziert. Jedoch lag jeweils noch etwa 50 bis 60 % Transkript im Vergleich zu den nicht-behandelten und *gfp-silencing*-Pflanzen vor. Die gleiche Beobachtung konnte für die *N. benthamiana-silencing*-Pflanzen, im Vergleich zu den *N. benthamiana*-Kontrollpflanzen, gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Da in den *NbZF*- und *NbRED-silencing*-Pflanzen eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen vergleichbare Ausbildung der AvrBs3-abhängigen Hypertrophie bzw. HR beobachtet wurde, waren die verbliebenen Transkriptmengen von *NbZF* und *NbRED* vermutlich ausreichend für die AvrBs3-abhängige Hypertrophie bzw. HR in *N. benthamiana*.

Ergebnisse

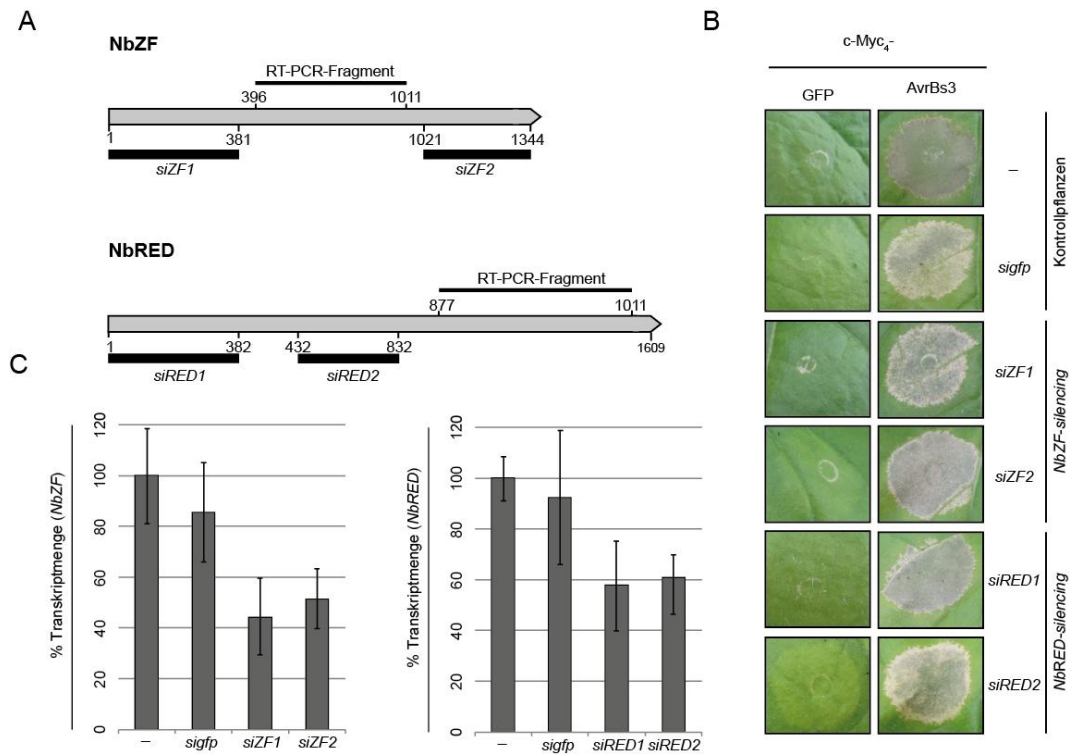


Abbildung 21: Gen-silencing-Experimente von NbZF und NbRED in *N. benthamiana*

(A) Darstellung der Lage der für das *silencing*-Fragmente für NbZF und NbRED. Es wurden jeweils zwei verschiedene Fragmente gewählt (*siZF1*, *siZF2*, *siRED1* und *siRED2*). Weiterhin ist die Lage der RT-PCR-Fragmente dargestellt. **(B)** Analyse der Ausbildung von AvrBs3-abhängiger HR auf nicht-behandelten und *sigfp*-, *siZF1*-, *siZF2*-, *siRED1*- und *siRED2*-silencing *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen. Zehn Tage nach *silencing* wurde *Agrobacterium*-vermittelt c-Myc₄-AvrBs3 bzw. c-Myc₄-GFP in den *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen exprimiert. Die Blätter wurden 3 dpi fotografiert. Die Bilder zeigen typische Ausprägungen der AvrBs3-HR für die jeweiligen *silencing*-Pflanzen. Das Experiment wurde dreimal mit jeweils fünf Pflanzen wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. **(C)** qRT-PCR-Analyse zur Analyse der Transkriptmenge von NbZF und NbRED in den entsprechenden *Bs3*-transgenen *silencing*-Pflanzen, sowie in den Kontrollpflanzen. Drei Wochen nach Beginn des *silencing*-Experiments wurde von allen Pflanzen Blattmaterial geerntet, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend die Mengen von *SIZF* und *CaRED* durch eine qRT-PCR-Reaktion analysiert. Die Transkriptmenge von NbZF und NbRED in den Kontrollpflanzen wurden 100 % gesetzt. Die Zahlen symbolisieren verschiedene Pflanzen. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von vier biologischen Replikaten.

3.4.6.2 Ko-Expression von AvrBs3 und den Interaktoren in Paprika und *N. benthamiana*

Nachdem das Gen-silencing von NbZF und NbRED in *N. benthamiana* keine Aussage zur Relevanz der Interaktion für die AvrBs3-abhängige Hypertrophie bzw. HR erlaubte, sollte die *Agrobacterium*-vermittelte Ko-Expression der GFP-Fusionsproteine und c-Myc₄-AvrBs3 in ECW-30R-Paprikapflanzen erfolgen. Als Kontrollen dienten die Ko-Expression von GFP und c-Myc₄-GFP sowie die Ko-Expression von GFP und c-Myc₄-AvrBs3. Wie die Abbildung 22 A zeigt, war die durch AvrBs3-induzierte HR zwei bzw. drei Tage nach Ko-Expression von AvrBs3 und den

Ergebnisse

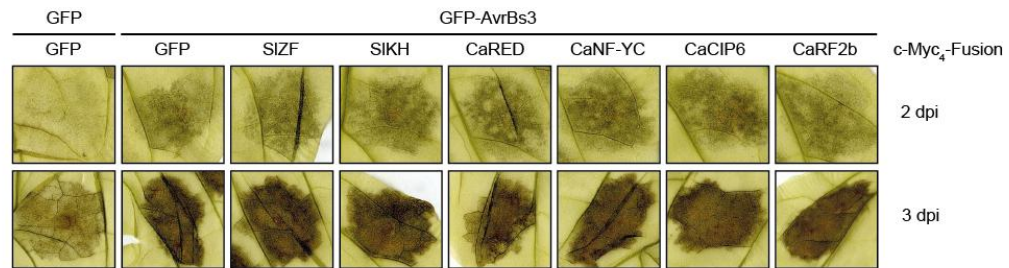
potentiellen Interaktoren SIZF, SIKH, CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 und CaRF2b mit der durch Ko-Expression von AvrBs3 und GFP induzierten HR zu vergleichen. Lediglich die Negativkontrolle, die Ko-Expression von GFP und GFP, induzierte keine HR.

Da makroskopisch keine phänotypischen Unterschiede der nach Ko-Expression von AvrBs3 und den potentiellen Interaktoren induzierten HR zu beobachten waren, wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Durch Amplifikation des Resistenzgens *Bs3* mit genspezifischen Oligonukleotiden erfolgte die Ermittlung der Genexpression mittels qRT-PCR. Spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation des konstitutiven Elongationsfaktors 1 α (EF1 α) dienen als Kontrolle für gleiche cDNA-Mengen. Die Induktion des *Bs3*-Transkripts nach Ko-Expression von AvrBs3 und GFP bzw. AvrBs3 und den potentiellen Interaktoren wurde mit der Negativkontrolle (GFP) verglichen. Wie die Abbildung 22 B zeigt, war im Vergleich mit der Ko-Expression von AvrBs3 und GFP keine signifikante Veränderung der *Bs3*-Transkriptmenge nach Ko-Expression von AvrBs3 und den potentiellen Interaktoren SIZF, SIKH, CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 und CaRF2b zu beobachten. Lediglich nach Ko-Expression von AvrBs3 und SIZF konnte in drei unabhängigen Experimenten eine leichte Erhöhung der *Bs3*-Transkriptmenge beobachtet werden (Abbildung 22 B). Ob die Fähigkeit von AvrBs3 nach Ko-Expression mit den potentiellen Interaktoren zu einer erhöhten transkriptionellen Induktion eines Reportergens führt, sollte im *Agrobacterium*-vermittelten GUS-Assay in *N. benthamiana* analysiert werden. Als Reporterkonstrukt diente das in Kapitel 3.1 beschriebene GUS-Reporterkonstrukt *UPA20-EBE_{AvrBs3}*. Nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer von AvrBs3, dem Reporterkonstrukt und den potentiellen Interaktoren SIZF, SIKH, CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 und CaRF2b in Blättern von *N. benthamiana*-Pflanzen erfolgte die Bestimmung der GUS-Aktivität, wobei die Aktivität von AvrBs3 nach Ko-Expression mit GFP auf 100 % gesetzt wurde. Wie die Abbildung 22 C zeigt, konnte nach der Ko-Expression von AvrBs3 und SIZF bzw. SIKH eine Erhöhung der GUS-Aktivität beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Nach der Ko-Expression von AvrBs3 und CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 bzw. CaRF2b war die GUS-Aktivität vergleichbar mit der Ko-Expression von AvrBs3 und GFP. Die Negativkontrolle, der Ko-Expression von GFP und GFP, zeigte keine GUS-Aktivität.

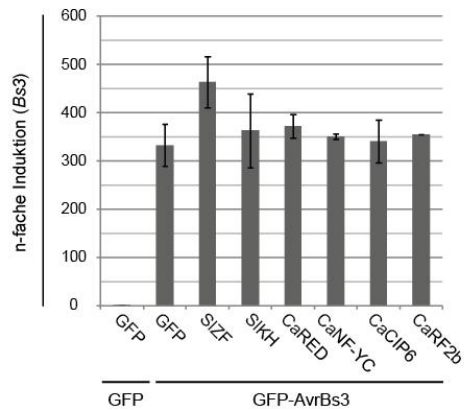
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine nicht signifikante, aber dennoch reproduzierbare Erhöhung des *Bs3*-Transkripts nach Ko-Expression von AvrBs3 mit SIZF und SIKH gezeigt werden konnte.

Ergebnisse

A



B



C

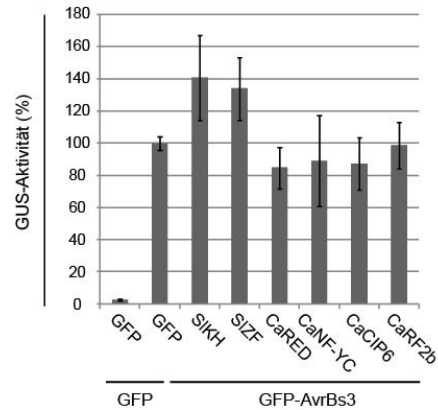


Abbildung 22: Induktion von *Bs3* und des GUS-Reportergens nach Ko-Expression AvrBs3 und potentiellen Interaktoren

(A) Analyse der Ausbildung der AvrBs3-abhängigen HR auf ECW-30R-Paprikapflanzen. Gezeigt ist die 2 bzw. 3 dpi nach *Agrobacterium*-vermittelter Ko-Expression von GFP und c-Myc₄-GFP, sowie c-Myc₄AvrBs3 und GFP, GFP-SIZF, -SIKH, -CaRED, -CaNF-YC, -CaCIP6, bzw. -CaRF2b induzierten HR in Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R. Die Blätter wurden 2 bzw. 3 dpi geerntet und in Ethanol gebleicht. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. (B) qRT-PCR-Analyse zur Analyse der Transkriptmenge von *Bs3* der in (A) durch *Agrobacterium*-vermittelte Ko-Expression in Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R inokulierten Bereiche. 24 Stunden nach Inokulation wurde Blattmaterial geerntet, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend die Mengen von *Bs3* durch eine qRT-PCR-Reaktion analysiert. Die n-fache Induktion der Transkriptmenge von *Bs3* nach *Agrobacterium*-vermittelten Ko-Expression von c-Myc₄AvrBs3 und GFP, GFP-SIZF, -SIKH, -CaRED, -CaNF-YC, -CaCIP6, bzw. -CaRF2b wurde mit der Ko-Expression von GFP und c-Myc₄-GFP verglichen. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. (C) *UPA20*-EBE_{AvrBs3}-vermittelte Reporteragenaktivierung durch AvrBs3 nach Ko-Expression mit GFP, GFP-SIZF, -SIKH, -CaRED, -CaNF-YC, -CaCIP6, bzw. -CaRF2b. Als Negativkontrolle diente die Ko-Expression von GFP und c-Myc₄-GFP. GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer des Reporterkonstrukts, und *gfp* bzw. *avrBs3* und den potentiellen Interaktoren bestimmt. Die Aktivität von c-Myc₄AvrBs3 mit GFP und wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

4. Diskussion und Ausblick

AvrBs3 und andere TAL-Effektoren (TALEs) sind Transkriptionsaktivatoren (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Boch und Bonas, 2010), welche in den letzten Jahren stark in das Interesse der Grundlagen- und angewandten Forschung gerückt sind. Die modulare TALE-Struktur und der DNA-Erkennungscode der *repeat*-Region (Boch *et al.*, 2009) erlauben mittels der *golden-gate*-Klonierungsstrategie (Engler *et al.*, 2008; Engler *et al.*, 2009; Cermak *et al.*, 2011; Geissler *et al.*, 2011), die Konstruktion von spezifischen DNA-Bindeproteinen. Je nach Bedarf können diese mit verschiedenen Proteinfunktionen, z. B. Nukleasen, kombiniert werden (Sun und Zhao, 2013). Obwohl zum Verständnis der Rolle von TALEs für die bakterielle Virulenz von *Xanthomonas* ssp. der Fokus auf der Identifizierung von Zielgenen lag (Boch *et al.*, 2014), ist wenig über den molekularen Mechanismus der Induktion von Zielgenen durch TALEs bekannt. In dieser Arbeit wurde die AR-Region des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Aktivität von AvrBs3 näher charakterisiert. Darüber hinaus wurden pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs3 identifiziert, die eine Rolle bei der Induktion von Zielgenen spielen könnten.

4.1. Die AR-Region von AvrBs3 ist an der Geninduktion beteiligt

Neben der zentralen *repeat*-Region tragen die NLS und die AD von AvrBs3 und Homologen zur Virulenz- und Avirulenzaktivität dieser Proteine bei (Yang und Gabriel, 1995; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Szurek *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die die *repeats* flankierende AR-Region von AvrBs3 ebenfalls an der Geninduktion beteiligt ist.

Einen Hinweis auf eine wichtige Rolle der AR-Region bei der Genaktivierung liefern die Untersuchungen an AR-Deletionsderivaten in AvrBs3. Während die Deletion der AS 2-46 der AR-Region in AvrBs3 in Reporter-gen-Aktivierungsstudien in *N. benthamiana* eine um 50% reduzierte Aktivität aufwies, zeigten die Deletionen der AS 45-155 sowie der gesamten AR-Region (AS 3-155) eine Aktivität von weniger als 10 %. Die Expression der AvrBs3-Derivate resultierte in einer reduzierten Hypertrophie bzw. HR in suszeptiblen ECW- bzw. resistenten ECW-30R-Paprikapflanzen.

4.1.1. Der Einfluss von Mutationen in der AR-Region auf die AvrBs3-Aktivität

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Aktivität der AvrBs3-AR-Deletionsderivate könnte eine Wechselwirkung der AR- mit der *repeat*-Region sein. Da der letzte *repeat* von AvrBs3 und Homologen nur aus 19 oder 20 AS besteht (Boch und Bonas, 2010), wurde vermutet, dass Teile der AR-Region diesen vervollständigen. Jedoch wurde in dieser Arbeit durch Deletion bzw. Vervollständigung des partiellen 18. *repeats* von AvrBs3 gezeigt, dass dieser nicht für die Aktivität von AvrBs3 essentiell ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für artifizielle TALEs publiziert (Zheng *et al.*, 2014). Ebenso zeigte das Einfügen eines *linkers* (GFP- bzw. His₆-Epitop) zwischen *repeat*- und AR-Region, dass AvrBs3 noch 50 % Aktivität hat (Anhang 1). Da die Fusion des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 mit der alternativen DNA-Bindedomäne BD_{Gal4} Aktivität in Reporter-genaktivierungsstudien zeigt, kann vermuten werden, dass es sich bei der AR-Region bzw. des gesamten C-terminalen Bereiches um eine eigenständige Region handelt.

Obwohl für AvrBs3 und Homologe ein imperfektes Leucin-Zipper-Motiv im Bereich der AR-Region postuliert wurde (Gabriel, 1997), zeigte sich, dass AS-Austausche in diesem Bereich, welche den typischen funktionellen Bereichen von Leucin-Zippern entsprechen, keinen Einfluss auf die Ausbildung der Hypertrophie bzw. HR auf suszeptiblen bzw. resistenten Paprikapflanzen haben (Kapitel 3.1.1). Das imperfekte Leucin-Zipper-Motiv in AvrBs3 hat somit keine funktionelle Relevanz für die Aktivität. Außerdem wird für den imperfekten Leucin-Zipper in AvrBs3 nicht die, für Leucin-Zipper, übliche durchgängige α -Helix vorhergesagt, die zur Dimerisierung des Proteins führt (Hakoshima, 2005). Dennoch scheint die AR-Region, die den imperfekten Leucin-Zipper in den ersten 56 AS enthält, einen Einfluss auf die Aktivität von AvrBs3 und Homologen zu haben. Ein Sequenzvergleich der ersten 56 AS der AR-Region von AvrBs3, Hax2 und anderen Homologen zeigt, dass sich die AS-Unterschiede hauptsächlich in den AS zwischen den Leucin-Heptaden befinden (Abbildung 23).

So konnte in eigenen Vorarbeiten an Chimären von AvrBs3 sowie für Chimären zwischen *avrBs3*-Homologen aus *Xoo* und *Xac* gezeigt werden, dass die AR-Region des C-terminalen Bereich die Aktivität von AvrBs3 und anderen TALEs beeinflusst (Ishihara *et al.*, 2003)(Kapitel 1.3.5).

Chimären im Vergleich zu der AvrBs3-Chimären aktiver (Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2). Lediglich die Hax2-Chimäre Hax2AR₁₋₄₅, in der neun AS ausgetauscht wurden, führte zu einer signifikanten Reduktion der Reporter-genaktivierung. Hax2 löst bei transienter Expression in *Arabidopsis thaliana* Col-0 nach acht bis neun Tagen eine violette Färbung der infizierten Blattbereiche aus, vermutlich durch Akkumulation von Anthocyanen (Kay, 2008; Boch *et al.*, 2009). Tatsächlich wurde die Hax2-abhängige Induktion von *PAP1* nachgewiesen, einem Regulator der Anthocyan-Synthese (Boch 2009). Ob die neun AS-Substitutionen in der Hax2-Chimäre Hax2AR₁₋₄₅ zu einer reduzierten Induktion von *PAP1* und somit zu einem verändertem Phänotyp in *A. thaliana* führen, könnte in zukünftigen Experimenten analysiert werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Funktion der AR-Region korrelieren mit publizierten Daten für artifizielle TALEs. So konnte gezeigt werden, dass 68 AS im C-terminalen Bereich von TALEs zur Induktion eines Reportergens in Humanzellen notwendig sind (Zhang *et al.*, 2011). Ebenso waren TALENs (TALE *nucleases*), die (einen C-terminalen Bereich von 47 bzw. 63 AS enthielten, in *genome editing*-Experimenten aktiver als TALENs mit kürzeren C-terminalen Bereichen (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011). Für die AvrBs3-Aktivität *in planta* sind jedoch 130 AS des C-terminalen Bereiches essentiell (Schreiber *et al.*, *in revision*). Kürzlich konnten drei Gene aus *Burkholderia rhizoxinica* (Bats) identifiziert werden, deren abgeleitete AS-Sequenz geringe Ähnlichkeit zu TALEs und einen sehr stark verkürzten N- und C-terminalen Bereich auf (Lange *et al.*, 2014). Bat1 kann sequenzspezifisch an eine vom TALE-Code vorhergesagten Zielesequenz binden, wobei Reporter-genaktivierungsstudien *in planta* zeigten, dass die C-terminalen 30 AS stark zur Aktivität von Bat1 beitragen (Lange *et al.*, 2014). Die in diesen Studien identifizierten Bereichen der C-terminalen Region von TALEs und TALENs, welche wichtig für die Aktivität dieser Proteine zu sein scheinen, korrelieren mit den in dieser Arbeit untersuchten Bereichen der AR-Region von AvrBs3.

4.1.2. Spielt die Struktur des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 und Homologen eine Rolle bei der Genaktivierung?

Auf welche Faktoren die reduzierte Aktivität der AvrBs3-Derivate mit AS-Substitutionen in der AR-Region beruht, ist unklar. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Sekundärstruktur im Bereich der AR-Region (Abbildung 24 B). Obwohl 3D-Strukturdaten des N-terminalen Bereichs von TALEs zeigten, dass die vier degenerierten *repeats* sequenzunabhängig die DNA binden (Gao *et al.*, 2012), gibt es diese für den C-terminalen Bereich bisher lediglich für 38 AS

des artifiziiellen TALEs dHax3 (Deng *et al.*, 2012). Die AS-Sequenz dieser 38 AS ist zu AvrBs3 identisch so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit die AS-Unterschiede in dieser Region einen Einfluss auf die Struktur des gesamten Proteins haben. Aufgrund von AS-Vergleichen des letzten vollständigen *repeats* von AvrBs3 mit den folgenden 68 AS wurden zwei degenerierte *repeats* für den an die *repeats* angrenzenden C-terminalen Bereich postuliert, welcher der AR-Region entspricht (de Lange *et al.*, 2014).

Möglicherweise gleitet AvrBs3 an der DNA entlang bis es seine Zielsequenz erreicht, die dann von den RVDs der *repeat*-Region Sequenz-spezifisch gebunden wird und zu einer kompakteren Struktur des Proteins führt (Schreiber und Bonas, 2014). Die AR-Region könnte maßgeblich zur Konformation des C-terminalen Bereiches beitragen, um die AD in die korrekte Position zur Rekrutierung der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie zu bringen, und eine Genaktivierung zu ermöglichen (Abbildung 24 A). Einen Aufschluss darüber könnte die noch ausstehende Analyse eines Ko-Kristalls des vollständigen C-terminalen Bereiches von AvrBs3 (oder Homologen) bzw. Derivaten und der entsprechenden DNA geben.

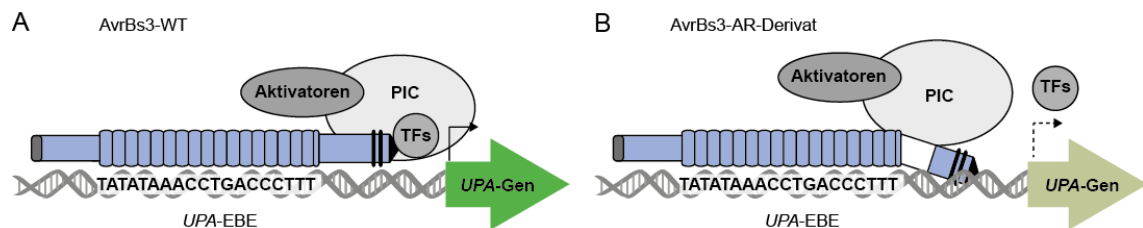


Abbildung 24: Modell des Einflusses der AR-Region von AvrBs3 auf die Induktion von UPA-Genen

(A) Schematische Darstellung der AvrBs3-abhängigen Induktion der Transkription von UPA-Genen. AvrBs3-WT bindet an das UPA-EBE und rekrutiert Proteinpartner der Wirtstranskriptionsmaschinerie bestehend aus Transkriptionsfaktoren (TFs), dem Präinitiationskomplex (PIC) bzw. Aktivatoren und induziert das UPA-Gen (grün). **(B)** Modell zum Einfluss der veränderten Sekundärstruktur der AR-Region in AvrBs3-Derivaten auf die Interaktion mit Proteinpartnern. Bereiche von AvrBs3 sind blau und veränderte weiß dargestellt. Durch eine mögliche veränderte Struktur des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 erfolgt eine geschwächte Interaktion mit Komponenten der Wirtstranskriptionsmaschinerie bzw. können einige Proteinpartner nicht mehr binden. Dennoch kann sich ein PIC ausbilden der zu einer reduzierten Geninduktion führt (hellgrüner und gestrichelter Pfeil).

4.1.3. Interagiert die AR-Region mit pflanzlichen Zielproteinen?

Eine alternative Erklärung für die Bedeutung der AR-Region für die Aktivität von TALEs könnte deren Interaktion mit pflanzlichen Proteinen darstellen, wobei die AR-Region eine Interaktionsplattform für pflanzliche Proteine darstellen könnte. Die beobachtete reduzierte Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten AR-Deletionsderivate könnte auf eine geschwächte Interaktion mit diesen zurückzuführen sein (Abbildung 24 B). Möglicherweise sind die AS-Unterschiede in der AR-Region zwischen AvrBs3 und Homologen, auf pflanzliche Interaktionspartner zurückzuführen, die in den verschiedenen Wirtspflanzen, wie Paprika, Tomate, *Citrus* und Reis unterschiedlich sind (Kay *et al.*, 2005).

4.1.3.1. Bisherige Modelle der Wirkungsweise von AvrBs3

Die EBE von AvrBs3 aktivierten *UPA*-Genen enthält eine TATA-Box (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009). Im *Bs3*-Promotor, welcher keine Basalexpression aufweist, variiert der Abstand zwischen der *UPA*-EBEAvrBs3 und dem Transkriptionsstart zwischen 41 Bp und 46 Bp (Römer *et al.*, 2009). Im Fall von *UPA20* befindet sich eine weitere TATA-Sequenz 37 Bp stromabwärts, die vermutlich der Transkriptionsaktivierung dient (Kay 2007).

AvrBs3 könnte, nach Verdrängung des TBP mit Untereinheiten von TFIID, den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) und anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, wie TFIIB, interagieren und so die Assemblierung des PIC ermöglichen. TFIIB vermittelt möglicherweise eine Stabilisierung des AvrBs3-DNA-Komplexes sowie eine Interaktion mit der RNA-Polymerase II und legt so vermutlich den Transkriptionsstart fest (Grünberg und Hahn, 2013). In diesem Fall könnte die beobachtete Verschiebung des Transkriptionsstarts von *UPA20* in Anwesenheit von AvrBs3 auf strukturelle Unterschiede zwischen AvrBs3 und TBP zurückzuführen sein (Kay, 2008). Eine Bindung des TBP und eine Stabilisierung des TBP-DNA-Komplexes wird auch durch TFIIA vermittelt (Grünberg und Hahn, 2013). TFIIA ist möglicherweise nicht generell an der Transkription beteiligt, sondern besitzt eine Promotorspezifität (Hoiby *et al.*, 2007). Interessanterweise vermittelt in Reis die Untereinheit TFIIAy5 des Transkriptionsfaktors TFIIA, welche von dem rezessiven Resistenzgen *xa5* codiert wird, die Erkennung des AvrBs3-Homologs PthXo7 (Iyer und McCouch, 2004; Jiang *et al.*, 2006).

Möglicherweise fungiert DNA-gebundenes AvrBs3 als regulatorischer Transkriptionsfaktor und fördert durch die Interaktion mit dem Mediator bzw. mit Komponenten der basalen

Transkriptionsmaschinerie die Assemblierung des PIC (Kay, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass der Großteil der Komponenten der Transkriptionsmaschinerie über die saure Aktivierungsdomäne rekrutiert wird (Kapitel 3.3.3.2 und Kapitel 3.4.5). Aktivierungsdomänen stimulieren die Assemblierung und Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie durch Protein-Protein-Interaktionen (Stringer *et al.*, 1990; Triezenberg, 1995; Melcher, 2000; Mittler und Meisterernst, 2003). Die Induktion der *UPA*-Gene erfolgt abhängig von der Aktivierungsdomäne von AvrBs3, wenn auch eine schwächere Induktion der Gene *UPA10*, *UPA14*, *UPA21* und *UPA25* unabhängig von der AD von AvrBs3 beobachtet wurde (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2009).

4.1.3.2. Die Interaktion der AR-Region mit bereits bekannten pflanzlichen Proteinen

Bei einer früheren Sichtung einer Tomaten-cDNA-Bibliothek mittels Hefe-2-Hybrid-System wurde bereits der Transkriptionsfaktor MERISTEM LAYER L1 aus *Arabidopsis thaliana* (ATML1, Aip8) identifiziert, der mit Bereich des Leucin-Zipper-Motivs bzw. der AR-Region von AvrBs3 interagiert (Gürlebeck, 2007). Der verwendete Köder (AS 808 – 1132) enthielt auch 78 AS der *repeat*-Region, aber nicht die AD von AvrBs3. Da eine Interaktion mit AvrBs3 in voller Länge nicht bestätigt werden konnte (Gürlebeck, 2007), wurde diese nicht weiter analysiert. Interessanterweise konnte in der Benedetti-Gruppe für den TALE PthA2 aus *Xac* in Hefe und *in vitro* mittels *GST-pulldown*-Experimenten eine Interaktion mit der CTD der RNA-Polymerase II aus *Citrus* (CsCTD) gezeigt werden (Domingues *et al.*, 2012). Die Interaktion scheint über die LRR (*leucine rich region*) vermittelt zu werden, welche der AR-Region von AvrBs3 entspricht. Allerdings konnte in der hier vorliegenden Arbeit keine Interaktion von AvrBs3 mit dem Homolog der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate (SICTD) gezeigt werden (Kapitel 3.3.1). Die CTD der RNA-Polymerase II aus *Citrus* und Tomate weist eine AS-Identität von 77 % auf (Anhang 2), die AR-Regionen von AvrBs3 und PthA2 sind identisch (Anhang 6). Die publizierten Ergebnisse lassen verwundern, da von einem konservierten Mechanismus der Geninduktion durch TALEs ausgegangen wird. Möglicherweise handelt es sich bei der Interaktion zwischen AvrBs3 und der SICTD der RNA-Polymerase II um eine schwache Interaktion, die zusätzlich durch einen weiteren und bisher unbekanntem Faktor vermittelt wird. Tatsächlich konnte für Interaktoren (z.B. CsCyp, CsTDX, CsUev) von verschiedenen PthAs gezeigt werden, dass diese sowohl mit sich selbst, als auch mit der CTD der RNA-Polymerase II aus *Citrus* interagieren

(Domingues *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2012). Ob AvrBs3 auch mit Homologen dieser Proteine interagiert könnte zukünftig getestet werden.

Es fiel mir allerdings bei der Literaturrecherche auf, dass in zwei Publikationen der Benedetti-Gruppe identische Abbildungen zur Dokumentation von GST-*pulldown* Experimenten für PthA4 und zwei verschiedenen pflanzlichen Proteinen gezeigt wurden (Souza *et al.*, 2012, Abbildung 1 B; Soprano *et al.*, 2013; Abbildung 1 D). Daher sind eventuell auch andere Ergebnisse (z.B. Domingues *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2012) kritisch zu betrachten.

4.2. Identifizierung von neuen pflanzlichen Interaktionspartnern von AvrBs3

Nachdem keine Interaktion von AvrBs3 mit dem Homolog der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate (SICTD) gezeigt werden konnte, wurden in dieser Arbeit neue Ansätze zur Identifizierung von AvrBs3-Interaktionspartnern durchgeführt. Mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek wurden kernlokalisierte pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs3 identifiziert, die an der Induktion der Genexpression, mRNA-Prozessierung/-Stabilität, DNA-Reparatur und Bindung von Nukleinsäuren beteiligt sind könnten. Mittels eines veränderten experimentellen Ansatzes wurden gezielt pflanzliche Proteine identifiziert, die mit dem vollständigen C-terminalen Bereiches von AvrBs3 interagieren.

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Köderproteinen für den C-terminalen Bereich von AvrBs3 (mit und ohne AD) wurde eine Abhängigkeit der Interaktion zwischen pflanzlichen Interaktoren mit AvrBs3 von der AD beobachtet werden. Die insgesamt 73 identifizierten spezifischen Kandidaten wiesen Homologie zu 57 Proteinen auf, von denen für 37 eine Homologie zu bekannten Proteinen ermittelt werden konnte (Anhang 4). Von diesen sind jedoch viele im Zytoplasma lokalisiert oder an Prozessen der Photosynthese beteiligt. Da in dieser Arbeit Komponenten der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie bzw. solche die an Chromatin-Remodelierungsprozessen beteiligt sein könnten identifiziert werden sollten, wurde dies nicht weiter verfolgt.

In Hinblick auf die Rolle der AR-Region waren besonders die identifizierten cDNA-Fragmente von Interesse, deren korrespondierende Proteine mit dem Köderprotein ohne AD interagierten. Von diesen 12 identifizierten Kandidaten wurde jedoch nur für einen Kandidaten eine Kernlokalisierung sowie eine Rolle bei der Genexpression vorhergesagt (Anhang 4). Hierbei handelt es sich um ein Protein mit Homologie zu Protein RED (RED = Arginin (R), Glutamin- (E) und Asparaginsäure (D)). Der zu Protein RED homologe Kandidat wurde ebenso

für den Köder mit der AD von AvrBs3 identifiziert. Weitere sieben cDNA-Fragmente deren korrespondierende Proteine, mit dem Köderprotein mit der AD von AvrBs3 identifiziert wurden, weisen Homologie zu einem Zinkfingerprotein (ZF), einem RNA-bindenden Protein mit einer KH-Domäne (KH), einer C-Untereinheit des Transkriptionsfaktors Y (NF-YC), einem CONSTANS-interagierendes Protein (CIP6) und einem bZIP-Transkriptionsfaktor RF2b (RF2b) auf. Proteine mit Homologie zu einer Proteinkinase (PK) und einem Homöobox-Protein (HBP) wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von M. Warlich untersucht. Allerdings kann bisher keine Aussage zu einer Interaktion dieser beiden potentiellen Interaktoren mit AvrBs3 getroffen werden. Für die sechs, in dieser Arbeit, untersuchten Kandidaten SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6 und CaRF2b wurde eine Kernlokalisierung in Zellen von *N. benthamiana* bestätigt (Kapitel 3.4.2). Bis auf CaRF2b konnte für alle Kandidaten in voller Länge eine Interaktion mit AvrBs3 (AS 153 – 1164) in Hefe bestätigt werden (Kapitel 3.4.4).

Da sich BiFC zur Bestätigung der Interaktionen *in planta* als ungeeignet erwies, wurde die Interaktion *in planta* mittels KoIP überprüft. Dadurch wurden die Interaktionen zwischen AvrBs3 und SIZF, CaRED bzw. CaCIP6 bestätigt. Für SIKH, CaNF-YC und CaRF2b kann eine Interaktion dennoch nicht ausgeschlossen werden, da die Bestätigung der Interaktion *in planta* generell schwierig war. Möglicherweise handelt es sich in letzteren Fällen um schwache Interaktionen, die in weiterführenden Experimenten mittels *Cross-linking* nachgewiesen werden könnten. Da in bisherigen GST-pulldown-Analysen die Kandidaten lediglich schwach exprimiert waren, kann bisher keine Aussage getroffen werden, ob es sich um direkte Interaktionen handelt. Eine verbesserte Expression konnte auch nicht durch die Verwendung anderer N- bzw. C-terminaler Epitope erzielt werden. Dass die AD von AvrBs3 tatsächlich für die Interaktion von AvrBs3 mit SIZF, CaRED und CaCIP6 benötigt wird, wurde durch Analysen in Hefe und *in planta* gezeigt.

In dem in dieser Arbeit verwendeten biochemischen Ansatz, bei dem in *E. coli* rekombinant hergestelltes und durch eine Affinitätsmatrix immobilisiertes AvrBs3 mit Zellkernextrakt aus Blattmaterial von *S. lycopersicum* inkubiert wurde, gelang es nicht Interaktionspartner zu identifizieren, da AvrBs3 trotz Verwendung von Protease-Inhibitoren abgebaut wurde. Dieser Ansatz könnte jedoch optimiert werden, z.B. durch die Expression von AvrBs3 *in planta* (Paprika oder Tomate) und *cross-linking*. Darüber könnten auch schwache Interaktionen fixiert werden, was die nachfolgende Ko-Purifikation pflanzlicher Interaktionspartner mit AvrBs3 erleichtern könnte.

Weitere potentielle Interaktoren von AvrBs3 wurden mittels NAPPA (*Nucleic Acid Programmable Protein Array*) aus *A. thaliana* identifiziert (T. Schreiber, und U. Bonas in

Kooperation mit J. Ecker und J. Yazaki; Salk Institute, USA; unveröffentlichte Daten). Unter den Kandidaten waren Proteine mit Homologie zu der Mediator-Untereinheit 27 (AtMed27), einem Zink-Finger-Protein (AtZF-CCCH) und einem bZIP-Transkriptionsfaktor (AtbZIP67). Allerdings gelang es bisher lediglich für AtZF-CCCH, eine Interaktion mit AvrBs3 *in planta* zu zeigen (T. Schreiber, M. Warlich und U. Bonas; unveröffentlichte Daten).

Obwohl kernlokalisierte Interaktoren für AvrBs3 identifiziert wurden, die an der Aktivierung der Transkription von Genen beteiligt sind (Tabelle 6), konnte bisher keine direkte Interaktion mit Komponenten des PIC gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob Komponenten wie das TBP, TFIIA, TFIIB, TAFs oder Untereinheiten des Mediators mit AvrBs3 interagieren, könnten die entsprechenden Proteine aus Tomate, Paprika oder *Arabidopsis* für die Analysen verwendet werden und die Analysen *in vitro*, *in planta* oder in Hefe erfolgen.

4.2.1. Die AD von AvrBs3 ist nicht essentiell für die Interaktion mit RED in Hefe

Obwohl, für die meisten der in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten, die AD von AvrBs3 benötigt wird, konnte für CaRED in Hefe auch eine Interaktion mit den übrigen AS des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 (ohne AD) gezeigt werden. Da diese Interaktion von CaRED jedoch *in planta* nicht mittels KoIP bestätigt werden konnte (Kapitel 3.4.5), handelt es sich vermutlich um eine schwache Interaktion. Die Interaktion in Hefe zwischen CaRED und dem C-terminalen Bereich von AvrBs3 ohne AD, fand nur auf Selektivmedium mit niedriger Stringenz statt, während die Interaktion mit dem gesamten C-terminalen Bereich von AvrBs3, auch bei hoher Stringenz zu beobachten war. Dies deutet auf eine starke Interaktion von CaRED mit der AD, aber auf eine schwache Interaktion mit dem übrigen C-terminalen Bereich von AvrBs3 hin. Ob CaRED tatsächlich indirekt mit der AR-Region interagiert, ist unklar. Das AR-Deletionskonstrukt wurde in Hefe nicht stabil exprimiert, jedoch könnte in Hefe die Interaktion zwischen CaRED und AvrBs3 in voller Länge, sowie Derivaten mit einer Deletion der AD oder AR-Region, erfolgen. Ebenso wäre es möglich mittels Fixierung eines AvrBs3-Komplexes *in planta* weitere Komponenten, die an einer Interaktion beteiligt sind, zu identifizieren. Inwieweit AS-Unterschiede in der AR-Region von AvrBs3 und Hax2 eine Rolle bei der Interaktion mit pflanzlichen Zielproteinen spielen, kann erst genauer untersucht werden, wenn direkte Interaktoren der AR-Region von AvrBs3 identifiziert werden.

Für Interaktoren von PthAs aus *Xac* wurde gezeigt, dass die Interaktion mit pflanzlichen Proteinen sowohl über die *repeat*-Region, als auch die AR-Region stattfindet (Domingues *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2012).

4.2.2. Neu identifizierte pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs3 könnten an Mechanismen der Genexpression beteiligt sein

Die in dieser Arbeit erstmals identifizierten Interaktoren von AvrBs3 weisen Homologie zu Proteinen auf, die an der Induktion der Genexpression, der mRNA-Prozessierung/-Stabilität, der Chromatin-Modifikation und Bindung von Nukleinsäuren beteiligt sind (Tabelle 6).

Letzteres könnte durch den AvrBs3-Interaktor SIZF erfolgen. Dieses Protein enthält potentielle multiple RRM-(*RNA recognition motif*)-Domänen. RRMs sind RNA-Bindemotive, die die Genexpression post-transkriptionell regulieren (Maris *et al.*, 2005). Interessanterweise können RRMs nicht nur RNA-, sondern auch Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Maris *et al.*, 2005). Proteine mit RRMs können entweder nur eine RNA-Bindemotive, nur eine Protein-Protein-Interaktionsfunktion oder beide Funktionen aufweisen. Welches RRM dabei für welche Funktion verantwortlich ist, ist unbekannt (Maris *et al.*, 2005). Der Interaktor SIZF könnte also sowohl eine Bindung an Nukleinsäuren, als auch eine Interaktion mit Proteinen vermitteln. CaCIP6 enthält ein potentielles PHD-(*plant homeodomain*)-Finger-Motiv. PHD-Finger sind kleine Domänen von etwa 50 – 80 AS mit einem Zink-Bindemotiv und typisch für Chromatin-assoziierte Proteine (Sanchez und Zhou, 2011). Vermittelt durch den PHD-Finger erfolgt die Bindung an Histon H3, welches an verschiedenen Lysinen trimethyliert sein kann (Sanchez und Zhou, 2011). Ob eine durch Histon-Modifikationen-vermittelte Interaktion mit PHD-Fingern in einer Genaktivierung resultiert, ist bisher nicht beschrieben (Sanchez und Zhou, 2011). CIP6 wurde in Hefe-2-Hybrid-Sichtungen als potentieller Interaktor des Transkriptionsfaktors CONSTANS identifiziert, bisher konnte eine Interaktion aber nicht gezeigt werden (Ben-Naim *et al.*, 2006).

AvrBs3-Interaktoren scheinen neben einer Beteiligung an Mechanismen der Geninduktion auch an der mRNA-Prozessierung beteiligt zu sein. Ein Hinweis dafür ist die Homologie von CaRED mit Domänen von Protein RED, welches mit dem Spleißosom assoziiert (Neubauer *et al.*, 1998). RED wurde wegen seiner hohen Anzahl der AS Arginin (R), Glutamin- (E) und Asparaginsäure (D) bezeichnet (Assier *et al.*, 1999). Eine genaue Funktion von RED ist bisher

unbekannt. CaRED könnte eine Assoziation der mRNA mit dem Spleißosom vermitteln und so die Prozessierung (z. B. 5'-*capping* und Spleißen) fördern.

Ein weiteres potentielles RNA- bzw. DNA-bindendes Protein stellt SIKH aus Tomate dar, welches Homologie zu KH-Domänen aufweist. KH-Domänen binden RNA oder einzelsträngige DNA und kommen in Proteinen vor, die an der Regulation von Transkription und Translation beteiligt sind (Valverde *et al.*, 2008). Weiterhin können sie, wie auch in SIKH, mehrfach innerhalb eines Proteins auftreten und gewährleisten so eine größere Spezifität und Affinität für eine Bindung an Nukleinsäuren (Valverde *et al.*, 2008).

CaNF-YC weist Homologie zur C1-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-Y auf, der an CCAAT- bzw. CAAT-Boxen bindet (Dolfini *et al.*, 2012). Diese *cis*-aktivierenden Elemente kommen in ~ 25 % von eukaryotischen Promotoren vor (Dolfini *et al.*, 2012). NF-Y ist auch als CCAAT-Box-Faktor (CBF) oder HAP-(*heterotrimeric heme activator protein*)-Komplex bekannt (Mantovani, 1999) und besteht aus den drei Untereinheiten NF-YA (HAP2; CBF-B), NF-YB (HAP3; CBF-A), und NF-YC (HAP5; CBF-C). Es wurde gezeigt werden, dass NF-Y mit dem TBP und weiteren TAFs assoziiert (Bellorini *et al.*, 1997; Frontini *et al.*, 2002) und die RNA-Polymerase II rekrutiert (Kabe *et al.*, 2005). CAAT-Boxen befinden sich typischerweise als einzelnes Element in der *forward*- oder *reverse*-Orientierung in -60 und -100 Bp-Regionen (Mantovani, 1999). Potentielle CAAT-Boxen kommen im *UPA20*- und *Bs3*-Promotor *upstream* des *UPA*-EBE (Anhang 7) und dem in dieser Arbeit verwendeten 74 Bp-Fragment des *Bs4*-Promotors vor (Schornack *et al.*, 2005). Analysen der Hax3-Box in Kombination mit verschiedenen Promotorregionen des *Bs4*-Promotors zeigten eine starke Hax3-abhängige Induktion des GUS-Reportergens, wenn sich im Promotorbereich unter anderem eine CAAT-Box befand (Scholze, 2011).

Weitere interessante potentielle Interaktoren stellen die in dieser Arbeit identifizierten Proteine mit Homologie zu einer Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase (SIPK) und einem Protein mit Homöobox-Domäne (SIHBP) dar. Die Proteinphosphorylierung ist ein sehr wichtiger post-translatonaler Kontrollmechanismus in der Signaltransduktion der Zelle und ist z.B. an der Regulation der Aktivität von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren beteiligt (Shi, 2009). Eine Serin-Phosphorylierung findet auch an der CTD der RNA-Polymerase II während der Transkription statt und leitet die Elongation sowie die Rekrutierung von verschiedenen Proteinen ein, die an der Transkription und mRNA-Prozessierung beteiligt sind (Phatnani und Greenleaf, 2006). Homöobox-Domänen, wie in SIHBP kommen in DNA-Bindedomänen von Transkriptionsfaktoren vor (Holland, 2012). Möglicherweise vermittelt die Interaktion von AvrBs3 mit SIHBP eine DNA-Bindung and Stabilisierung des Initiationskomplexes.

4.2.3. Die Bedeutung der Interaktoren für die Aktivität von AvrBs3

Obwohl die Interaktion von AvrBs3 mit SIZf, CaRED und CaCIP6 in Pflanze gezeigt wurde, konnte nach *silencing* von *SIZF* und *CaRED* in *N. benthamiana* kein sichtbarer Einfluss auf die durch AvrBs3-induzierte Hypertrophie bzw. HR in *N. benthamiana*- bzw. *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen gezeigt werden. Allerdings erfolgte das *silencing* von *NbZF* und *NbRED* nur unzureichend, da noch etwa 50 % der jeweiligen Transkriptmengen in den *silencing*-Pflanzen detektiert werden konnten. Da die *silencing*-Fragmente spezifisch gewählt wurden, sollten keine Homologen, sondern nur der spezifische Interaktor vom *silencing* betroffen sein. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine gehören ähnlichen funktionellen Gruppen an. So sind z.B. RRM-Motive wie in SIZF sehr abundant und kommen sowohl in Eukaryoten, wie auch in Prokaryoten und Viren vor (Maris *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Homologe mit ähnlichen Funktionen den Verlust eines einzelnen Proteins kompensieren und so kein *silencing*-Effekt zu beobachten ist.

Außerdem wurden die Interaktoren SIZF, SIKH, CaRED, CaNF-YC, CaCIP6, CaRF2b mit AvrBs3 in Blättern von resistenten Paprika über-exprimiert. Das *Bs3*-Transkript war nicht signifikant, aber dennoch reproduzierbar nach Ko-Expression von AvrBs3 mit den Interaktoren SIZF und SIKH erhöht. Ebenso konnte nach Ko-Expression von AvrBs3 und diesen beiden Interaktoren eine nicht signifikante, aber erhöhte, Aktivierung eines AvrBs3-responsiven Promotors beobachtet werden. Ob die beiden Interaktoren einen Einfluss auf die Virulenzaktivität von AvrBs3 haben, könnte in zukünftigen Experimenten, z.B. durch Analyse des *UPA20*-Transkriptes, nach Ko-Expression von AvrBs3 mit den Interaktoren SIZF und SIKH in suszeptiblen Paprikapflanzen untersucht werden. Möglicherweise ist jedoch ein Effekt auf die durch AvrBs3-induzierte Genexpression erst nach Ko-Expression mehrerer Interaktoren mit AvrBs3 zu beobachten. Dies könnte zu einer stärkeren Induktion von *UPA20* bzw. *Bs3* in suszeptiblen bzw. resistenten Paprikapflanzen führen.

Da TALEs wahrscheinlich einen konservierten Mechanismus der Geninduktion aufweisen, könnten die in der vorliegenden Arbeit neu identifizierten Interaktoren auch für die Aktivität von Hax2 von Bedeutung sein. Wie oben beschrieben löst Hax2 bei transienter Expression in *Arabidopsis thaliana* Col-0 nach acht bis neun Tagen eine violette Färbung der infizierten Blattbereiche aus (Kay, 2008; Boch *et al.*, 2009). Die Relevanz der neu identifizierten Interaktoren für die Hax2-Aktivität könnte in weiterführenden Experimenten in entsprechenden T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis* untersucht werden. In diesen könnte ebenso die AvrBs3-Aktivität im GUS-Reporterassay ermittelt und mit *Arabidopsis*-WT

verglichen werden. Mittels Hefe-1-Hybrid-Untersuchungen wurde gezeigt, dass AvrBs3 die UPA20-Box in Hefe bindet und die Induktion eines Reportergens induziert (Kay *et al.*, 2009). Ausgehend davon könnte ein weiterer Ansatz durch Analyse von temperatursensitiven Hefemutanten für Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erfolgen.

Für andere Pathogene wurde bereits der Einfluss von pflanzlichen Interaktoren auf die Virulenz gezeigt, welche ähnliche Motive, wie die in dieser Arbeit identifizierten Proteine, aufweisen. So modifiziert der Typ-III-Effektor HopU1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 die RNA-Bindedomäne des Spleißfaktors GRP7 in *A. thaliana*, was zu einer erhöhten Suszeptibilität der Pflanze führt (Jeong *et al.*, 2011; Göhre *et al.*, 2013). In *Ustilago maydis* ist das RNA-Bindeprotein KHD4, welches KH-Domänen aufweist, essentiell für dessen Pathogenität (Vollmeister *et al.*, 2009) und der Transkriptionsfaktor NF-Y fördert die Knöllcheninfektion in *Medicago truncatula* (Combiere *et al.*, 2006).

Tatsächlich steuern neben TALEs auch andere bakterielle Effektoren den pflanzlichen Zellkern an und manipulieren die Wirtstranskription (Canonne und Rivas, 2012). Der Typ-III-Effektor XopD aus *Xcv* interagiert mit dem Transkriptionsfaktor MYB30 aus *Arabidopsis*, wodurch die Pflanzenabwehr supprimiert wird (Canonne *et al.*, 2010; Canonne *et al.*, 2011). Ebenso supprimiert der Effektor HopAI1 aus *Pseudomonas syringae* die Abwehr-Signaltransduktion durch die Inaktivierung pflanzlicher MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) (Zhang *et al.*, 2007). Eine direkte Rolle von Effektoren pflanzlicher Proteine als Transkriptionsfaktoren ist neben TALEs nur für die Typ-III-Effektoren HsvG und HsvB aus dem phytopathogenen Bakterium *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* (*Pag*) beschrieben, das für die spezifische Gallenbildung in Schleierkraut bzw. Rübe notwendig ist (Nissan *et al.*, 2006). Für HsvG wurde die Bindung an den Promotor und die spezifische Induktion des Zielgens *HSVGT* aus der Wirtspflanze gezeigt. HSVGT weist typische Motive von Transkriptionsfaktoren auf, wie ein bipartides Kernlokalisierungssignal, Zink-Finger und Leucin-Zipper-Motive (Nissan *et al.*, 2012). Möglicherweise handelt es sich bei HSVGT um einen Transkriptionsfaktor, der die Gallenbildung in Schleierkraut hervorruft (Chalupowicz *et al.*, 2006).

4.2.4. Pflanzliche Interaktoren von AvrBs3 und Homologen weisen Homologie zu Proteinen mit ähnlichen Funktionen auf

Parallel zu dieser Arbeit wurden durch Hefe-2-Hybrid-Sichtungen der AvrBs3-Homologen PthA2, 3 und 4 aus *Xac* und einer *Citrus*-Bibliothek pflanzliche Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert (Domingues *et al.*, 2010; de Souza *et al.*, 2012; Domingues *et al.*, 2012; Soprano *et al.*, 2013). Diese Interaktoren weisen Homologie zu Proteinen auf, die ähnlich zu den hier analysierten AvrBs3-Interaktoren, an Mechanismen der Proteinfaltung, dem Kerntransport, der Kontrolle der Transkription, der DNA-Reparatur und RNA-Stabilisierung bzw. -modifizierung beteiligt sind. Bei den AvrBs3- und PthA-Interaktoren handelt es sich nicht um Orthologe, vielmehr weisen sie funktionell ähnliche Proteindomänen auf. Alle bisher bestätigten kernlokalisierten Interaktoren von AvrBs3 und PthAs, die durch Interaktion in Hefe, *in planta* oder in GST-pulldown-Analysen bestätigt wurden, sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Der in dieser Arbeit identifizierte AvrBs3-Interaktor CaNF-YC und der PthA-Interaktor CsHAP3 sind unterschiedliche Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF-Y. Weiterhin konnte für den PthA-Interaktor CsHMG ähnliche Motive wie für CaCIP6 und eine Bindung an DNA gezeigt werden (Tabelle 6)(de Souza *et al.*, 2012). Der AvrBs3-Interaktor SIZF und die PthA-Interaktoren CsRRMP1, CsPABP1 und CsPABP2, enthalten multiple RRM's (de Souza *et al.*, 2012). Interessanterweise wurde für die meisten PthA-Interaktoren gezeigt, dass diese miteinander interagieren und vermutlich einen Multi-Protein-Komplex bilden, der an Prozessen wie Chromatin-Remodellierung und Reparatur, Kontrolle der Transkription sowie mRNA-Stabilität /-Modifikation beteiligt ist (de Souza *et al.*, 2012). Einer dieser PthA-Interaktoren ist CsPCBP, ein Poly(C)-bindendes Protein, welches wie einer der AvrBs3-Interaktoren KH-Domänen aufweist (de Souza *et al.*, 2012). Ob die AvrBs3-Interaktoren ebenso miteinander interagieren bzw. Bestandteile eines Multi-Protein-Komplexes sind, wie er für PthA-Interaktoren postuliert wurde, sollte zukünftig untersucht werden.

Obwohl, wie bereits zuvor beschrieben, in der vorliegenden Arbeit keine Interaktion zwischen AvrBs3 und der CTD der RNA-Polymerase II aus Tomate gezeigt werden konnte, interagiert die CTD der RNA-Polymerase II aus *Citrus*, sowohl mit PthAs als auch mit Interaktionspartnern, wie CsCyp, CsTdx und CsUev (Tabelle 6)(Domingues *et al.*, 2012). Für das potentielle Cyclophylin CsCyp, welches vermutlich einen negativen Regulator der RNA-Polymerase II darstellt, wurde gezeigt, dass *Xac* nach *silencing* in *Citrus*-Pflanzen stärkere Zitruskrebssymptome auslöste (Domingues *et al.*, 2012). Diese verstärkte Ausbildung von Symptomen konnte auch nach

silencing von CsMAF1 beobachtet werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen Repressor der RNA-Polymerase III (Soprano *et al.*, 2013).

Tabelle 6: Kernlokalisierte Interaktionspartner von AvrBs3 und PthAs und ihre biologische Funktion

Protein	Akzessionsnummer	Merkmale	Vorhergesagte biologische Funktion	Referenz
AvrBs3-Interaktionspartner				
Calpα ^{a,b,c}	AAK38726.1	Armadillo-repeats	Import von Proteinen in den Nukleus	(Szurek <i>et al.</i> , 2001; Gürlebeck, 2007)
SIZF ^{a,c}	XP_004235720.1	RING-, RRM-, Zf-UBP-Domäne	Bindung von RNA, mRNA-Stabilität/-Modifikation	diese Arbeit
SIKH ^a	XP_004244971.1	RNA-Bindung, KH-Domäne	Bindung von Nukleinsäuren, mRNA-Modifikation	diese Arbeit
CaRED ^{a,c}	XP_004242897.1	RED-repeats, DNA-Bindung	Funktion unbekannt, Assoziation mit dem Spleißosom	diese Arbeit
CaNF-YC ^a	XP_004236362.1	NF-Y-Domäne, DNA-Bindung	Aktivierung der Transkription, Untereinheit des NF-Y-Komplexes	diese Arbeit
CaCIP6 ^{a,c}	XP_004243557.1	PHD-Finger, SMC-Domäne	Chromatin-Segregation; DNA Reparatur/Rekombination	diese Arbeit
AtZF-CCCH ^c	AT5G66270	CCCH-Zink-Finger	Zinkionen-Bindung, Bindung von Nukleinsäuren	M. Warlich und U. Bonas, unveröffentlicht
PthA-Interaktionspartner				
CsUev ^{a,b}	C8CP48	UBCc-Domäne	Post-translationale Modifikation	(Domingues <i>et al.</i> , 2010)
CsTDX ^{a,b}	ACX37093.1	TRX-, TPR-Domäne	Post-translationale Modifikation	(Domingues <i>et al.</i> , 2010)
CsCyp ^{a,b}	ACX37092.1	PPlase-Domäne	Negativer Regulator der RNA-Polymerase II	(Domingues <i>et al.</i> , 2010)
CsUbc13 ^{a,b}	C9EJV8	UBCc-Domäne	Ubiquitin-vermittelte Proteindegradierung	(Domingues <i>et al.</i> , 2010)
CsCTD ^{a,b,c}	XP_006467027	YSPTSPS-repeats	Aktivierung der Transkription, Elongation und Termination, Rekrutierung von Ko-Faktoren	(Domingues <i>et al.</i> , 2012)
CsHMG ^{a,b}	JN600529	DNA-Bindung; HMG-Box	Chromatinremodellierung, DNA-Reparatur, Kontrolle der Transkription	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)

CsPABP1^{a,b}	JN556038	RNA-Bindung; RRMs	mRNA-Stabilität und -Modifikation	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsPABP2^a	JN600528	RNA-Bindung; RRMs	mRNA-Stabilität und -Modifikation	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsPCBP^a	JN600525	RNA-Bindung; KH-Domäne	mRNA-Prozessierung/- Spleißen, Aktivierung der Translation	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsTRAX^{a,b}	JN600526	Translin- Domäne	RNA-induziertes Gen- <i>silencing</i> , DNA Reparatur/Rekombination	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsSMC^{a,b}	JN600522	SMC/-Domäne	Chromatin-Segregation; DNA Reparatur/Rekombination	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsVIP2^{a,b}	JN600527	CCR4-NOT- Domäne	Chromatinremodelierung; DNA-Integrierung	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsRRMP1^{a,b}	JN600523	RNA-Bindung; RRMs	mRNA- Stabilisierung/- Modifikation	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsHAP3^{a,b}	JN600524	NF-Y-Domäne, DNA-Binding	Aktivierung der Transkription	(de Souza <i>et al.</i> , 2012)
CsMAF1^{a,b,c}	JN600521.1	Maf1-Signatur	Negativer Regulator der RNA-Pol-III, Rekrutierung von TFIIB	(de Souza <i>et al.</i> , 2012; Soprano <i>et al.</i> , 2013)

RRM: *RNA recognition motif*; Znf-UBP: Zink-Finger Ubiquitin-Bindung; KH: hnRNP K Homologie; NF-Y: *nuclear factor Y*; PHD: *plant homeodomain*; SMC: *structural maintenance of chromosomes*; UBCc: *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*; TRX: Thioredoxin; TPR: Tetratricopeptid; PPlase: Cyclophilin-Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase; HMG: *high motility group*; CCR4: *C-C chemokine receptor type 4*; Interaktion gezeigt durch: ^a Hefe-2-Hybrid, ^b GST-pulldown, ^c in planta KoIP

4.3. Erweitertes Modell des molekularen Mechanismus der Geninduktion durch AvrBs3

Das zuvor aufgestellte Modell des molekularen Mechanismus der Induktion von *UPA*-Genen durch AvrBs3 (Abbildung 25 A)(Kay, 2008) kann durch die Identifizierung neuer pflanzlicher Interaktionspartner erweitert werden (Abbildung 25 B). So interagiert AvrBs3 vermutlich mit einer Vielzahl an pflanzlichen Proteinen, die wiederum Proteine rekrutieren, welche an der Aktivierung der Transkription, sowie der mRNA-Prozessierung beteiligt sind. Die Bindung der Interaktoren durch AvrBs3 erfolgt vermutlich über deren Aktivierungsdomäne sowie den Bereich der AR-Region. Durch Einbeziehung der hier neu identifizierten pflanzlichen Proteine, deren Interaktion mit AvrBs3 in Pflanze gezeigt wurde, lässt sich der molekulare Mechanismus wie folgt erklären:

In einem ersten Schritt erfolgt die Bindung von AvrBs3 an seine Zielsequenz, z.B. die *UPA20*-EBE (Abbildung 25 A). In diesem Fall verdrängt AvrBs3 wahrscheinlich das TBP, welches dann eine 37 Bp-stromabwärts gelegene TATA-Box bindet. Das TBP, welches Bestandteil des Transkriptionsfaktors TFIID ist, rekrutiert TFIIA und TFIIB, welche den Komplex stabilisieren, und führt die RNA-Polymerase II, unterstützt durch TFIIIF, heran (Kandiah 2014). TFIIE stabilisiert diesen *core*-Komplex und durch TFIIH wird die DNA am Promotor geöffnet (Kandiah 2014) (Abbildung 25 B). AvrBs3 interagiert mit CIP6, welches das Histon H3 binden und modifizieren könnte, was zu einer Öffnung der Chromatin-Struktur führt und die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie der Transkriptionsmaschinerie erlaubt, und so die Transkription begünstigt. Durch die Bindung von ZF durch AvrBs3 könnte die Assemblierung und die Stabilität des PIC über Rekrutierung weiterer Komponenten oder die Bindung des Komplexes an die DNA erfolgen. Im nächsten Schritt wird durch die RNA-Polymerase II die Elongation und Termination eingeleitet und die mRNA synthetisiert. ZF könnte diese ebenso, vermittelt über RNA-Bindedomänen, binden und stabilisieren, sowie deren Prozessierung (5' *capping*, 3' Polyadenylierung, *splicing* usw.) fördern. Durch Interaktion von AvrBs3 mit RED erfolgt die Assoziation des Protein-mRNA-Komplexes mit dem Spleißosom und eine Prozessierung der mRNA.

AvrBs3 scheint durch Rekrutierung von Proteinen, die an der Kontrolle der Transkription, Chromatin-Remodellierung und der mRNA-Prozessierung beteiligt sind, das Transkriptionslevel von Virulenzzielen positiv zu beeinflussen. Da TALEs wahrscheinlich einen konservierten Mechanismus der Geninduktion aufweisen, ist das Modell in Abbildung 25 B vermutlich auf andere TALEs übertragbar.

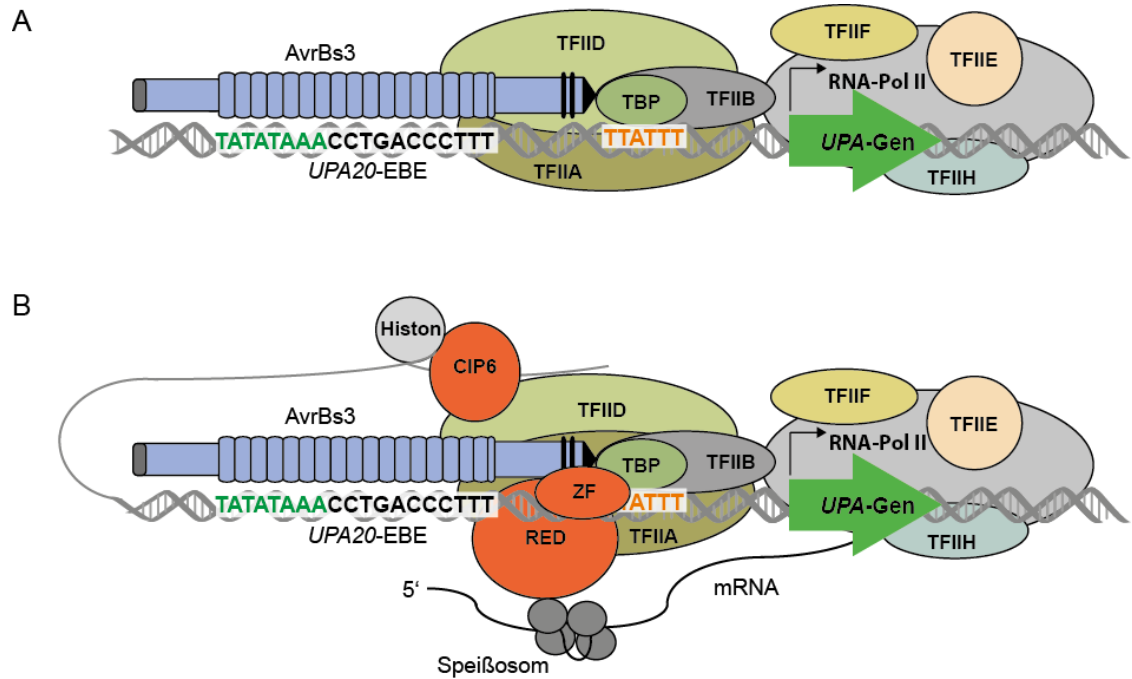


Abbildung 25: Modell der molekularen Wirkungsweise von AvrBs3 am Beispiel der UPA20-Induktion

(A) Bisheriges Modell der UPA20-Gen-Induktion durch AvrBs3. AvrBs3 bindet das UPA20-EBE und verdrängt das TBP. Da die TATA-Box (grün) Teil der AvrBs3-Bindesequenz ist, ist sie für die TBP-Bindung blockiert. Das TBP bindet daher an ein stromabwärts gelegenes TATA-Element (orange). TFIIA stabilisiert den Komplex und nachfolgend binden die restlichen TFIID-Komponenten, TFIIB, die RNA-Polymerase II im Komplex mit TFIIF, sowie TFIIE und TFIIH.

(B) Erweitertes Modell der UPA20-Gen-Induktion durch AvrBs3. AvrBs3 bindet wie unter (A) durch Verdrängung des TBP das UPA-EBE und rekrutiert den Präinitiationskomplex (PIC). Neu identifizierte Interaktoren vermitteln die Interaktion von AvrBs3 mit dem PIC und Nucleinsäuren. CIP6 bindet und modifiziert das Histon H3. ZF bindet und interagiert vermittelt durch RRM-Domänen mit der DNA oder weitere Komponenten des PIC und stabilisiert den Komplex. Durch Interaktion mit RED erfolgt die Assoziation des Protein-mRNA-Komplexes mit dem Speißosom und eine Prozessierung der mRNA. Das Modell wurde verändert nach Kay, 2008.

Literaturverzeichnis

- Abramovitch R. B., Anderson J. C. and Martin G. B.** 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 601-11.
- Abramovitch R. B., Janjusevic R., Stebbins C. E. and Martin G. B.** 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2851-6.
- Agrios G. N.** (1997). How pathogens attack plants. *Plant pathology.* San Diego, Academic Press: 63-82.
- Agrios G. N.** (2005). *Plant Pathology.* San Diego, Academic Press.
- Alfano J. R. and Collmer A.** 2004. Type III secretion effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology.* **42**: 385-414.
- Antony G., Zhou J., Huang S., Li T., Liu B., White F. and Yang B.** 2010. Rice xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene Os-11N3. *The Plant Cell Online.* **22**: 3864-3876.
- Assier E., Bouzinba-Segard H., Stolzenberg M.-C., Stephens R., Bardos J., Freemont P., Charron D., Trowsdale J. and Rich T.** 1999. Isolation, sequencing and expression of RED, a novel human gene encoding an acidic basic dipeptide repeat. *Gene.* **230**: 145-154.
- Bai J., Choi S.-H., Ponciano G., Leung H. and Leach J. E.** 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1322-1329.
- Ballvora A., Pierre M., Van den Ackerveken G., Schornack S., Rossier O., Ganal M., Lahaye T. and Bonas U.** 2001. Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 629-638.
- Bellorini M., Lee D. K., Dantonel J. C., Zemzoumi K., Roeder R. G., Tora L. and Mantovani R.** 1997. CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Research.* **25**: 2174-2181.
- Ben-Naim O., Eshed R., Parnis A., Teper-Bamnolker P., Shalit A., Coupland G., Samach A. and Lifschitz E.** 2006. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *The Plant Journal.* **46**: 462-476.
- Boch J. and Bonas U.** (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Palo Alto, Annual Reviews.* **48**: 419-436.
- Boch J., Bonas U. and Lahaye T.** 2014. TAL effectors – pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist.* **204**: 823-832.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A. and Bonas U.** 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* **326**: 1509-1512.
- Böhm C., Seibel N. M., Henkel B., Steiner H., Haass C. and Hampe W.** 2006. SorLA Signaling by Regulated Intramembrane Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry.* **281**: 14547-14553.

- Bonas U., Conrads-Strauch J. and 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**: 261-269.
- Bonas U., Stall R. E. and Staskawicz B. J.** 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet.* **218**: 127-136.
- Boyer H. W. and Roulland-Dussoix D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology.* **41**: 459-472.
- Brunings A. M. and Gabriel D. W.** 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular plant pathology.* **4**: 141-157.
- Büttner D. and Bonas U.** 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 193-200.
- Büttner D., Gürlebeck D., Noël L. D. and Bonas U.** 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**: 755-768.
- Büttner D., Lorenz C., Weber E. and Bonas U.** 2006. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **59**: 513-27.
- Canonne J., Marino D., Jauneau A., Pouzet C., Brière C., Roby D. and Rivas S.** 2011. The *Xanthomonas* Type III Effector XopD Targets the Arabidopsis Transcription Factor MYB30 to Suppress Plant Defense. *The Plant Cell Online.* **23**: 3498-3511.
- Canonne J., Marino D., Noel L. D., Arechaga I., Pichereaux C., Rossignol M., Roby D. and Rivas S.** 2010. Detection and Functional Characterization of a 215 Amino Acid N-Terminal Extension in the *Xanthomonas* Type III Effector XopD. *PLoS ONE.* **5**: e15773.
- Canonne J. and Rivas S.** 2012. Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription. *Plant Signaling & Behavior.* **7**: 217-221.
- Canteros B., Minsavage G., Bonas U., Pring D. and Stall R.** 1991. A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Mol Plant-Microbe Interact.* **4**: 628-632.
- Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J. A., Somia N. V., Bogdanove A. J. and Voytas D. F.** 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research.* **39**: e82.
- Chalupowicz L., Barash I., Schwartz M., Aloni R. and Manulis S.** 2006. Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta.* **224**: 429-437.
- Chen L.-Q.** 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist.* **201**: 1150-1155.
- Chen L.-Q., Hou B.-H., Lalonde S., Takana H., Hartung M. L., Qu X.-Q., Guo W.-J., Kim J.-G., Underwood W., Chaudhuri B., Cermak D., Antony G., White F. F., Somerville S. C., Mudgett M. B. and Frommer W. B.** 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* **468**: 527-532.

- Chen L.-Q., Qu X.-Q., Hou B.-H., Sosso D., Osorio S., Fernie A. R. and Frommer W. B.** 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*. **335**: 207-211.
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B. J.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. **124**: 803-14.
- Cohn M., Bart R. S., Shybut M., Dahlbeck D., Gomez M., Morbitzer R., Hou B.-H., Frommer W. B., Lahaye T. and Staskawicz B. J.** 2014. Xanthomonas axonopodis Virulence Is Promoted by a Transcription Activator-Like Effector Mediated Induction of a SWEET Sugar Transporter in Cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **27**: 1186-1198.
- Combiér J.-P., Frugier F., de Billy F. o., Boualem A., El-Yahyaoui F., Moreau S., Verniè T., Ott T., Gamas P., Crespi M. and Niebel A.** 2006. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in Medicago truncatula. *Genes & Development*. **20**: 3084-3088.
- Cunnac S., Occhialini A., Barberis P., Boucher C. and 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**: 115-28.
- Dale C., Plague G. R., Wang B., Ochman H. and Moran N. A.** 2002. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 12397-402.
- Daniels M. J., Barber C. E., Turner P. C., Sawczyc M. K., Byrde R. J. W. and Fielding A. H.** 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* **3**: 3323-3328.
- de Lange O., Binder A. and Lahaye T.** 2014. From dead leaf, to new life: TAL effectors as tools for synthetic biology. *The Plant Journal*. **78**: 753-771.
- de Souza T. A., Soprano A. S., Lira N. P. V. d., Quaresma A. J. C., Pauletti B. A., Leme A. F. P. and Benedetti C. E.** 2012. The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly(U) RNA. *PLoS ONE*. **7**: e32305.
- Delannoy E., Lyon B. R., Marmey P., Jalloul A., Daniel J. F., Montillet J. L., Essenberg M. and Nicole M.** 2005. Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu Rev Phytopathol*. **43**: 63-82.
- Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.-K., Shi Y. and Yan N.** 2012. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science*. **335**: 720-723.
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D. X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S. and 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**: 8024-8029.
- DeYoung B. J. and Innes R. W.** 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* **7**: 1243-9.
- Dodds P. N., Lawrence G. J., Catanzariti A. M., Teh T., Wang C. I., Ayliffe M. A., Kobe B. and Ellis J. G.** 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 8888-93.

- Dolfini D., Gatta R. and Mantovani R.** 2012. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **47**: 29-49.
- Domingues M. N., de Campos B. M., de Oliveira M. L. P., de Mello U. Q. and Benedetti C. E.** 2012. TAL Effectors Target the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II (CTD) by Inhibiting the Prolyl-Isomerase Activity of a CTD-Associated Cyclophilin. *PLoS ONE*. **7**: e41553.
- Domingues M. N., De Souza T. A., Cernadas R. A., De Oliveira M. L. P., Docena C., Farah C. S. and Benedetti C. E.** 2010. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular Plant Pathology*. **11**: 663-675.
- Dow J. M. and Daniels M. J.** 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast*. **17**: 263-71.
- Dow M., Newman M. A. and von Roepenack E.** 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol*. **38**: 241-261.
- Dwarki V. J., Montminy M. and Verma I. M.** 1990. Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *The EMBO Journal*. **9**: 225-232.
- Elsaesser R. and Paysan J.** 2004. Liquid gel amplification of complex plasmid libraries. *BioTechniques*. **37**: 200-202.
- Engler C., Gruetzner R., Kandzia R. and Marillonnet S.** 2009. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE*. **4**: e5553.
- Engler C., Kandzia R. and Marillonnet S.** 2008. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE*. **3**: e3647.
- Felix G., Duran J. D., Volko S. and Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*. **18**: 265-276.
- Flor H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol*. **9**: 275-296.
- Frontini M., Imbriano C., diSilvio A., Bell B., Bogni A., Romier C., Moras D., Tora L., Davidson I. and Mantovani R.** 2002. NF-Y Recruitment of TFIID, Multiple Interactions with Histone Fold TAFIIs. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 5841-5848.
- Gabriel D. W.** 1997. Targeting of protein signals from *Xanthomonas* to the plant nucleus. *Trends Plant Sci*. **2**: 204-206.
- Gabriel D. W.** (1999). The *Xanthomonas avr/pth* Gene Family. *Plant-Microbe Interactions*. **4**: 39-55.
- Gabriel D. W., Chakrabarty P. K. and Duan Y. P.** 1997. Cloning and Characterization of a Member of the *Xanthomonas avr/pth* Gene Family That Evades All Commercially Utilized Cotton R Genes in the United States. *Phytopathology*. **87**: 1160-1167.
- Gabriel D. W. and Rolfe B. G.** 1990. Working Models Of Specific Recognition In Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. **28**: 365-391.
- Gao H., Wu X., Chai J. and Han Z.** 2012. Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region. *Cell Res*. **22**: 1716-1720.

- Geissler R., Scholze H., Hahn S., Streubel J., Bonas U., Behrens S.-E. and Boch J.** 2011. Transcriptional Activators of Human Genes with Programmable DNA-Specificity. *PLoS ONE*. **6**: e19509.
- Gietz R. D. and Schiestl R. H.** 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protocols*. **2**: 31-34.
- Giniger E., Varnum S. M. and Ptashne M.** 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*. **40**: 767-774.
- Goel A. K., Rajagopal L., Nagesh N. and Sonti R. V.** 2002. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*. **184**: 3539-48.
- Göhre V., Haag C. and Feldbrügge M.** 2013. RNA Biology in Fungal Phytopathogens. *PLoS Pathog*. **9**: e1003617.
- Göhre V. and Robatzek S.** 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*. **46**: 189-215.
- Goldfarb D. S., Corbett A. H., Mason D. A., Harreman M. T. and Adam S. A.** 2004. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends. Cell Biol*. **14**: 505-14.
- Greenberg J. T. and Yao N.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol*. **6**: 201-211.
- Grünberg S. and Hahn S.** 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*. **38**: 10.1016/j.tibs.2013.09.002.
- Gu K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G.-L., White F. F. and Yin Z.** 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*. **435**: 1122.
- Gudesblat G. E., Torres P. S. and Vojnov A. n. A.** 2009. *Xanthomonas campestris* Overcomes Arabidopsis Stomatal Innate Immunity through a DSF Cell-to-Cell Signal-Regulated Virulence Factor. *Plant Physiology*. **149**: 1017-1027.
- Gürlebeck D.** 2007. Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Ph.D. thesis. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften, Halle*.
- Gürlebeck D., Szurek B. and Bonas U.** 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J*. **42**: 175-187.
- Hahn S.** 2009. Analyse des molekularen Mechanismus der Aktivität des Typ-III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; . *Ph.D. thesis. Martin-Luther-Universität; Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften, Halle*.
- Hakoshima T.** (2005). Leucine Zippers. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- He P., Chintamanani S., Chen Z., Zhu L., Kunkel B. N., Alfano J. R., Tang X. and Zhou J.-M.** 2004. Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J*. **37**: 589-602.
- He S. Y., Nomura K. and Whittam T. S.** 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta*. **1694**: 181-206.

- Heuer H., Yin Y.-N., Xue Q.-Y., Smalla K. and Guo J.-H.** 2007. Repeat domain diversity of *avrBs3*-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4379-4384.
- Hoiby T., Zhou H., Mitsiou D. J. and Stunnenberg H. G.** 2007. A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1769**: 429-436.
- Holland P. W. H.** 2012. Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology.* **2**: 31-45.
- Hopkins C. M., White F. F., Choi S. H., Guo A. and Leach J. E.** 1992. A family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 451-459.
- Hueck C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.
- Ishihara H., Ponciano G., Leach J. E. and Tsuyumu S.** 2003. Functional analysis of the 3' end of *avrBs3/pthA* genes from two *Xanthomonas* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **63**: 329-338.
- Iyer A. S. and McCouch S. R.** 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 1348-54.
- Jeong B.-r., Lin Y., Joe A., Guo M., Korneli C., Yang H., Wang P., Yu M., Cerny R. L., Staiger D., Alfano J. R. and Xu Y.** 2011. Structure Function Analysis of an ADP-ribosyltransferase Type III Effector and Its RNA-binding Target in Plant Immunity. *Journal of Biological Chemistry.* **286**: 43272-43281.
- Jiang G. H., Xia Z. H., Zhou Y. L., Wan J., Li D. Y., Chen R. S., Zhai W. X. and Zhu L. H.** 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIA γ 1*. *Mol. Genet. Genomics.* 1-13.
- Jones J. D. and Dangl J. L.** 2006. The plant immune system. *Nature.* **444**: 323-9.
- Kabe Y., Yamada J., Uga H., Yamaguchi Y., Wada T. and Handa H.** 2005. NF-Y Is Essential for the Recruitment of RNA Polymerase II and Inducible Transcription of Several CCAAT Box-Containing Genes. *Molecular and Cellular Biology.* **25**: 512-522.
- Kapuscinski J.** 1995. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry.* **70**: 220-233.
- Katzen F., Becker A., Zorreguieta A., Pühler A. and Ielpi L.** 1996. Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J Bacteriol.* **178**: 4313-4318.
- Kay S.** 2008. Funktionelle Analyse des Typ-III-Effektors AvrBs3 und homologer Proteine aus *Xanthomonas campestris*. *Ph.D. thesis. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften, Halle.*
- Kay S., Boch J. and Bonas U.** 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 838-848.
- Kay S. and Bonas U.** 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 37-43.
- Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G. and Bonas U.** 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science.* **318**: 648-651.

- Kay S., Hahn S., Marois E., Wieduwild R. and Bonas U.** 2009. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 Δ rep16. *The Plant Journal*. **59**: 859-871.
- Keen N. T.** 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet*. **24**: 447-463.
- Klement Z.** (1982). Hypersensitivity. Phytopathogenic prokaryotes. M. S. Mount and G. H. Lacy. New York, *Academic Press*. **2**: 149-177.
- Kunkel B. and Chen Z.** (2006). Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. *Prokaryotes*: 421-440.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. and Felix G.** 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*. **16**: 3496-3507.
- Landschulz W. H., Johnson P. F. and McKnight S. L.** 1988. A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. **240**: 1759-1764.
- Lange O. d., Wolf C., Dietze J., Elsaesser J., Morbitzer R. and Lahaye T.** 2014. Programmable DNA-binding proteins from Burkholderia provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. *Nucleic Acids Research*. **42**: 7436–7449. .
- Latchman D. S.** 1997. Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **29**: 1305-1312.
- Liu W., Mazarei M., Rudis M., Fethe M. and Stewart C. N.** 2011. Rapid in vivo analysis of synthetic promoters for plant pathogen phyto-sensing. *BMC Biotechnology*. **11**: 108.
- Liu Y., Schiff M. and Dinesh-Kumar S. P.** 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*. **31**: 777-786.
- Luderer R., Rivas S., Nürnberger T., Mattei B., Van den Hooven H. W., Van der Hoorn R. A., Romeis T., Wehrfritz J. M., Blume B., Nennstiel D., Zuidema D., Vervoort J., De Lorenzo G., Jones J. D., De Wit P. J. and Joosten M. H.** 2001. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *MPMI*. **14**: 867-876.
- Mak A. N.-S., Bradley P., Cernadas R. A., Bogdanove A. J. and Stoddard B. L.** 2012. The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target. *Science*. **335**: 716-719.
- Mantovani R.** 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*. **239**: 15-27.
- Maris C., Dominguez C. and Allain F. H. T.** 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*. **272**: 2118-2131.
- Marois E., Van den Ackerveken G. and 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**: 637-646.
- Melcher K.** 2000. The strength of acidic activation domains correlates with their affinity for both transcriptional and non-transcriptional proteins. *J Mol Biol*. **301**: 1097-112.
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P. D. and Rebar E. J.** 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotech*. **29**: 143-148.

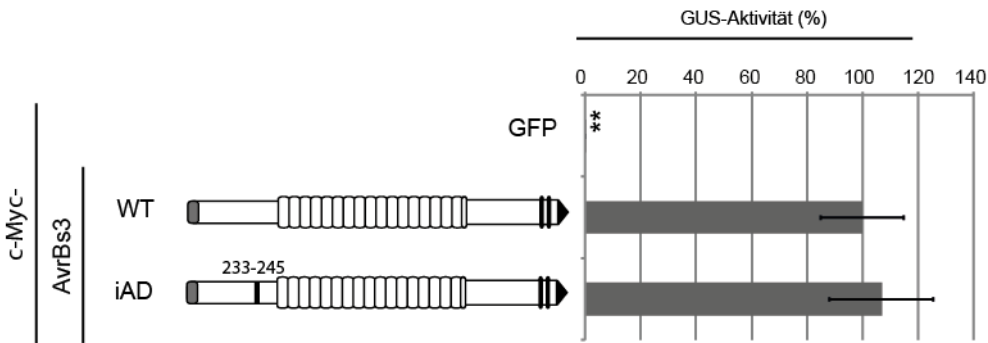
- Miller J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minsavage G. V., Dahlbeck D., Whalen M. C., Kearney B., Bonas U., Staskawicz B. J. and Stall R. E.** 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 41-47.
- Mittler G. and Meisterernst M.** 2003. Book Review: Transcription Regulation in Prokaryotes. By Rolf Wagner. *ChemBioChem.* **4**: 351-351.
- Moscou M. J. and Bogdanove A. J.** 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* **326**: 1501.
- Mudgett M. B.** 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **56**: 509-31.
- Mukaihara T., Tamura N., Murata Y. and Iwabuchi M.** 2004. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **54**: 863-875.
- Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., Dannemann N., Lahaye T. and Cathomen T.** 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research.* **39**: 9283-9293.
- Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., Sleeman J., Lamond A. and Mann M.** 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet.* **20**: 46-50.
- Nino-Liu D. O., Ronald P. C. and Bogdanove A. J.** 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* **7**: 303-324.
- Nissan G., Manulis-Sasson S., Chalupowicz L., Teper D., Yeheskel A., Pasmanik-Chor M., Sessa G. and Barash I.** 2012. The Type III Effector HsvG of the Gall-Forming *Pantoea agglomerans* Mediates Expression of the Host Gene HSVGT. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **25**: 231-240.
- Nissan G., Manulis-Sasson S., Weinthal D., Mor H., Sessa G. and Barash I.** 2006. The type III effectors HsvG and HsvB of gall-forming *Pantoea agglomerans* determine host specificity and function as transcriptional activators. *Mol. Microbiol.* **61**: 1118-31.
- Pereira A. L. A., Carazzolle M. F., Abe V. Y., de Oliveira M. L. P., Domingues M. N., Silva J. C., Cernadas R. A. and Benedetti C. E.** 2014. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. *BMC Genomics.* **15**: 157-157.
- Phatnani H. P. and Greenleaf A. L.** 2006. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & Development.* **20**: 2922-2936.
- Ransone L. J., Visvader J., Sassone-Corsi P. and Verma I. M.** 1989. Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes & Development.* **3**: 770-781.
- Römer P., Hahn S., Jordan T., Strauß T., Bonas U. and Lahaye T.** 2007. Plant-pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science.* **318**: 645-648.
- Römer P., Strauss T., Hahn S., Scholze H., Morbitzer R., Grau J., Bonas U. and Lahaye T.** 2009. Recognition of AvrBs3-Like Proteins Is Mediated by Specific Binding to Promoters of Matching Pepper *Bs3* Alleles. *Plant Physiology.* **150**: 1697-1712.

- Rossier O., Wengelnik K., Hahn K. and Bonas U.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 9368-9373.
- Sanchez R. and Zhou M.-M.** 2011. The PHD Finger: A Versatile Epigenome Reader. *Trends in biochemical sciences.* **36**: 364-372.
- Scholze H.** 2011. DNA-Bindenspezifität von TAL-Effektoren aus Xanthomonaden; Ph.D. thesis. *Martin-Luther-Universität; Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften, Halle.*
- Schorneck S., Ballvora A., Gürlebeck D., Peart J., Ganai M., Baker B., Bonas U. and 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**: 46-60.
- Schorneck S., Meyer A., Römer P., Jordan T. and Lahaye T.** 2006. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol.* **163**: 256-72.
- Schorneck S., Minsavage G. V., Stall R. E., Jones J. B. and Lahaye T.** 2008. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol.* **179**: 546-556.
- Schorneck S., Peter K., Bonas U. and Lahaye T.** 2005. Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4*- but not in pepper *Bs3*-mediated perception. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**: 1215-25.
- Schreiber T. and Bonas U.** 2014. Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero. *Nucleic Acids Research.* doi:10.1093/nar/gku341
- Schreiber T., Sorgatz A., List F., Blüher D., Thieme S., Wilmanns M. and Bonas U.** *in revision.* Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3. *PLoS ONE.*
- Scofield S. R., Tobias C. M., Rathjen J. P., Chang J. H., Lavelle D. T., Michelmore R. W. and Staskawicz B. J.** 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science.* **274**: 2063-2065.
- Shi Y.** 2009. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell.* **139**: 468-484.
- Simpson A. J., Reinach F. C., Arruda P., Abreu F. A., Acencio M., Alvarenga R., Alves L. M., Araya J. E., Baia G. S., Baptista C. S., Barros M. H., Bonaccorsi E. D., Bordin S., Bove J. M., Briones M. R., Bueno M. R., Camargo A. A., Camargo L. E., Carraro D. M., Carrer H., Colauto N. B., Colombo C., Costa F. F., Costa M. C., Costa-Neto C. M., Coutinho L. L., Cristofani M., Dias-Neto E., Docena C., El-Dorry H., Facincani A. P., Ferreira A. J., Ferreira V. C., Ferro J. A., Fraga J. S., Franca S. C., Franco M. C., Frohme M., Furlan L. R., Garnier M., Goldman G. H., Goldman M. H., Gomes S. L., Gruber A., Ho P. L., Hoheisel J. D., Junqueira M. L., Kemper E. L., Kitajima J. P., Krieger J. E., Kuramae E. E., Laigret F., Lambais M. R., Leite L. C., Lemos E. G., Lemos M. V., Lopes S. A., Lopes C. R., Machado J. A., Machado M. A., Madeira A. M., Madeira H. M. and Marino C. L.** 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature.* **406**: 151-157.
- Soprano A. S., Abe V. Y., Smetana J. H. C. and Benedetti C. E.** 2013. Citrus MAF1, a Repressor of RNA Polymerase III, Binds the *Xanthomonas citri* Canker Elicitor PthA4 and Suppresses Citrus Canker Development. *Plant Physiology.* **163**: 232-242.

- Stella S., Molina R., Yefimenko I., Prieto J. s., Silva G., Bertonati C., Juillerat A., Duchateau P. and Montoya G.** 2013. Structure of the AvrBs3-DNA complex provides new insights into the initial thymine-recognition mechanism. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. **69**: 1707-1716.
- Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J. and Szurek B.** 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist*. **200**: 808-819.
- Stringer K. F., Ingles C. J. and Greenblatt J.** 1990. Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature*. **345**: 783-786.
- Sun N. and Zhao H.** 2013. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and Bioengineering*. **110**: 1811-1821.
- Swarup S., De Feyter R., Brlansky R. H. and Gabriel D. W.** 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology*. **81**: 802-809.
- Swings J. G., Vauterin L. and Kersters K.** (1993). The bacterium *Xanthomonas*. *Xanthomonas*. J. G. Swings and E. L. Civerolo. London, Chapman & Hall: 121-156.
- Szczesny R., Büttner D., Escolar L., Schulze S., Seiferth A. and Bonas U.** 2010. Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist*. **187**: 1058-1074.
- Szurek B., Marois E., Bonas U. and Van den Ackerveken G.** 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* **26**: 523-534.
- Szurek B., Rossier O., Hause G. and Bonas U.** 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* **46**: 13-23.
- Tampakaki A. P., Fadouloglou V. E., Gazi A. D., Panopoulos N. J. and Kokkinidis M.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* **6**: 805-816.
- Thieme F., Koebnik R., Bekel T., Berger C., Boch J., Büttner D., Caldana C., Gaigalat L., Goesmann A., Kay S., Kirchner O., Lanz C., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Mittenhuber G., Nies D. H., Niesbach-Klöggen U., Patschkowski T., Rückert C., Rupp O., Schneiker S., Schuster S. C., Vorhölter F.-J., Weber E., Pühler A., Bonas U., Bartels D. and 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**: 7254-7266.
- Triezenberg S. J.** 1995. Structure and function of transcriptional activation domains. *Current Opinion in Genetics & Development*. **5**: 190-196.
- Valverde R., Edwards L. and Regan L.** 2008. Structure and function of KH domains. *FEBS Journal*. **275**: 2712-2726.
- Van den Ackerveken G., Marois E. and Bonas U.** 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*. **87**: 1307-1316.
- Van der Biezen E. A. and Jones J. D. G.** 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 454-456.

- van der Hoorn R. A. L. and Kamoun S.** 2008. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*. tpc.108.060194.
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R. A. and Schell J.** 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*. **252**: 169-170.
- Vera Cruz C. M., Bai J., Ona I., Leung H., Nelson R. J., Mew T.-W. and Leach J. E.** 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 13500-13505.
- Vervliet G., Holsters M., Teuchy H., Van Montagu M. and Schell J.** 1975. Characterization of Different Plaque-forming and Defective Temperate Phages in *Agrobacterium* Strains. *J Gen Virol*. **26**: 33-48.
- Vidal M., Brachmann R. K., Fattaey A., Harlow E. and Boeke J. D.** 1996. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**: 10315-10320.
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton W. J. and Perret X.** 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol*. **28**: 1381-1389.
- Vollmeister E., Haag C., Zarnack K., Baumann S., KÄ¶nig J., Mannhaupt G. and FeldbrÄ¼gge M.** 2009. Tandem KH domains of Khd4 recognize AUACCC and are essential for regulation of morphology as well as pathogenicity in *Ustilago maydis*. *RNA*. **15**: 2206-2218.
- Wichmann G. and Bergelson J.** 2004. Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics*. **166**: 693-706.
- Wood D. W., Setubal J. C., Kaul R., Monks D. E., Kitajima J. P., Okura V. K., Zhou Y., Chen L., Wood G. E., Almeida N. F., Jr., Woo L., Chen Y., Paulsen I. T., Eisen J. A., Karp P. D., Bovee D., Sr., Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Kutuyavin T., Levy R., Li M.-J., McClelland E., Palmieri A., Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao Z.-Y., Dolan M., Chumley F., Tingey S. V., Tomb J.-F., Gordon M. P., Olson M. V. and Nester E. W.** 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. **294**: 2317-2323.
- Woychik N. A. and Hampsey M.** 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*. **108**: 453-63.
- Wu X. M., Li Y. R., Zou L. F. and Chen G. Y.** 2007. Gene-for-gene relationships between rice and diverse *avrBs3/pthA* avirulence genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathol*. **56**: 26-34.
- Yang B., Sugio A. and White F. F.** 2006. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 10503-10508.
- Yang B. and White F. F.** 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**: 1192-1200.

- Yang B., Zhu W., Johnson L. B. and White F. F.** 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**: 9807-9812.
- Yang Y., De Feyter R. and Gabriel D. W.** 1994. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 345-355.
- Yang Y. and Gabriel D. W.** 1995. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 627-631.
- Yang Y., Yuan Q. and Gabriel D. W.** 1996. Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 105-113.
- Yuan M. and Wang S.** 2013. Rice MtN3/Saliva/SWEET Family Genes and Their Homologs in Cellular Organisms. *Molecular Plant.* **6**: 665-674.
- Zeidler D., Zähringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J.** 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 15811-15816.
- Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G. M. and Arlotta P.** 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotech.* **29**: 149-153.
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X. and Zhou J.-M.** 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe.* **1**: 175-185.
- Zheng C.-K., Wang C.-L., Zhang X.-P., Wang F.-J., Qin T.-F. and Zhao K.-J.** 2014. The last half-repeat of transcription activator-like effector (TALE) is dispensable and thereby TALE-based technology can be simplified. *Molecular Plant Pathology.* **15**: 690-697.
- Zhu W., Yang B., Chittoor J. M., Johnson L. B. and White F. F.** 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 824-32.
- Zhu W., Yang B., Willis N., Johnson L. B. and White F. F.** 1999. The C terminus of AvrXa10 can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the herpes simplex virus. *Plant Cell.* **11**: 1665-1674.
- Zipfel C.** 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology.* **12**: 414-420.
- Zipfel C. and Felix G.** 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology.* **8**: 353-360.



Anhang 3: Reporteraktivierung durch AvrBs3-WT und AvrBs3-iAD

Graphische Darstellung von AvrBs3 und AvrBs3-Derivat mit Angabe der Mutationen der internen Aktivierungsdomäne (iAD) in AvrBs3. Gezeigt ist die relative GUS-Aktivität der *UPA20*-*EBE_{AvrBs3}*-vermittelten Reporteraktivierung durch das AvrBs3-Derivat im Vergleich zu AvrBs3-WT. GUS-Aktivität wurde 3 Tage nach *Agrobacterium*-vermitteltem Ko-Transfer des Konstrukte für den Reporter, *gfp*, oder *avrBs3* bzw. Derivat bestimmt. Die Aktivität von AvrBs3-WT wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Test; *, P < 0,01). Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Anhang 4: Mit BD_{Gal4} C und BD_{Gal4} CΔAD interagierende Proteinfragmente aus Paprika

Homologie	Anzahl an cDNA-Fragmenten	Akzessionsnummer	DNA-Homologie ¹ in %	Lokalisierung
Katalase 2 [<i>C. annuum</i>] ^a	1	AAM97541.1	100 %	Zytoplasma, Mitochondrien
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	2	XP_004252229.1	71 %	k.a.
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004232207.1	76 %	k.a.
SIPK: Serine/Threonin-kinase-ähnliches Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004241640.1	84 %	Zytoplasma
SIZF: BRCA1-assoziiierendes Protein mit Zink-Finger Domäne [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	2	XP_004235720.1	43 %	k.a.
DOCK10 [<i>S. lycopersicum</i>] ^{a,b}	2	XP_004244792.1	91 %	Zytoplasma, Membran
Ribosomale 30S-Untereinheit S1 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	3	XP_004229034.1	97 %	Chloroplast
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004239298.1	88 %	k.a.
Thiaminthiazolsynthase 1 [<i>S. lycopersicum</i>] ^{a,b}	6	XP_004244150.1	100 %	Chloroplast
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	NP_001234392	70 %	Zellkern, Zytoplasma
Glyceratdehydrogenase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004231047.1	54 %	Peroxisom
Ubiquitin-konjugierendes Enzyme E2 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004232444.1	97%	k.a.
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	2	XP_004244122.1	87 %	k.a.

Anhang

SIKH: Protein mit KH-Domäne ^a [<i>S. lycopersicum</i>]	1	XP_004244971.1	100 %	k.a
Inactive Poly [ADP-ribose] Polymerase RCD1-ähnlich [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004244408.1	70%	Zellkern
Cytochrome-b6-f Komplex [<i>S. lycopersicum</i>] ^{a,b}	3	XP_004251502.1	93 %	Chloroplast
CaRED: Protein RED [<i>S. lycopersicum</i>] ^{a,b}	2 ^a	XP_004242897.1	97 %	Zellkern
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	AEW69793.1	93 %	k.a
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004234226.1	92 %	k.a
SHBP:Homöoboxprotein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004243382.1	72 %	k.a
ThiC Variante L1 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	ACA97594.1	59 %	Chloroplast
CaNF-YC: Transkriptionsfaktor Y – Untereinheit C-4-ähnlich [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004236362.1	94 %	Zellkern
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004232294.1	64 %	k.a
Citratsynthase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	2	XP_004251813.1	74 %	Mitochondrien
CaCIP6: CONSTANS interagierendes Protein 6 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004243557.1	92%	Zellkern
Arginindcarboxylase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	NP_001234649.1	85 %	Zellkern
Dihydrolipoyllysinrest Acetyltransferase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004238940.1	85 %	Mitochondrien
Putative Isopropylmalatsynthase [<i>C. annuum</i>] ^a	1	ACF17660.1	95 %	Zytoplasma, Mitochondrien
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004228503.1	86 %	Zytoplasma
CaRF2b: Transcriptionfaktor RF2b [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004240847.1	76 %	Zellkern
Unbekanntes Protein mit Kinesinmotor Domäne [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004230863.1	82 %	Zytoplasma
VAC14 Homolog [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004236931.1	92 %	Endosom
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004246557.1	81 %	k.a
ARC6 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004238321.1	80 %	Chloroplast
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004247328.1	78 %	k.a
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004246539.1	93 %	k.a
Importin Alpha Untereinheit [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004244944.1	84 %	Zellkern, Zytoplasma
Ribulose-1,5 bisphosphatcarboxylase/oxygenase Untereinheit [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004239106.1	60 %	Chloroplast
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004248454.1	37 %	k.a
Unbekanntes Protein, C1-3 Familie [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004229343.1	73 %	k.a

Anhang

Photosystem II Reaktionszentrum W [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_004247215.1	82 %	Chloroplast
Protoporphyrinogenoxidase [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_004229365.1	96 %	Mitochondrien
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_004238139.1	62 %	k.a
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	2	XP_004241490.1	70 %	k.a
Endo-beta-1.4-D-glucanase [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	NP_001234172.1	82 %	Zellwand, Zellmembran
Alpha-MPP [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_004251648.1	84 %	Mitochondrien
Unbekanntes Protein [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_004247148. XP_004247147.11	70 %	k.a
Rieskeprotein (Cytochrom bc1) [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	1	XP_002265183.2	88 %	Chloroplast
Chlorophyll a/b-Bindeprotein [<i>S. lycopersicum</i>] ^b	2	AAA80593.1	99 %	Chloroplast
Aconitat-Hydratase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004243472.1	79 %	Zytoplasma
FtsH-Vorläufer [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	NP_001234196.1	89 %	k.a
Calcylin-Bindeprotein [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004244806.1	93 %	k.a
GTPase [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_004232950.1	84 %	Mitochondrien
U1-Ribonukleoprotein Isoform X3 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	2	XP_004235115.1	82 %	k.a
4-alpha-glucanotransferase DPE2 [<i>S. lycopersicum</i>] ^a	1	XP_010315588.1	49 %	Zytoplasma

^a – Interaktor von BD_{Gal4C}; ^b – Interaktor von BD_{Gal4CΔAD}; 1 Homologie zu EST aus der Tomate-EST-Datenbank, k.a: keine Angaben

Anhang 5: DNA-Sequenzen von SIZF, SIKH, CaNF-YC, CaRED, CaCIP6 und CaRF2b

Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit amplifizierten Interaktoren **SIZF** und **SIKH** aus *S. lycopersicum* und **CaRED**, **CaCIP6** und **CaRF2b** aus *C. annuum*. Angegeben ist jeweils der ORF (*open reading frame*).

Kodierende DNA-Sequenz von SIZF aus *S. lycopersicum*:

```
ATGGATTCTTCAACGTCATGTGTAATTTGACTGAGGTGTTCTATTTTTCTTCTGGAAACCCTCGCATCGAAGAAACT
AGAGGCGTCATGCATCTCTTCTCCAACGATGTTGCTTCTCATTACCTGTGGAAAGAAAACCTCTCTCTGTGTTCTA
TGTGTTCCGAATCACATGACATATTCAGACTTTTGTGAGTTTGTGGTTCATTTGTCAACATATGTTGGAAATGCGA
ATTGTCAGGAATGATGGTATGGAAGATTGTTACAGTATATTGATCAGGTTTGATGAGCAGAAAGCTGCAGATACTTTT
CACAAGCATTTTAGTGGTAGAAGATTTTCATCTCTTGAGGAGGAGACGTGCGATGTGCTATTTGCTGCTGATGTGCAT
TACACCGGCTCAATTGAGCACACTCAGTCATTACCTGCAAGCTCTACAGAGCAACCATTCTGTCTCTGTTTGTCTCGAG
AGATTGGACCAGGATACAAGTGAATTTCTCACAACCATTGTAATCATTCTTTTTCATTGTTTCATGTATTTCAAAATGG
ACAGATTCTTCATGCCCCGTATGCCGATATTGTCAGCAGCAGCCTGGAAACTCAACATGTTCTATCTGTCAATCACCA
GAAAATCTATGGATGTGTGTTATTTGTGGTTTTTGTGGGTGTGGAAGATATAAAGAGGCTCATGCTACAAGGCACCTGG
AAGGAGACACAACATTGCTATGCACTTGAATTAGAAAACACGGCGTGTCTGGGACTACGCAGGGGATAACTATGTTTAC
CGTTTGATTTCAGTCTAAAACCTGATGGGAAGCTGGTTGAGTCAACCACCATTGTCATCATGATAGTGATGGCTGCTGC
AGCTGCGAGTGTGGTACAGATCCTGGGTTTCAGCAGACTATTTAAACAGCAAAGTTGAAGCTATTGTGAACGAGTAC
AATGATCTCTGACTTCCCAACTGGAGGATCAAAAAATGTACTTTGAGTCCTTATGCAAGAGGCTGAAGAAGAAATTT
GAAAGGGAAACTAAGGAAGCTGTTGAGAAAGTTCTATGCCAGAATCCAAGGTTAATGAAGTTAAAAGTTTCGTTTGGAC
AAATGCGTTGAAGAGAAGAAATTCATGATGACATCAATGACAATCTTACGAGGAACAAGGAGATATGGGAAGCCAAG
ATATTGAAAATTTGAAGAAAGGGAGAAGGCGGCTTTGAAAATGAAGGATGAGGAGATATCCGAATTTGGAGGAACAGATT
GCCACTTTGATGGAGTCCATCGATACATAG
```

Anhang

Kodierende DNA-Sequenz von SIKH aus *S. lycopersicum*:

ATGGGTGAGACTGGAAAAAGATCGCGTAGGGATGATGGGGATAACAAGAACCAGAAGAGGAGGACAGATAGGGACGAG
AAAAACGATGATGAGCTAATAGTTTACAGAATTCTGTGTCCAAATAATGTGATTGGAAGTGTTATAGGAAAGAATGGA
AAAGTTATAAATCAATTAGGCTCGAGACTAAGCGAAGGTCAAGGTGGTGGATCCATTTCCAGGTGCTAAGGATAGA
GTTATACTCGTTTATTGCTATGTAAGGAAAAGGAAGATGTTGAGGTTGATCAGGATTTCAATGAGAAAACAACCTCTT
TGCACGGCTCAGGATGCTCTTCTCAAGGTTTATACGGCAATTGCAAAATGCTTTGGCTGCAATTGGAGAATCTGATAAG
AAGCGGAAGGATAAAGAGGAGTGCAGCTTCTTGCCTTCAAGCCAGTCTGCTAATATCATTGGTAAATCTGGTACC
ACCATAAAGAAGTTGAGAAGCAAGATGAGGGCCAAATATAAAGTAGTTGCCAGAGATGCTAGTGATCCAACACATTTCT
TGTGCACTCGAGTTTGATAACTTTGTTCTGATAACTGGTGACCCAGAATCTGTTAGGAGATCACTCTTTGCTATTTCT
GCAATCATGTACAAATTCACACCTAAGGAAGAAAATCCTCTTACTACCAATGTTCCTGAAGTACGTCGAAGTATTATT
ATCCCTTCAGATGTTCCCATATATCCAGGAGCTGGGATTTATCCAAATGTGGATCCTATTATGCCATCTCGTTCTGTT
CCATCTGTTTTGGGTACCACACAAAATACCAGAGCTCCGGGTTATGTGGATGCAGGAAGCACATGGCCTCTTTATTCT
TCTGGTCTTCCATGTTTCTGGTTACAGTGGTGCCTCTCAAACTGAGGAATTGACTATTAGAGTGTGTGTCCAAC
AACAAATATTGGTCTGTTATTGGCAAGGGAGGAGCTTCAATTAAGGTGTAAGGCAAAACAAGTGGTCTCGTATCGAG
GTTTGTGATGCCAAAGCTGATCGTGATCAGTGCATTATCACAGTCAATTTCCACTGAGTCAAGTGGATGATCTTAAATCC
ATGGCAGTTGAAGCTGTACTTCTGCTGCAAGGGAAAATAAATGACGAAGATGAGGATACTGTAACTTTTCGTCTACTT
GTTCCATCTAAGATTATTGGATGATCATTGGGAAGGTGGTTCAATCATTAAATGAAATCCGGAAGAGAAGTACGAGCT
GATGTACGTATCTCAAAGGGCAGAGGCCAAATGTGCGGATTCAAATGATGAACTTGTTGAGGTGCTGGAGAAGTT
AGTAGTGTGAGGGACGCCCTTATCCAGATTGTACTGAGGCTCAGAGATGATGTTATAAAGGCCAAGAAGGTAATCAT
AATCCATCTGCAGCTTACGCGCTGGTGCTACTGGTTTCTCATTGGCTCCAGTGTGCCCAACGTTCTCCAGCTGCT
CCTTTGAGCTTTGAACATAGGATTGAAACTGGGAATGGTGTGGAAATGCGTTCTTCAGGCAGCCGATATGGTCATGAG
TCGCTCTCGATAGGGGAAGATACCTATGGAACGTTCTCTCATATTTCTCAAAGTTATATGGCGGATTGCCTCCACCC
TCAGCTGTAGAGATGGTTATCCAGGACATGCAGTCCGTAAGTTATGGGTAAAGGTGGCTCAAACATAGATAATATT
CGCAAGATATCTGGAGCAGCTGTGGATATAATTGATTCCAAATCTCTAGAGGTGATCAGATTGCTATAATATCTGGT
ACGCAGGAACAGAAGCGTGCTGCTGAGAACTTAATTCAGGCATTCATAATGGCSACATAA

Kodierende DNA-Sequenz von CaRED aus *C. annuum*:

ATGCTTCCCTCCAAGCGAATTCACAAGGAAAAGATAGTTCGTCGCAACAAAGAAGAGAAGGCTGAAGAAGCGGAGCTG
CCTAAGTACAGAGACAGAGCTAAAGAAAAGAGAAGATCAAAATCCAGATTATGAACTGACTGAATTTGGGCGCTTTC
CATGCTGTTCGCTCCTCCCGGCAATGTTGATATTTCTGTCTGTGATGCTCAGAAATATCTATTGAGAAGAGCAAGTAT
CTTGGAGGTGACGTGGAGCACACATTTGGTTAAAGGGTTAGATTATGCTTTACTTCACAAAGTCAGAAGTGAATA
GATAAAGAAGCCAGATGCTGGAGATGAGATTGAAGGAAAACCTAGAGGTTCAAAGGAAGATCATCAATTGTCTCCGC
ACTGCAACTGCCAAGTCAAGTGTACCAGTGGATAATCAAGCCTCAGACTGTTATAAAGACCAATGAGATGTTTCTTCC
GGACGAATGGCTTTTATTTTAAATATGGATAGTGGATACTCCAATGATATTTCCACCCTCTACACAGAAGCAAAGCT
GACTGTCCAGTCTTGGAGAAATGGTTACAGTCAAGTGTGATGGTTCTGTTCTAGACCGAATAGCTAAAATCATGTCC
TATCTCCGCTTGGATCATCAGGAAAAGTTCTCAAGAAGAAGAAGAAGGAAAAGATGGCAAAGGCAAGACAGTCATA
ACCAATGGTTATGACGAAGTATCGAAGTTGGATGCATCAAAGAGCCAAAATGATAAAGAAGCTGTGCCATCTGCA
CAACTTCCATAAAGAACCATTAGAAAAGAAGAGAATCAAGGACCTGCTGTTGCTAGACGTGAAGACGACGATATC
TTCATAGGGGAAGGCGTTGACTACTCCATTCCTGCTGGAGATATGGGTCAAAGTCTGTATCGGAGGACATGGAAGAA
TCTCCTCGAAACAAAGAGAGGACCTCATATTTTCAAGTGAACCTGCCTATGGACCAGTACCTCCATCCGAGCCTTCTCAT
GGTTGGCAATATGCGAATGGATATGATGCAGTGAAGCACAAGTGTAGCTGGTGTTTACCAACCAGAGTGGCAAGGT
TATCCGTATTCGGAACAGCTGGCTTATCCTGAGCAATATCTCCAGCAGAATTATGATATGCAAGCTGATGTTAACGCT
CTTCAGGATCCGAGTTTATGACTCAAGAAGAAAAGGATAGAGGGCTAGGGTCAGTATTCAAGAGGGATGATCAGAGG
CTTCTACAACATGAGAGAGAGATCTAGAGAGAAGGATCTTAACCTTATTTCTGAAAGCTATTCGGAGTGTCTATCCT
GTTTACCAAGATACAATCGTGAGATTGTTGACAGTGTGATGACGAAAGCTGATTTGACAAAATGGACATGGGTGGACGC
GCAAAAAGGCGGCTTTCATCGATGGGACTTTGAGACAGAAGAGGAGTGGGCAACATACAATGAGCAGAAGGAAGCAATG
CCCAAAGCTGCATCCAGTTTGGAGTGAAGATGCAGGATGGTAGGAAGACGAGGAAACAAAACAAGACCAGAAGCTT
ACCAATGAGCTGCATAAGATAAACAATACTCACCAGAAAAGAAGATGGACAAAGATAAAGGTGAAGCGCTTGGAGC
GGGAAAATACAACCTGGAAAGAAGCAGCGGGTATGA

Kodierende DNA-Sequenz von CaNF-YC aus *C. annuum*:

ATGGACAACAACCAACACTCACCAATCTCCCACTGACGCTTCCGCGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCGGCGGCA
ACGGCGGCTCAGTCAGCCTCAGCCGTAGCCGCATATCCAGGGCAGACACCGTACCACCATCTCCTTCAACAACAACAG
CAACAGCTGCAAAATGTTCTGGAATTACCAGCGTCAAGAAATAGAACAAGCTAATGATTTCAAAAACCACCAACTTCCC
TTAGCTCGTATAAAGAAAATCATGAAAGCTGATGAAGATGTTCTGATGATTTCCGCCGAAGCTCCTGTGCTCTTTGCA
AAAGCTGTGAACTTTTATCCTCGAACTCAGATTCGTTCTGGCTTACGCTGAGGAGAATAAGCGTAGGACGTTA
CAGAAGAATGATATCGCTGCGGCTACTACTCGTACGGACATTTTGTATTTCTCGTTGACATTGTCCTAGGGATGAA
GTTAAGGATGAAGGAGTTGGGCTTGGGCTTGGACCGGATTTGTGGGCCCTACTGCTAGTGGTGTGCCGTACTATTAT
CCTCCGTTGGGTGAGCCGCTCCCGGTGGGTAATGCTTGGTAGACCTGCTGTTCTGGTGTGATCCGTCATGTAT
GTGCATCCACCGCATCACAGGCTGGCAATCTGTGTGGCAGACATCGGAGGAACATTCGTATCCTAGTGGAGGTGGA
AGTAGCAGTGGACAGGGGAACGTAGACGGCCAAATTTATGAAGCTTA

Anhang

Kodierende DNA-Sequenz von CaCIP6 aus *C. annuum*:

ATGCTGCCTCCACGTCCCAACGGCTTACCTCCGTCCTTATTTCTTGTCATCTTCATCAGATGCCAGAGCATCAACTGAT
AATCAGGATCCCAGAATGAACCTGATCAGCATCGTGAATCGCCTGCTGAGAGTGCTAGTTCAAGAGATACATGGCCT
GTTATTGATGCTGCTACTCAAGTGAAGCTTGAGAAATCAGAAAAGCTGAAGATGGTTATTATGAACACTCTGTGATTCAC
AGGCCTGCTAGTGCAAATAAAGTCTCTCTTCTTGATATAGCAAGAGAACAAGTGGATATAAATATCTGAAAAAATGTAT
TTGCTCCCTAATGAGTATTTAGAAAGAGCTAAAGGGCAGGGTTCGAGGGATGCTTGAGGGAAATGGTGGTCTCAGCAA
AGAGATGAGTTTTTGTTTTTACAGAGGCTTGTTTCAGAGTAGGTCTGATTTGACTGCAAAGTCATTGATTAAGCTCAT
AAAGTCCAGCTGGAAATTCCTGTCGCCATTAATAGTGGCATTCAATTTTTCTTACATCAAAGTATGAATCTTTCTCAG
AGTGTCTGATGAGGTTTTTGTATACAAGAGATGTGCGAATATAGCATGCCAAAGCCAGTTGCCATGCAGAAGATTGC
CACTGTGAGATATGCACCAACCGAAAAGGGATTCTGCAGCCTTTGCATGTGTGTAATCTGTAACAAGTTCGATTTTGAA
GTAATAACATGTCGGTGGATTGGTTGCGACTCCTGCGCTCATTGGACTCACACAGATTGTGCAATTCGTGATAAGGAA
ATTGGACCAGGTCCTTCTACTGTGAATGGGCTGGGGTCTGCTGAAATGCAGTTTTAGGTGTAGAGCATGCAATCGCACT
TCTGAGCTTTTTGGTTGGGTGAAAGATGTATCCAGCAATGTGCACCTACCTGGAATGGGGAATCATTGATAAGAGAA
CTAACTATTGTAAGTAAGATCTTTCGAATGAGTGAGAACAAGAGGGAGGCAGCTTTTTGGAAGTCTGAGGATCTC
ATAGAAAACCTGAAGGGTGGAGTGGCGGAAACAACAGCTTGCAGAAATATATTAACCTTTTCTCCAAGAGCTTGAGATA
GATTCATCAAATAGCTATGAGGCTGGAATAATGGAAGGATGATTCACCCCAGGAGGCATGCAACCGAATTGCTGCA
GTGGTACAAGAAGCAATGCAGACAATGGATATAGTGGCCGATGAAAAATGAGGATGCTAAAGAGAGCTCGCCAAGCT
CTCGAGACTTGTGATCATGAACCTGGAGGAAACAGTCAAGGAAGTTCAGAACTCAAACCTGGAGAGGCAGCGAAAAAGG
CTACAGATAGATGAATTACAGGGCATTGCTAGGCTTAAAGAAGCAGAAGCAGATATGTTCCAGCTTAAAGGCAGATGAG
GCAAGACGAGAAGCTGACAGGTTGCAGAGGATTGCTCTTGCAAAATCAGGGAAATCAGAAGAAGACTATGCCAGCAGT
TACCTTAAACAACGTCTTAGTGAGGCTGAAGCTGAGAAGCAATTCCTTTTTGAGAAGATTAAACTTCAAGATCAGAGT
TCTCGTTTCATCACAAGGCAATGACATCGGTGATACTTCACAAGAAGCTTACTGTAAAATACAAGAGATCCTTAAGAGT
GTGTATGA

Kodierende DNA-Sequenz von CaRF2b aus *C. annuum*:

ATGGACCCTAAGTTCGCCGAAAGCCCATTCAGGCCCAATTCTATTTCGGGTCAAACCTGACCTGGACCAGATGCAAGAC
ACTCCAACACGAGCCCGCACCGCCGTGCCCAATCGGAAACCTTCTTCCGTTTCCCAGCTTCGACGATGACATGCTT
TTAGACGATGTCGTTTCCGACTTCAGCCTCGATGCTGTTTCGAGCTCCTACACTCATGCAACCTGCGAATTCACCCGAT
TCTTCTCCACTGGACCGGGTGATAACCCTAATAAACCCTATCTCATTATCGGAGTTTATCTGTTGATGCTGATTTT
TTTGACGGACTGGATTTTGGTCTGCCTCAATTGAGAAGAAGATGGTGATGGGTTCTGGACCGGTCATGGACATAGC
AATTCATGGATGGGCTTTTTGATACGACGTCGTTTGAGTCTGAATCGGTTTCGGTTAAGAAGGCATGGCTCCTGAT
AAGCTTGCTGAGCTGTCATTGATTGATCCTAAAAGAGCCAAAAGGATTCTAGCAAACAGGCAATCTGCTGCACGTTCT
AAGGAGCGAAAAATCGTTATACTAGCGAGCTAGAAAAGGAAAGTGCAGACTCTGCAGACTGAAGCCACCCTCTATCT
GCTCAGATCACGGTCTACAGAGAGACACTTTTGGATTAAATGCTGAAAACAAAGAACTGAAGCTTCGGTTGCAAGCT
TTGGAACAACAGGCACATCTTAGAGATGCTCTAAATGAAACGTTGAGGGAAGAAGTGCAGCGCCTTAAAGATTGAAGCA
GGTCAAATCCCAGCTGCAAATGGAATAGAGGAACCGCTCCTCATTACCTCCCCATCCACAGTCTTTGCTCAATGT
GGTAATCACCATGCACAACAGCAGCAAATTCGCGTCCGACCACAAGTAACCAAACCTGTCCCTGGGCAATCTCCAAAT
AGCTTCTTCAACTCAACAGGGCTTGA

Anhang

Anhang 7: Promotorsequenzen von *UPA20* und *Bs3* aus *C. annuum* ECW-30R

(A) Promotorsequenz von *UPA20* (GenBank: EU046276.1) und (B) Promotorsequenz von *Bs3* (GenBank: EU078684). Potentielle CAAT-Boxen sind unterstrichen und gelb hervorgehoben, das *UPA20*-EBE_{AvrBs3} *Bs3*-EBE_{AvrBs3} ist rot markiert und das Start-ATG fett hervorgehoben.

(A) *UPA20*-Promotor:

```
CGCAGGTT CGAATTC CCAATCCAA CAAT TTTGATGTTATAAATTTAG CAAT AAGCCAAGT ATTG AAAATAAAAGCAAA  
AAT ATTG TGTGACTCAGGGAT CAAT CCCTAGTCGTGTGGATGGAAG CAAT GACTTCAGCCAGCTCACCATGTGCAC  
ACCTAAGTGCACATATCATTTCATGTTGGGGTGCATTATTAATTATATCC CAAT TTTCTGAAGGTATATACACATAATTTT  
TTTCGATGTTAATGGGTGCACGTGCACCCCTACTAACACATGTTGGTCCGCCTCTGATTAGGATCCAACTAAATTTAA  
ATTTACATCAAAAAGTCCCATATTTAGATAAAAACACTTCTTAATAGGCGACCACCAACAACACTCAAACCCAAAATC  
TTTTGATTAAGAACAAAGAAATACTTACCTCTATC CAAT CGACTTCACACTCATTATCTACTTAATTTAAGTAAT  
ACATTAGACATAAATTT CAAT TTAACAAAAAACAACAAAAAACAAGAGTTTTGTCTATAGACTTAAGCTAGTAGC  
ATATTATTAAC TAGGCCACCTCCCTCCAAGCTTGATAAGACCAGTCAAATGCATGTAAATGAGCTTGAAGAAAA  
TAATTTTAGTAGGAGTAATTTTAACTAAAAAAGTTTTATTTCTATCTCTCTCTCATCTT TATATAAACCCTGACC  
CTTTGTGACATTTCTGAGACCCATTATTTTTTTCAGTTCCCTCTTGACTATTTCCCTCTGTTTACAATTTCTCTCTCC  
ATCACTTTCTGAAGCCTTCCATTTAGAATTCCAAAGCAAATCATAAACCCTGAAAAAGATG
```

(B) *Bs3*-Promotor:

```
CTACGGAATAGCAGCATTAAGGCACATCAGAGATTTTTTGGGTGTTAAGTTTGTGATGAAACCTGATGCCTCCACAGG  
AACTGT CAAT CTCATGTGTCTTGGCTCTGGTTTTTCAGAATTTATCCAGAAAAGTATCATGATAAATTAATGGTGTCTG  
TGTTTGGTGGCTTAGAGTGACGGCTAGATCAACATCTTTGGGATGCCTTGTGGAGTGAAATCAAGCATACTTTATCAT  
AGGCGAAATTTTTTGTGTTGGTTTGTCTGCTTGTAAATGAGAGAGTGATATAGGAAGCAAATGTGGAGATCACATTTGCT  
CATCTCCTTGTGCGTTGAAACTTTTGGTGTCAAGAGTTCTAATTCACATGTATTTGAAGATTCCTCATATGCTGCTT  
TTGTTTCTAATTAATTTTTTCTAGTAAGAAAACATTTGTTCCCTGAGTTTCCAAC TAGAAAAAATATCAAGTAAATAG  
AAT CAAT CATTTCCCTTACCAACGCTTGGTACTGCCAACCGCAACAAAGAATTAATGCAAAACAACAGTCTATTAAT  
ATCAACCTAGACTAAACTCCTTAGTTTTACTTTGAAATGCGAATGATACATGACACATTAGATTGTACTTGCTTTTTTA  
CCACAGATACAACGATACATTTGTATATCTTTTCCCTTATAGCAAACCTCTAATATATCATAGTCAAGTAAACGAAACT  
TATGCAAGGAAATATGAAATTAGTATGCAAGTAAACTCAAAGAACTAATCATTTGAACTGAAAGAT CAAT ATATCAA  
AAAAAACAACAA CAAT AAAACCGTTTAAACCGATAGATTAACCATTTCTGGTTTCAAGTTTATGGGTTAAACCA CAAT TT  
GCACACCCTGGTTAAA CAAT GAACACGTTTGCCTGAC CAAT TTTTATTA TATAAACCCTAACCATCCTCACAACCTCAAG  
TTATCATCCCCTTCTCTTTTCTCTCTTGTCTGTCACCCGCTAAATCTATCAAACACAAGTAGTCCCTAGTTGCA  
CATATATTTATG
```

Anhang

Anhang 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
Module und Vektoren				
pGEX300	Amp	<i>avrBs3</i> in pGEX-2TKM	Amplifikation von <i>avrBs3</i> -ORF-Submodulen	(Gürlebeck <i>et al.</i> , 2005)
pUCH2	Amp	<i>hax2</i> in pUC18	Amplifikation von <i>hax2</i> -ORF-Submodulen	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGA2	Spec	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem GFP-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGA8	Spec	Binärvektor mit 35S-Promotor, N-terminalem 4x-c-Myc-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGX1	Gent	Expressionsvektor für <i>Xanthomonas</i> mit 1 <i>xlac</i> -Promotor, C-terminalem FLAG-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGE2	Kan	Expressionsvektor für <i>E.coli</i> mit T7-Promotor, N-terminalem GST-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGE6	Kan	Expressionsvektor für <i>E.coli</i> mit T7-Promotor, N-terminalem His ₆ -TEV-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pUASTattB	Amp	Expressionsvektor für <i>Drosophila</i> GAL4/UAS-vermittelte Expression von Transgenen	Amplifikation von 5xUAS _{GAL4}	Bischoff <i>et al.</i> , 2007
pGBST7	Spec	Expressionsvektor für Hefe mit <i>ADH1</i> -Promotor, N-terminalem BD _{GAL4} und 4x-c-Myc-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette; Derivat von pGBKT7 (Clontech)	Y2H-Ködervektor für <i>gateway</i> -Klonierung	O. Kirchner und U. Bonas, unpubliziert
pACT2.2gtwy	Amp	Expressionsvektor für Hefe mit <i>ADH1</i> -Promotor, N-terminalem AD _{GAL4} , <i>ccdB</i> – Kasette; Derivat von pGadT7 (Clontech)	Y2H-Beutevektor für <i>gateway</i> -Klonierung	G. Caldwell, Addgene Plasmid 11346
pET-60-DEST	Amp	Expressionsvektor für <i>E.coli</i> mit T7-Promotor, N-terminalem GST-Thrombin-Epitop, C-terminalem His ₆ - Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette	<i>E.coli</i> Expressionsvektor für <i>gateway</i> -Klonierung	Novagen
pEGG(WS)	Kan	pENTR-D-Derivat mit „Golden-Gate“ kompatibler <i>ccdB</i> – Kasette mit Stop	Vektor-Modul für <i>golden-gate</i> -Klonierung	T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pEGG(WOS)	Kan	pENTR-D-Derivat mit „Golden-Gate“ kompatibler <i>ccdB</i> – Kasette ohne Stop		T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pAG424GPD	Amp	Expressionsvektor für Hefe mit <i>ADH1</i> -Promotor, <i>ccdB</i> – Kasette; Derivat von pRS42	Hefevektor für <i>gateway</i> -Klonierung	S. Lindquist, Addgene Plasmid 14152
pJet1.2: <i>N-avrBs3</i>	Amp	Modul für N-terminale Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 1-287) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i>	Schreiber <i>et al.</i> , 2014
pJet1.2: <i>rep-avrBs3</i>	Amp	Modul für <i>repeat</i> Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 288-886) in pJet1.2/Blunt		Schreiber <i>et al.</i> , 2014

Anhang

pJet1.2:AR ₁₋₁₅₈ -avrBs3	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 887-1044) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:C-avrBs3	Amp	Modul für C-terminale Region von <i>avrBs3</i> ohne Stop (kodiert AS 1045-1164) in pJet1.2/Blunt		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:CS-avrBs3	Amp	Modul für C-terminale Region von <i>avrBs3</i> mit Stop (kodiert AS 1045-1164) in pJet1.2/Blunt		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:LZm1	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Mutation von AS K935 und R936 zu Alanin in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur „ <i>golden-gate</i> “-Klonierung von <i>avrBs3</i> -LZ-Derivaten	diese Arbeit
pJet1.2:LZm2	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Mutation von AS L892, L899, L913 und L919 zu Alanin in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR ₁₋₄₅ -avrBs3	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 887-931) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von AR-Chimären	diese Arbeit
pJet1.2:AR ₄₆₋₁₅₈ -avrBs3	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 932-1044) in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:N-hax2	Amp	Modul für N-terminale Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1-287) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>hax2</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:rep-hax2	Amp	Modul für <i>repeat</i> -Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 288-1043) in pJet1.2/Blunt		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:AR ₁₋₁₅₈ -hax2	Amp	Modul für AR-Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1044-1201) in pJet1.2/Blunt		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:C-hax2	Amp	Modul für C-terminale Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1202-1322) in pJet1.2/Blunt		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:AR ₁₋₄₅ -hax2	Amp	Modul für AR-Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1044-1088) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von AR-Chimären	diese Arbeit
pJet1.2:AR ₄₆₋₁₅₈ -hax2	Amp	Modul für AR-Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1088-1201) in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-V3F	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von V3F in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i> -Einzel-AS-Substitutionen	diese Arbeit
pJet1.2:AR-H20R	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von H20R in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-L27I	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von L27I in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-P31S	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von P31S in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-D34N	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von D34N in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-K38D	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von K38D in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit

Anhang

pJet1.2:AR-H42N	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von H42N in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i> -Einzel-AS-Substitutionen	diese Arbeit
pJet1.2:AR-P44L	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von P44L in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR-A45T	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution von A45T in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR ₁₋₂₈ - <i>avrBs3</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 887-914) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur „ <i>golden-gate</i> “-Klonierung von AR-Chimären	diese Arbeit
pJet1.2:AR ₂₉₋₄₅ - <i>avrBs3</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> (kodiert AS 915-931) in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR ₁₋₂₈ - <i>hax2</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1044-1071) in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR ₂₉₋₄₅ - <i>hax2</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>hax2</i> (kodiert AS 1072-1088) in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR Δ ₂₋₄₆ - <i>avrBs3</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-46 in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von AR-Deletionen	diese Arbeit
pJet1.2:AR Δ ₄₅₋₁₅₅ - <i>avrBs3</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 45-155 in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:AR Δ ₃₋₁₅₅ - <i>avrBs3</i>	Amp	Modul für AR-Region von <i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 3-155 in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:BD _{GAL4}	Amp	Modul für die AS 1-147 der BD _{GAL4} aus <i>S. cerevisiae</i> in pJet1.2/Blunt	ORF-Modul zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von BD _{GAL4} -Derivaten	diese Arbeit
pJet1.2:AR ₁₅₈ -SV40-NLS	Amp	Modul für die SV40-NLS in pJet1.2/Blunt		T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:AD _{AvrBs3}	Amp	Modul für die AD von <i>AvrBs3</i> (AS 1133-1164) in pJet1.2/Blunt		T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:C- <i>avrBs3</i> Δ AD	Amp	Modul für C-terminale Region von <i>avrBs3</i> ohne AD (kodiert AS 1045-1133) in pJet1.2/Blunt	ORF-Module zur <i>golden-gate</i> -Klonierung	T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pENTR/D:5xUAS _{GAL4}	Kan	Klonierung der 5xUAS _{GAL4} in pENTR D	Erstellung des 5xUAS _{GAL4} -Reporterkonstrukts	diese Arbeit
pJet1.2:SICTD	Amp	AS 1528 bis 1846 der RNA-Polymerase II aus <i>S. lycopersicum</i> in pJet1.2/Blunt	ORF-Modul zur <i>golden-gate</i> -Klonierung	diese Arbeit
pJet1.2:N356	Amp	Modul für N-terminale Region von <i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-152 in pJet1.2/Blunt	ORF-Modul zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i>	S. Hahn und U. Bonas, unpubliziert
pJet1.2:N- <i>avrBs3</i> iAD	Amp	Modul für N-terminale Region von <i>avrBs3</i> mit Substitution an AS-Position L236 bis L240 zu Glycin in pJet1.2/Blunt	ORF-Modul zur <i>golden-gate</i> -Klonierung von <i>avrBs3</i>	diese Arbeit
pEGG(WOS): <i>avrBs3</i> Δ N2	Kan	<i>avrBs3</i> Δ N2 in pEGG(WOS) ohne Stop	pENTR-D-Derivat zur <i>gateway</i> -Klonierung	diese Arbeit

Anhang

pJet:gfp	Amp	<i>gfp</i> in pJet1.2/Blunt	ORF-Modul zur <i>golden-gate</i> -Klonierung	diese Arbeit
pJet1.2:SIZF	Amp	<i>SIZF</i> in pJet1.2/Blunt	ORF-Module für putative Interaktoren zur <i>golden-gate</i> -Klonierung	diese Arbeit
pJet1.2:SIKH	Amp	<i>SIKH</i> in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:CaRED	Amp	<i>CaRED</i> in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:CaNF-Y	Amp	<i>CaNF-Y</i> in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:CaCIP6	Amp	<i>CaCIP6</i> in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:CaRf2b	Amp	<i>CaRf2b</i> in pJet1.2/Blunt		diese Arbeit
pJet1.2:siZF-1	Amp	<i>silencing</i> -Konstrukt 1 für <i>NbZF</i>		Module für <i>silencing</i> -Konstrukte
pJet1.2:siZF-2	Amp	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbZF</i>	diese Arbeit	
pJet1.2:siRED-2	Amp	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbRED</i>	diese Arbeit	
pEGG(WOS):siZF-1	Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 1 für <i>NbZF</i>	Konstrukte für <i>silencing</i>	diese Arbeit
pEGG(WOS):siZF-2	Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbZF</i>		diese Arbeit
pEGG(WOS):siRED-2	Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbRED</i>		diese Arbeit
pENTR/D:siRED-1	Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 1 für <i>NbRED</i>		diese Arbeit
Effektorkonstrukte für Reporteragenaktivierungsstudien in <i>N. benthamiana</i>				
pGWB3:UPA20-EBE	Kan	<i>uidA</i> -Gen unter Kontrolle des UPA20-EBE am 5'Ende des 74 Bp-Fragments des Bs4-Promotors in pGWB3	Reporterkonstrukt zur Untersuchung von Effektor vermittelter Reporteragenaktivierung	H. Scholze, Doktorarbeit, 2011
pGWB3:Hax2-EBE	Kan	<i>uidA</i> -Gen unter Kontrolle des Hax2-EBE am 5'Ende des 74 Bp-Fragments des Bs4-Promotors in pGWB3		H. Scholze und J.Boch, unpubliziert
pGGA8:gfp	Spec	<i>gfp</i> in pGGA8	Konstrukt zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten Transformation in <i>N. benthamiana</i>	Schreiber <i>et al.</i> , 2014
pGGA8:avrBs3	Spec	<i>avrBs3</i> in pGGA8		Schreiber <i>et al.</i> , 2014
pGGA8:avrBs3-LZm1	Spec	<i>avrBs3</i> mit Mutation von K935 und R936 zu Alanin in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-LZ-Derivaten in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8:avrBs3-LZm2	Spec	<i>avrBs3</i> mit Mutation von L892, L899, L913 und L919 zu Alanin in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8:avrBs3AR ₁₋₁₅₈	Spec	<i>avrBs3</i> mit den AS 1-158 von Hax2 in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-Chimären in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8:avrBs3AR ₁₋₄₅	Spec	<i>avrBs3</i> mit den AS 1-45 von Hax2 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8:avrBs3AR ₄₆₋₁₅₈	Spec	<i>avrBs3</i> mit den AS 46-158 von Hax2 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8:hax2	Spec	<i>hax2</i> in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von Hax2-Chimären in <i>N. benthamiana</i>	A. Sorgatz, unpubliziert
pGGA8:hax2AR ₁₋₁₅₈	Spec	<i>hax2</i> mit den AS 1-158 von AvrBs3 in pGGA8		A. Sorgatz, unpubliziert
pGGA8:hax2AR ₁₋₄₅	Spec	<i>hax2</i> mit den AS 1-45 von AvrBs3 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8:hax2AR ₄₆₋₁₅₈	Spec	<i>hax2</i> mit den AS 46-158 von AvrBs3 in pGGA8		diese Arbeit

Anhang

pGGA8: <i>avrBs3AR-V3F</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von V3F in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-Einzel-AS-Substitutionen in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-H20R</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von H20R in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-L27I</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von L27I in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-P31S</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von P31S in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-D34N</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von D34N in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-K38D</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von K38D in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-H42N</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von H42N in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-P44L</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von P44L in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR-A45T</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Substitution von A45T in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR</i> ₁₋₂₈	Spec	<i>avrBs3</i> mit den AS 1-28 von Hax2 in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-Chimären in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3AR</i> ₂₉₋₄₅	Spec	<i>avrBs3</i> mit den AS 29-45 von Hax2 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>hax2AR</i> ₁₋₂₈	Spec	<i>hax2</i> mit den AS 1-28 von AvrBs3 in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von Hax2-Chimären in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>hax2AR</i> ₂₉₋₄₅	Spec	<i>hax2</i> mit den AS 29-45 von AvrBs3 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3ARA</i> ₂₋₄₆	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-46 in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-AR-Deletionen in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3ARA</i> ₄₅₋₁₅₅	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 45-155 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3ARA</i> ₃₋₁₅₅	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 3-155 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3-NR</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Insertion von 14 AS N-terminal der <i>repeat</i> -Region in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von AvrBs3-Derivaten in <i>N. benthamiana</i>	J. Haase und U.Bonas, unpubliziert
pGGA8: <i>avrBs3-CR1</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion des partiellen 18. <i>Repeats</i> (AS 867-886) in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>avrBs3-CR2</i>	Spec	<i>avrBs3</i> Insertion von 14 AS C-terminal der <i>repeat</i> -Region in pGGA8		J. Haase und U.Bonas, unpubliziert
pGGA8: <i>avrBs3-His₆-C</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Insertion von 6xHis zwischen <i>repeat</i> - und AR-Region in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>BD_{GAL4}AD_{AvrBs3}</i>	Spec	Fusion der AS 1-147 der BD _{GAL4} und der AD von AvrBs3 in pGGA8	Konstrukte zur <i>Agrobacterium</i> vermittelten transienten Transformation und Expression von BD _{GAL4} -Derivaten in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>BD_{GAL4}C</i>	Spec	Fusion der AS 1-147 der BD _{GAL4} und den AS 887-1164 von AvrBs3 in pGGA8		diese Arbeit
pGGA8: <i>BD_{GAL4}CΔAD</i>	Spec	Fusion der AS 1-147 der BD _{GAL4} und den AS 887-1133 von AvrBs3 in pGGA8		diese Arbeit

Anhang

pGWB3:5xUAS _{Gal4}	Spec	<i>uidA</i> -Gen unter Kontrolle 5xUAS _{Gal4} -Elementes am 5'Ende des Bs4-Promotors in pGWB3	Reporterkonstrukt zur Effektor vermittelten Reporterogenaktivierung	diese Arbeit	
pGGA2:LV	Spec	Leervektor für pGGA2	<i>Agrobacterium</i> vermittelte transiente Transformation und Expression von GFP-Fusionproteinen in <i>N. benthamiana</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert	
pGGA2: <i>SIZF</i>	Spec	AS 1-425 von <i>SIZF</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA2: <i>SIKH</i>	Spec	AS 1-617 von <i>SIKH</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA2: <i>CaRED</i>	Spec	AS 1-557 von <i>CaRED</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA2: <i>CaNF-Y</i>	Spec	AS 1-260 von <i>CaNF-Y</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA2: <i>CaCIP6</i>	Spec	AS 1-547 von <i>CaCIP6</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA2: <i>CaRf2b</i>	Spec	AS 1-320 von <i>CaRf2b</i> in pGGA2		diese Arbeit	
pGGA8: <i>SIZF</i>	Spec	AS 1-425 von <i>SIZF</i> in pGGA8		<i>Agrobacterium</i> vermittelte transiente Transformation und Expression von 4x-c-Myc-Fusionproteinen in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8: <i>SIKH</i>	Spec	AS 1-617 von <i>SIKH</i> in pGGA8			diese Arbeit
pGGA8: <i>CaRED</i>	Spec	AS 1-557 von <i>CaRED</i> in pGGA8			diese Arbeit
pGGA8: <i>CaNF-Y</i>	Spec	AS 1-260 von <i>CaNF-Y</i> in pGGA8	diese Arbeit		
pGGA8: <i>CaCIP6</i>	Spec	AS 1-547 von <i>CaCIP6</i> in pGGA8	diese Arbeit		
pGGA8: <i>CaRf2b</i>	Spec	AS 1-320 von <i>CaRf2b</i> in pGGA8	diese Arbeit		
pGGA28: <i>AvrBs3</i>	Spec	<i>avrBs3</i> in pGGA28	<i>Agrobacterium</i> vermittelte transiente Transformation und Expression von Fusionproteinen für BiFC in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit	
pGGA30: <i>Calmpα</i>	Spec	<i>Calmpα1</i> in pGGA28		diese Arbeit	
pGGA30:LV	Spec	Leervektor für pGG30		diese Arbeit	
pGGA30: <i>BD_{GAL4}</i>	Spec	<i>BD_{GAL4}</i> in pGGA30		diese Arbeit	
pGGA2: <i>avrBs3ΔN2</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-152 in pGGA2	<i>Agrobacterium</i> vermittelte transiente Transformation und Expression von GFP-Fusionproteinen in <i>N. benthamiana</i>	M. Warlich und U. Bonas, unpubliziert	
pGGA2: <i>avrBs3ΔN2ΔAD</i>	Spec	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-152 und 1134 -1164 in pGGA2		diese Arbeit	
TRV1	Kan	<i>Silencing</i> -Vektor	Konstrukte für <i>silencing</i>	Liu <i>et al.</i> , 2002	
TRV2a: <i>sigfp</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt für <i>gfp</i>		Gürlebeck 2007	
TRV2a: <i>siNbPDS</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt für <i>NbPDS</i>		Gürlebeck 2007	
TRV2a: <i>siUPA20</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt für <i>NbUPA20</i>		Kay <i>et al.</i> , 2007	
pTRV2a: <i>siZF-1</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 1 für <i>NbZF</i>		diese Arbeit	
pTRV2a: <i>siZF-2</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbZF</i>		diese Arbeit	
pTRV2a: <i>siRED-1</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 1 für <i>NbRED</i>		diese Arbeit	
pTRV2a: <i>siRED-2</i>	Amp, Kan	<i>silencing</i> -Konstrukt 2 für <i>NbRED</i>		diese Arbeit	
Effektorkonstrukte für <i>Xanthomonas</i>-Infektionsstudien					
pGGX1:LV	Gent	Leervektor von pGGx1	Expression in <i>Xanthomonas</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert	

Anhang

pGGX1: <i>avrBs3</i>	Gent	<i>avrBs3</i> in pGGX1	Expression in <i>Xanthomonas</i>	A. Sorgatz und U.Bonas, unpubliziert
pGGX1: <i>avrBs3-LZm1</i>	Gent	<i>avrBs3-LZm1</i> mit Mutation von K935 und R936 zu Alanin in pGGX1	Expression von AvrBs3-LZ-Derivaten in <i>Xanthomonas</i>	diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3-LZm2</i>	Gent	<i>avrBs3</i> mit Mutation von L892, L899, L913 und L919 zu Alanin in pGGX1		diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3AR</i> ₁₋₄₅	Gent	<i>avrBs3</i> mit den AS 1-45 von Hax2 in pGGX1	Expression von AvrBs3-Chimären in <i>Xanthomonas</i>	diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3AR</i> ₄₆₋₁₅₈	Gent	<i>avrBs3</i> mit den AS 46-158 von Hax2 in pGGX1		diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3ΔAR</i> ₂₋₄₆	Gent	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-46 in pGGX1	Expression von AvrBs3-AR-Deletionen in <i>Xanthomonas</i>	diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3ΔAR</i> ₄₅₋₁₅₅	Gent	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 45-155 in pGGX1		diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3ΔAR</i> ₃₋₁₅₅	Gent	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 3-155 in pGGX1		diese Arbeit
Effektorkonstrukte für Expression in <i>E.coli</i>				
pGGE6: <i>avrBs3</i>	Kan	<i>avrBs3</i> in pGGE6	Expression von His ₆ -Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	diese Arbeit
pGGE6: <i>avrBs3AR</i> ₁₋₄₅	Kan	<i>avrBs3</i> mit den AS 1-45 von Hax2 in pGGE6		diese Arbeit
pDEST17: <i>avrBs3ΔN2</i>	Amp	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-152 in pDEST17		T. Schreiber und U.Bonas, unpubliziert
<i>pGGE6:gfp</i>	Kan	<i>gfp</i> in pGGE6		diese Arbeit
pET-60-DEST: <i>avrBs3ΔN2</i>	Amp	<i>avrBs3</i> mit Deletion der AS 2-152 in pET-60-DEST	Expression von GST-AvrBs3-His ₆ in <i>E.coli</i>	diese Arbeit
pDEST15:LV	Amp	Leervektor für pDEST15	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	O. Müller und U.Bonas, unpubliziert
pDEST15: <i>Calmpα</i>	Amp	<i>Calmpα</i> in pDEST15		T.Schreiber und U.Bonas, unpubliziert
pGGE2: <i>SICTD</i>	Kan	AS 1528 bis 1846 der RNA-Polymerase II aus <i>S. lycopersicum</i> in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>SIZF</i>	Kan	AS 1-425 von SIZF in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>SIKH</i>	Kan	AS 1-617 von SIKH in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>CaRED</i>	Kan	AS 1-557 von CaRED in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>CaNF-Y</i>	Kan	AS 1-260 von CaNF-Y in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>CaCIP6</i>	Kan	AS 1-547 von CaCIP6 in pGGE2		diese Arbeit
pGGE2: <i>CaRf2b</i>	Kan	AS 1-320 von CaRf2b in pGGE2		diese Arbeit
Konstrukte für Expression in Hefe				
pGBST7:LV	Spec	Leervektor für pGBST7	Expression von Y2H-Köderkonstrukten in <i>S. cerevisiae</i>	H. Berndt und U.Bonas, unpubliziert
pGBST7: <i>GAL4</i>	Spec	<i>AD_{Gal4}</i> in pGBST7 (Positivkontrolle)		H. Berndt und U.Bonas, unpubliziert
pGBST7: <i>avrBs3iAD</i>	Spec	<i>avrBs3iAD</i> in pGBST7		diese Arbeit

Anhang

pACT2.2: <i>SICTD</i>	Amp	AS 1528 bis 1846 der RNA-Polymerase II aus <i>S. lycopersicum</i> in pACT2.2	Expression von Y2H-Beutekonstrukten in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pACT2.2:LV	Amp	Leervektor für pACT2.2		diese Arbeit
pAG424GPD: <i>BD_{GAL4}</i>	Amp	AS 1-147 der <i>BD_{GAL4}</i> in pAG424GPD	Expression von Y2H-Köderkonstrukten in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pAG424GPD: <i>Gal4</i>	Amp	AS 1-147 der <i>BD_{GAL4}</i> und AS 768–881 der <i>AD_{GAL4}</i>		diese Arbeit
pAG424GPD: <i>BD_{GAL4}C</i>	Amp	Fusion der <i>BD_{GAL4}</i> und den AS 887-1164 von <i>AvrBs3</i> in pAG424GPD		diese Arbeit
pAG424GPD: <i>BD_{GAL4}CΔAD</i>	Amp	Fusion der <i>BD_{GAL4}</i> und den AS 887-1133 von <i>AvrBs3</i> in pAG424GPD		diese Arbeit
pAG424GPD: <i>BD_{GAL4}CΔAR</i>	Amp	Fusion <i>BD_{GAL4}</i> und den AS 1036-1133 von <i>AvrBs3</i> in pAG424GPD		diese Arbeit
pACT2.2: <i>SIZF</i>	Amp	AS 1-425 von <i>SIZF</i> in pACT2.2		Expression von Y2H-Köderkonstrukten in <i>S. cerevisiae</i>
pACT2.2: <i>SIKH</i>	Amp	AS 1-617 von <i>SIKH</i> in pACT2.2	diese Arbeit	
pACT2.2: <i>CaRED</i>	Amp	AS 1-557 von <i>CaRED</i> in pACT2.2	diese Arbeit	
pACT2.2: <i>CaNF-Y</i>	Amp	AS 1-260 von <i>CaNF-Y</i> in pACT2.2	diese Arbeit	
pACT2.2: <i>CaCIP6</i>	Amp	AS 1-547 von <i>CaCIP6</i> in pACT2.2	diese Arbeit	
pACT2.2: <i>CaRf2b</i>	Amp	AS 1-320 von <i>CaRf2b</i> in pACT2.2	diese Arbeit	

Anhang

Anhang 9: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
MutLZ_2/3_fwd	GTTGCCAGGCTCTCGCCCTGATCCGG CGGCCGCCGCGTTG	Mutagenese-Primer für LZm2 (L892 und L899 in AvrBs3 zu Alanin)
MutLZ_2/3_rev	CAACGCGCGGCCGCCGGATCAGGGCGA GAGGCCTGGGCAAC	Mutagenese-Primer für LZm2 (L892 und L899 in AvrBs3 zu Alanin)
MutLZ_5/6_fwd	CCTTGGCCTGCGCCGGCGGACGTCCTGC GGCGGATGCAGTG	Mutagenese-Primer für LZm2 (L913 und L919 in AvrBs3 zu Alanin)
MutLZ_5/6_rev	CACTGCATCCGCCGAGGACGTCGCCG GCGCAGGCCAAGG	Mutagenese-Primer für LZm2 (L913 und L919 in AvrBs3 zu Alanin)
AR_02_KR48/49AA_fwd	TTTGGTCTCTTTGATCGCAGCAACCAAT C	Mutagenese-Primer für LZm1 (K935 und R936 in AvrBs3 zu Alanin)
Cand-7-01-fwd	GAATCAGAATTGCTTTAATCTTGTTCA	RT-PCR <i>Bs3</i> (Römer <i>et al.</i> , 2007)
Cand-7-01-rev	TGATTCTTGCTACATTTGTTCTTTCC	RT-PCR <i>Bs3</i> (Römer <i>et al.</i> , 2007)
RS-EFrt-F1	AGTCAACTACCACTGGTCAC	(q)RT-PCR <i>EF1α</i> (Römer <i>et al.</i> , 2007)
RS-EFrt-R1	GTGCAGTAGTACTTAGTGGTC	(q)RT-PCR <i>EF1α</i> (Römer <i>et al.</i> , 2007)
hax34_C_F	TTTGGTCTCAAGCATTGTGCCAGTTA TCTC	Amplifikation der AR-Region von AvrBs3
hax2_C_F	TTTGGTCTCAAGCATTGTTGCACAGTTA TCTC	Amplifikation der AR-Region von Hax2/ Erstellung von AvrBs3AR-V3F
hax_C_LZ_rev	TTTGGTCTCGGCGAATGCATGCAAAGAC	Amplifikation der AR-Region von AvrBs3 bzw. Hax2 (AS 158)
AR_01_rev_AvrBs3	TTTGGTCTCTTCAAGCCGGCGCGTGCG G	Amplifikation der AR-Region von AvrBs3 (AS 1-46)
AR_01_rev_Hax2	TTTGGTCTCTTCAATGTCAGCGCATTCG G	Amplifikation der AR-Region von Hax2 (AS 1-46)
AR_02_fwd_AvrBs3	TTTGGTCTCTTTGATCAAAAAGAACCAAT C	Amplifikation der AR-Region von AvrBs3 (AS 46-156)
AR_02_fwd_Hax2	TTTGGTCTCTTTGATCAGAAGAGCCAAT AGC	Amplifikation der AR-Region von Hax2 (AS 46-156)
AR_01_300_H20R-fwd	GCGTTGACCAACGACCGCTCGTCGCC	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-H20R
AR_01_300_H20R-rev	GGCGACGAGCGGTCGTTGGTCAACGC	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-H20R
AR_01_300_L27I-fwd	GCCTTGGCCTGCATTGGCGGACGTCC	Modul für AR-Region (AS 1-46) von AvrBs3 mit L27I
AR_01_300_L27I-rev	GGACGTCCGCCAATGCAGGCCAAGGC	Modul für AR-Region (AS 1-46) von AvrBs3 mit L27I
Mut_P31S_fwd	CGGCGGACGTTCTGCGCTGGATGC	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-P31S
Mut_P31S_rev	GCATCCAGCGCAGAACGTCCGCCG	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-P31S
Mut_D34N_fwd	CGTTCTGCGCTGAATGCAGTGA AAAAAGG G	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-D34N
Mut_D34N_rev	CCCTTTTCACTGCATTGAGCGCAGAAC G	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR- D34N
Mut_K38D_fwd	GCAGTAAAAGATGGATTGCCGCACGC	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-K38D
Mut_K38D-rev	GCGTGGCGCAATCCATCTTCACTGC	Mutagenese-Primer für AvrBs3AR-K38D
AR_01_300_H42N-rev	TTTGGTCTCTTCAAGCCGGCGCGTTCCG G	Amplifikation der AR-Region (AS 1-46) von AvrBs3 mit H42N
AR_01_300_P44L-rev	TTTGGTCTCTTCAAGCCAGCGCGTGCG G	Amplifikation der AR-Region (AS 1-46) von AvrBs3 mit P44L
AR_01_300_A45T-rev	TTTGGTCTCTTCAAGCCAGCGCGTGCG G	Amplifikation der AR-Region (AS 1-46) von AvrBs3 mit A45T
AR01-300-1-rev	TTTGGTCTCACGCCGAGGCAGGCCAAGG CG	Amplifikation der AR-Region von AvrBs3 (AS 1-28)
AR01-300-2-fwd	GGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAAGTGA AAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGCC	Klonierung der AR-Region von AvrBs3 (AS 29-46)
AR01-300-2-rev	TCAAGCCGGCGCGTGGCGCAATCCCTT TTCACTGCATCCAGCGCAGGACGTC	Klonierung der AR-Region von AvrBs3 (AS 29-46)
AR01-Hax2-1-rev	TTTGGTCTCACGCCGATGCAGGCCAAGG CG	Amplifikation der AR-Region von Hax2 (AS 1-28)

Anhang

AR01-Hax2-2-fwd	GGCGGACGCTCTGCGCTGAATGCAGTGA AAGACGGATTGCCGAATGCGCTGACA	Klonierung der AR-Region von Hax2 (AS 29-46)
AR01-Hax2-2-rev	TCAATGTCAGCGCCATTCGGCAATCCGT CTTTCACGCATGCGCAGAGCGTC	Klonierung der AR-Region von Hax2 (AS 29-46)
E1U20-F	TTCATCTTTATATAAACCTGACCCTTTG TGACATTC	EMSA (Kay <i>et al.</i> , 2007)
E1U20-R	GAATGTCACAAAGGGTCAGGTTTATATA AAGATGAA	EMSA (Kay <i>et al.</i> , 2007)
ARH2-d2-45	TTTGGTCTCAAGCATCAGAAGAGCCAAT AGCCG	Klonierung der AR-Region von AvrBs3 (Deletion AS 2-46)
C300(dAR48-156)-F	TTTGGTCTCATTTGATCGCCGATTCGCTG GAGCGTGACC	Klonierung der AR-Region von AvrBs3 (Deletion AS 45-156)
C300(dAR3-155)-F	TTTGGTCTCAAGCATTGCCGATTCGCTG GAGCGTGC	Klonierung der AR-Region von AvrBs3 (Deletion AS 3-155)
rep17stop-R	Pho-TGCTGCCATGGGCCTGGCACAGC	Mutagenese Primer für AvrBs3-CR1
6xHis_fwd	AGCATTCATCATCATCATCATCAT	His ₆ -Modul zwischen <i>repeat</i> - und AR-Region
6xHis_rev	TGCTATGATGATGATGATGATGAA	His ₆ -Modul zwischen <i>repeat</i> - und AR-Region
Gal4-DBD-F	TTTGGTCTCATATGAAGCTACTGTCTTC	Amplifikation der BD _{Gal4}
Gal4-DBD-NLS-R	TTTGGTCTCAGCGAACGATACAGTCAAC	Amplifikation der BD _{Gal4} mit Überhang zur SV40-NLS
Gal4-DBD-AR-R	TTTGGTCTCATGCTCGATACAGTCAACT G	Amplifikation der BD _{Gal4} mit Überhang zur AR-Region
5xGal4/UAS-F	CACCATACGAAGTTATGCTAGCGG	Klonierung des 5xUAS _{Gal4} -Reporters
5xGal4/UAS-R	TGTTTGAATTGAATTGTCGCTCCG	Klonierung des 5xUAS _{Gal4} -Reporters
PollI-CTD-F	TTTGGTCTCATATGCCGTATGTGGGTGG	Klonierung der SICTD
PollI-CTD -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATCACCCAGCCT TGTCATC	Klonierung der SICTD
Gal4-DBD(ADGal4)-R	TTTGGTCTCAGGATACAGTCAACTGTC	Amplifikation der BD _{Gal4} mit Überhang zur AD _{Gal4}
Mut-iAD1/2-F	CGCACGCGCTGGGGAGGCCTTGGGCACG GTGGCG	Mutagenese-Primer für AvrBs3iAD
Mut-iAD1/2-R	CGCCACCGTGCCCAAGGCCTCCCGAGCG CGTGCG	Mutagenese-Primer für AvrBs3iAD
Gal4-AD-F	TTTGGTCTCAATCGAATTTAATCAAAG TG	Amplifikation der AD _{Gal4}
Gal4-AD-R	TTTGGTCTCAAAGCTTACTCTTTTTTTG GG	Amplifikation der AD _{Gal4}
OMS_EV_F	TATGTGATAATAG	Klonierung für ORF-Modul Stop
OMS_EV_R	AAGCCTATTATCA	Klonierung für ORF-Modul Stop
Gal4-DBD-Stop-R	TTTGGTCTCAAAGCTTCAGGATACAGTC AAC	Amplifikation der BD _{Gal4} mit Stop
T7Seq-Primer-F	AATACGACTCACTATAGGGCG	Sequenzierprimer für pGADT7 (Clontech)
ADSeq-Primer-R	AGATGGTGACGATGCACAG	Sequenzierprimer für pGADT7 (Clontech)
B25(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGGATTCTTCAACGTC CATG	Klonierung von SIZF
B25(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCACTATGTATCG ATGGAC	Klonierung von SIZF
B51(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGGGTGAGACTGGAAA AAGATCG	Klonierung von SIKH
B51(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCACTGTGCCATT ATGAATGC	Klonierung von SIKH
B64(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGTCTTCTCCAAGCG AATTC	Klonierung von CaRED
B64(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAACCCGCTGC TTCTTTCC	Klonierung von CaRED
C13(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGGACAACAACACCAA C	Klonierung von CaNF-YC

Anhang

C13(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATAAAATTTGGC CG	Klonierung von CaNF-YC
C24(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGCTGCCTCCACGTCC C	Klonierung von CaCIP6
C24(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAACACTCTTAA GG	Klonierung von CaCIP6
C47(ORF)-F	TTTGGTCTCATATGGACCCTAAGTTCG	Klonierung von CaRF2b
C47(ORF)-R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAAGCCCTGTTG	Klonierung von CaRF2b
siB25-1-F	TTTGGTCTCATATGTGAGCTCTTGACTT CGCAATTGG	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siZF1</i>
siB25-1-R	TTTGGTCTCTAAGCCTAAGGCATCTCTG GAATTGCATT	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siZF1</i>
siB25n-F	TTTGGTCTCATATGTGAGCTCTTGACTT CGCAATTGG	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siZF2</i>
siB25n-R	TTTGGTCTCTAAGCCTAAGGCATCTCTG GAATTGCATTCTC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siZF2</i>
siB64-1-F	CACCATGTCTTCCTCCAAACG	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siRED1</i>
siB64-1-R	TCATGGTCTTTATAACAGTC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siRED1</i>
siB64n-F	TTTGGTCTCATATGATGATACAGAAACT GTGCCTCAATCTG	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siRED2</i>
siB64n-R	TTTGGTCTCTAAGCATATCATAATTCTG CTGGAGATATTGCTC	Klonierung von <i>silencing</i> -Fragment <i>siRED2</i>
rtsiB25-F	CTGGGACTACTCAGGGGAC	qRT-PCR <i>siZF</i>
rtsiB25-R	TGGCTTCCCATATCTCCTTG	qRT-PCR <i>siZF</i>
rtsiB64-F	GCCTTGGATCATCAGGAAAAG	qRT-PCR <i>siRED</i>
rtsiB64-R	AATCTTGCCATTCTGGTTGG	qRT-PCR <i>siRED</i>
qRT-Bs3-F	GTAACTTCTTGGTTAATGGAGAGTGAAT TG	qRT-PCR <i>Bs3</i>
qRT-Bs3-R	TGATTCTTGTGCTACATTTGTTCTTCC	qRT-PCR <i>Bs3</i>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Ich bedanke mich für ihre Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Sabine Thieme und Doreen Blüher sei für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie für die nützlichen Ratschläge gedankt.

Ein großes Dankeschön geht vor allem an Doreen Blüher für die vielen Diskussionen zu Arbeitsthemen und darüber hinaus, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Besonders möchte ich mich bei Jana Streubel für ihre Freundschaft und Hilfe bei Problemen jeglicher Art bedanken. Danke, dass Du immer für mich da warst.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bonas bedanke ich mich für die erhaltene Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Tom Schreiber danke ich für die Zusammenarbeit und manch beharrliche Diskussion. Für wertvolle Tipps danke ich Jens Boch und Heike Berndt ebenso Marina, Bianca und Carola, ohne die ein zügiges und effektives Arbeiten nicht möglich gewesen wäre. Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Tom Schreiber, Jana Streubel, Annekatri Richter, Oliver Müller, Tina Hoppe, Anne Banik und Juliane Brock, bedanken, die sehr positiv zum Labor- und Pausenklima beigetragen haben.

Meinen Eltern, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre, danke ich für ihre Liebe, ihr Vertrauen und Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation in einer Fachzeitschrift eingereicht:

Tom Schreiber, Anika Sorgatz, Felix List, Doreen Blüher, Sabine Thieme, Matthias Wilmanns and Ulla Bonas. Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3. PLoS ONE. *in revision*

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Anika Sorgatz
Geburtsdaten: 03. September 1984, Halle/Saale
Anschrift: Schieloer Str. 2, 06124 Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

06/2010-12/2014 **Promotionsarbeit** am Institut für Biologie, Fachbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, in der Gruppe von Frau Professor Dr. Ulla Bonas
Thema: Funktionelle Charakterisierung des C-terminalen Bereiches von AvrBs3 aus *Xanthomonas* und Identifizierung neuer pflanzlicher Interaktionspartner

06/2009-05/2010 **Diplomarbeit** am Institut für Biologie, Fachbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, in der Gruppe von Frau Professor Dr. Ulla Bonas
Thema: Untersuchung der Rolle eines C-terminalen Bereiches von AvrBs3
Abschluss: Diplom-Biologin

07/2008 - 12/2008 **Auslandssemester** an der University of Queensland, Australien

10/2004 – 05/2010 **Studium Diplom-Biologie** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1996 - 2004 Gymnasium im Bildungszentrum in Halle/Saale
Abschluss: Abitur

1995 – 1996 Adolf-Reichwein-Gymnasium in Halle/Saale

1991 – 1995 Grundschule Ulrich von Hutten in Halle/Saale

Halle/Saale, 18.12.2014

Erklärung

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

Halle/Saale, 18.12.2014

Anika Sorgatz