

**Charakterisierung der Avirulenzaktivität von XopQ und
Identifizierung möglicher Interaktoren von XopL
aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

DISSERTATION

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Norman Adlung

geb. am 08.09.1986 in Gera

Gutachter:

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

Verteidigung: 09. März 2016

Zusammenfassung

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen. Essenzieller Pathogenitätsfaktor von *Xcv* ist das Typ III-Sekretionssystem, das über 30 verschiedene Effektorproteine vom bakteriellen Zytoplasma direkt in die Pflanzenzellen transloziert. Zellen suszeptibler Wirtspflanzen werden von diesen Typ III-Effektoren (T3E) zum Vorteil des Bakteriums manipuliert. Resistente Wirtspflanzen kodieren sog. Resistenzgene, die die Erkennung einzelner T3E (sog. Avirulenzproteine) vermitteln. Die dadurch induzierten Resistenzreaktionen resultieren häufig in einer hypersensitiven Reaktion (HR), einem schnellen, lokalen Zelltod des infizierten Gewebes. Die am weitesten verbreitete Form pflanzlicher Abwehrprozesse ist allerdings die Nicht-Wirtsresistenz (NWR), die Resistenz aller Genotypen einer Pflanzenart gegenüber allen Genotypen einer Pathogenart. NWR kann sowohl durch Erkennung von Effektoren als auch von konservierten Pathogen- bzw. Mikroben-assoziierten Molekülen vermittelt werden und in einer HR resultieren, oder ohne HR verlaufen. In dieser Arbeit wurden die Reaktionen von 86 Nicht-Wirtspflanzen der Familie *Solanaceae* nach *Xcv*-Infektion und transienter Expression 21 verschiedener *Xcv*-T3E untersucht. Die pflanzlichen Reaktionen waren divers und ihre Verteilung nur in einigen Fällen phylogenetisch konserviert. Der T3E XopQ löste in den meisten untersuchten Linien der Gattung *Nicotiana* eine sichtbare Reaktion nach transienter Synthese aus. Ein *xopQ*-defizienter *Xcv*-Stamm führte in diesen Linien meist zu schwächeren NWR-Reaktionen im Vergleich zum Wildtyp. In *N. paniculata* und *N. benthamiana* löste der *xopQ*-defiziente Stamm keine NWR aus, sondern charakteristische Krankheitssymptome bei >100-fach erhöhtem *in planta*-Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Damit stellt XopQ einen Avirulenzfaktor dar. Auf Grundlage der von A. Singer und A. Savchenko (Universität Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellten, unveröffentlichten XopQ-Kristallstruktur wurden 34 verschiedene XopQ-Derivate erstellt. Deren Charakterisierung lässt vermuten, dass strukturelle Bereiche von XopQ in *Nicotiana*-Linien erkannt werden. In *N. benthamiana* korreliert die Avirulenzaktivität von XopQ-Derivaten nicht mit der Aktivität, eine sichtbare Pflanzenreaktion nach transienter Expression auszulösen, sodass *N. benthamiana* möglicherweise zwei verschiedene Resistenzproteine zur Erkennung von XopQ kodiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass XopQ in *N. benthamiana* Zelltodreaktionen supprimiert, die durch drei andere *Xcv*-T3E ausgelöst werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) die Krankheitssymptome und das bakterielle Wachstum bei der *Xcv*-Infektion von Tomatenpflanzen beeinflusst. Die Sichtung einer cDNA-Bibliothek mit XopL, einem T3E mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, identifizierte u. a. eine Komponente des ABA-Signalweges als möglichen XopL-Interaktor. Die Proteinabundanz dieser Komponente ist in Abhängigkeit von der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL *in planta* reduziert. Möglicherweise manipuliert XopL ABA-Signalwege zum Vorteil von *Xcv*.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of the bacterial spot disease on pepper and tomato plants. An essential pathogenicity factor of *Xcv* is the type III secretion system that translocates more than 30 different type III effector proteins (T3E) directly into the plant cytosol. Cells of susceptible host plants are manipulated by T3E for the benefit of the bacterium. Resistant host plants encode resistance genes, which mediate the recognition of certain T3E (designated as avirulence proteins). The recognition induces a resistance reaction that often results in a hypersensitive reaction (HR), a fast, local cell death of the infected tissue. The most common type of plant resistance is the non-host resistance (NWR) defined as resistance of all genotypes of a plant species against all genotypes of a pathogen species. NWR can be mediated by recognition of effectors, as well as conserved pathogen/microbe associated molecules and might also trigger a HR. In this work, reactions of 86 non-host plants of the family *Solanaceae* were analyzed after *Xcv* infection and after transient expression of 21 different *Xcv* T3E. Plant reactions were diverse and in some cases phylogenetically conserved. The T3E XopQ triggered visible reactions after transient expression in most *Nicotiana* lines. *Xcv* infection of these plant lines resulted mostly in reduced NWR-reactions when *xopQ* was deleted compared to the wild type *Xcv*. In *N. paniculata* und *N. benthamiana*, the *xopQ*-deficient strain elicited characteristic disease symptoms and a >100-fold increased *in planta* growth compared to the wild type strain. Thus, XopQ is a avirulence determination factor. Based on the unpublished crystal structure of XopQ that was provided by A. Singer and A. Savchenko (University of Toronto, Canada), 34 XopQ derivatives were characterized. The results indicate that structural parts of XopQ are recognized in *Nicotiana* lines. In *N. benthamiana*, the avirulence activity of XopQ doesn't correlate with its activity to trigger visible reactions after transient expression. Thus, *N. benthamiana* might encode two different XopQ-specific resistance proteins. In addition, XopQ suppresses cell death reactions in *N. benthamiana*, triggered by three other *Xcv* T3E. In the second part, this work shows that the phytohormone abscisic acid (ABA) influences the *Xcv*-mediated disease symptoms and *in planta* growth in tomato plants. Screening a cDNA-library with the yeast-two-hybrid-system revealed a component of the ABA-signaling as putative interactor of the T3E XopL. XopL reduces the protein abundance of this interactor *in planta* dependent on its E3-Ubiquitin-ligase activity, suggesting that XopL might manipulate the ABA-signaling for the benefit of *Xcv*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Warum werden Pflanzen-Mikroben-Interaktionen studiert?	1
1.2 Ein Überblick über Pflanzen-Pathogen-Interaktionen	1
1.2.1 Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren Gram-negativer phytopathogener Bakterien	2
1.2.2 Verteidigungsrunde 1 – Die pflanzliche Basalabwehr	3
1.2.3 Verteidigungsrunde 2 – Die pflanzliche Effektor-vermittelte Abwehr	4
1.2.4 Der Gegenangriff – Wie Effektoren die Pflanzenzelle manipulieren	6
1.3 Die Verbreitung von T3E bei Gram-negativen Bakterien	7
1.4 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> und dessen Effektoren	8
1.5 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme	13
2.2 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide	14
2.3 Pflanzenexperimente	20
2.3.1 Verwendetes Pflanzenmaterial	20
2.3.2 Inokulationsexperimente und <i>in planta</i> -Wachstum von <i>Xcv</i>	23
2.3.3 Inokulationsexperimente mit <i>A. tumefaciens</i>	23
2.3.4 Sprühapplikation von Abscisinsäure	23
2.3.5 Infiltration von flg22 in <i>N. benthamiana</i>	23
2.3.6 Kategorisierung von Pflanzenreaktionen	23
2.4 Deletionsmutagenese von <i>Xcv</i>	24
2.5 Sichtung einer cDNA-Bibliothek mittels Hefe-Di-Hybrid-System	24
2.6 Klonierungen und <i>xopQ</i> -Mutagenese	25
2.7 Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i>	26
2.8 Quantitative „real time“ PCR	27
2.9 Fluoreszenzmikroskopie	27
2.10 Detektion von Proteinen	27
2.11 Bioinformatische Methoden und statistische Tests	28
3 Ergebnisse	30
3.1 Analyse der von T3E verursachten Reaktionen in verschiedenen Nicht- Wirtspflanzen der <i>Solanaceae</i>	30

3.1.1	Die von Effektoren verursachten Reaktionen sind divers.....	31
3.1.2	Die Pflanzenreaktionen nach transienter Expression von T3E in 86 verschiedenen <i>Solanaceae</i>	32
3.2	Analyse der von <i>Xcv</i> verursachten Nicht-Wirtsresistenz-Reaktionen in Vertretern der <i>Solanaceae</i>	36
3.2.1	XopQ beeinflusst die Nicht-Wirtsresistenz-Reaktion in <i>Nicotiana</i> -Linien, in denen die transiente Expression von XopQ eine Reaktion auslöst.....	37
3.2.2	XopQ beeinflusst das bakterielle Wachstum in Nicht-Wirtspflanzen und ist ein Avirulenzfaktor.....	40
3.2.3	<i>Xcv</i> transloziert Effektoren in <i>N. benthamiana</i>	42
3.2.4	Die von <i>Xcv</i> verursachte NWR-Reaktion in <i>N. benthamiana</i> hängt von verschiedenen Faktoren ab.....	44
3.3	Charakterisierung von XopQ auf Grundlage der Kristallstruktur	45
3.3.1	Die konservierte Struktur der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie	46
3.3.2	Homologe der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie verursachen identische Reaktionen in verschiedenen <i>Solanaceae</i>	47
3.3.3	<i>hopQ1_{Pro}</i> komplementiert die Deletion von <i>xopQ</i> in <i>Xcv</i>	48
3.3.4	Identifizierung von XopQ-Domänen, die für die Reaktionen nach transienter Expression in <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i> essenziell sind.....	49
3.3.5	Die Avirulenzaktivität von XopQ korreliert mit dessen Erkennung in <i>N. tabacum</i>	52
3.4	Der Einfluss von XopQ auf die ETI	56
3.4.1	XopQ beeinflusst die ETI in <i>N. benthamiana</i>	56
3.4.2	Identifizierung von strukturellen Bereichen zur ETI-Suppression von XopQ.....	58
3.4.3	XopV und XopE1 beeinflussen die Phosphorylierung von MAP-Kinasen <i>in planta</i>	59
3.4.4	XopQ interagiert mit XopQ und XopS <i>in planta</i>	61
3.5	Phytohormone beeinflussen die Virulenz von <i>Xcv</i>	63
3.5.1	Ein veränderter Hormonhaushalt in Tomatenmutanten kann die Virulenz von <i>Xcv</i> beeinflussen.....	63
3.5.2	Abscisinsäure fördert die Virulenz von <i>Xcv</i> in Tomate	65
3.6	Könnte XopL ABA-assoziierte Pflanzenprozesse beeinflussen?	67
3.6.1	Die Identifizierung zahlreicher möglicher XopL-Interaktoren mittels Hefe-Di-Hybrid-System	68
3.6.2	Klonierung möglicher XopL-Interaktionspartner	70
3.6.3	<i>In planta</i> Lokalisierungsstudien mit XopL und möglichen Interaktoren	71
3.6.4	<i>In planta</i> -Interaktionsstudien mit XopL und möglichen Interaktoren	75
3.6.5	Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL beeinflusst die Proteinakkumulation möglicher Zielproteine.....	76

3.6.6	<i>Silencing</i> von <i>ARIA</i> in <i>N. benthamiana</i>	77
4	Diskussion und Ausblick	79
4.1	Die phylogenetische Verbreitung von Pflanzenreaktionen nach T3E-Expression in der Familie <i>Solanaceae</i>	79
4.2	Die Verteilung und Ausprägung von NWR-Reaktionen gegen <i>Xcv</i>	81
4.2.1	Die NWR-Reaktion von <i>N. benthamiana</i> gegen <i>Xcv</i>	81
4.2.2	Die phylogenetische Verteilung von NWR-Reaktionen und XopQ-Erkennungsmechanismen in der Familie <i>Solanaceae</i>	83
4.3	Vermutlich werden konservierte Strukturen von XopQ in <i>Nicotiana</i> erkannt	84
4.3.1	Die konservierte Struktur der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie	84
4.3.2	<i>N. benthamiana</i> besitzt vermutlich zwei verschiedene XopQ-Erkennungsmechanismen	85
4.4	Die Virulenzfunktion von XopQ	87
4.5	Phytohormon-assoziierte Prozesse könnten Ziele von <i>Xcv</i> -Effektoren sein	89
4.5.1	Eine konstitutive GA-Antwort reduziert die Symptombildung bei der <i>Xcv</i> -Infektion	89
4.5.2	Abscisinsäure fördert die Suszeptibilität von Tomate gegenüber <i>Xcv</i>	89
4.6	XopL könnte die Virulenz von <i>Xcv</i> auf verschiedene Weise begünstigen	90
4.6.1	ARIA ist ein mögliches Zielprotein von XopL.....	90
4.6.2	XopL beeinflusst die Chloroplastenposition.....	92
4.6.3	Weitere mögliche Zielproteine von XopL sind divers und könnten die Pflanzen-Pathogen-Interaktion beeinflussen.....	93
4.7	Ansatzpunkte für die Charakterisierung weiterer Effektoren	95
5	Literaturverzeichnis	97
6	Anhang	110
6.1	T3E von <i>Xcv</i> 85-10 und deren Beitrag zur Virulenz	110
6.2	Übersicht über T3E-induzierte Pflanzenreaktionen.....	111
6.3	NWR-Reaktion von <i>N. benthamiana</i> drei Tage nach <i>Xcv</i> -Inokulation	112
6.4	Phylogenie verschiedener Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie	112
6.5	Sequenzen möglicher XopL-Interaktoren	113
6.6	Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von ARIA-Proteinen verschiedener Spezies.....	114
6.7	Vorhergesagte Kernlokalisierungssignale	115
6.8	Lokalisierungs- und Ko-Lokalisierungsstudien mit XopL	115
6.9	Sequenzvergleich zwischen cDNA-Sequenzen von <i>SlARIA</i> und <i>N. benthamiana</i> -Homologen	117

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
ABA	Abscisinsäure
ABF2	„abscisic acid responsive elements-binding factor 2“
AD	Aktivierungsdomäne von Gal4
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
ARIA	„ARM repeat protein interacting with ABF2-like“
ARM	„Armadillo/beta-catenin-like repeat“
As	Aminosäure/n
Avr	Avirulenz
BA	Brassinosteroide
BAK1	„brassinosteroid insensitive kinase 1“
BD	DNA-Bindedomäne von Gal4
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
BIK1	„ <i>Bortrytis</i> -induced Kinase 1“
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
Bp	Basenpaar/e
BTB	„Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac“
<i>Ca</i>	<i>Capsicum annuum</i>
CC	„coiled coil“
cDNA	„complementary“ DNA
CDPK	Kalzium-abhängige Proteinkinase
CHUP1	„chloroplast unusual positioning 1“
CK	Cytokinin/e
CTD	C-terminale Domäne
cv.	„cultivar“; Kultivar
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	„days post inoculation“; Tage nach Inokulation
ECW	Early Californian Wonder; <i>Capsicum annuum</i> -Kultivar
ET	Ethylen
ETI	„effector-triggered immunity“
ETS	„effector-triggered susceptibility“
FLS2	„flagellin sensing 2“
GA	Gibberellinsäure
GFP	„green fluorescent protein“; grün-fluoreszierendes Protein
HMGR2	„3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase“
Hop	„Hrp outer protein“
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>hrp</i>	„hypersensitive response and pathogenicity“
ITSN1	„intersectin-1“
JA	Jasmonat
KBE	Kolonie-bildende Einheit/en
kDa	Kilodalton
LRR	„leucin-rich repeat“
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAMP	„microbe-associated molecular pattern“
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MM	„Moneymaker“; <i>Solanum lycopersicum</i> -Kultivar
mRNA	„messenger“ RNA
<i>Nb</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NB-Domäne	Nukleotid-Bindedomäne
NES	„nuclear export signal“

NH	Nukleosid-Hydrolase
NLR	„nucleotide-binding/leucine-rich-repeat“
NLS	„nuclear localization signal“; Kernlokalisierungssignal
NR	„Never Ripe“; <i>Solanum lycopersicum</i> -Kultivar
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Nt	Nukleotid/e
NWR	Nicht-Wirtsresistenz
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerasekettenreaktion
PIP	„plant-inducible promoter“
PixL	Pflanzlicher Interaktor von XopL
PNAI	„plastid nuclear association index“
PRO	„Procera“; <i>Solanum lycopersicum</i> -Kultivar
PRR	„pattern recognition receptor/s“
PTI	„PAMP-triggered immunity“
<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv.	Pathovar
R-	Resistenz-Gen/Protein
RBOH	„respiratory burst oxidase homolog“
RIN4	„RPM1-interacting protein 4“
RIPK	„PRM1-induced protein kinase“
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“; reaktive Sauerstoffspezies
RPM1	„resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 1“
RPS2	„resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> 2“
RR	„Rheinlands Ruhm“; <i>Solanum lycopersicum</i> -Kultivar
SA	Salicylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIT	„Sitiens“; <i>Solanum lycopersicum</i> -Kultivar
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
spp.	<i>species pluralis</i> ; Subspezies
T3E	Typ III-Effektor
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
TAL	„transcription activator-like“
TALE	TAL-Effektor
TIR	„Toll interleukin-1 receptor“
TRV	„tobacco rattle virus“
VIGS	Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i>
WT	Wildtyp
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- α -D-galactopyranosid
<i>Xoc</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Xop	„ <i>Xanthomonas</i> outer protein“
Y2H	Hefe-Di-Hybrid
YFP	„yellow fluorescent protein“; gelb-fluoreszierendes Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Das Zick-Zack-Modell illustriert pflanzliche Immunitäts- und Suszeptibilitätsmechanismen.	2
Abbildung 2. Modell der PTI-Aktivierung durch flg22 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Abbildung 3. Typische Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit.	9
Abbildung 4. Phylogenetische Einordnung der verwendeten Pflanzenlinien.	31
Abbildung 5. Beispiele pflanzlicher Reaktionen nach transienter Expression von T3E aus <i>Xcv</i>	32
Abbildung 6. Häufigkeit von Pflanzenreaktionen nach transienter Expression von 21 <i>Xcv</i> -T3E in 41 Nicht-Wirtspflanzen.....	32
Abbildung 7. Der Einfluss von <i>xopQ</i> auf die von <i>Xcv</i> verursachten NWR-Reaktionen in <i>Solanaceae</i> -Linien.	38
Abbildung 8. XopQ beeinflusst die NWR-Reaktionen in <i>N. paniculata</i> , <i>N. rustica</i> und <i>N. clevelandii</i>	39
Abbildung 9. Reaktionen von 18 Nicht-Wirtspflanzen nach Inokulation von <i>Xcv</i>	40
Abbildung 10. XopQ limitiert das Wachstum von <i>Xcv</i> in <i>N. paniculata</i> , <i>N. clevelandii</i> und <i>N. rustica</i>	41
Abbildung 11. Der Einfluss von <i>xopQ</i> auf Pflanzenreaktionen und bakterielles Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen sowie <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i>	42
Abbildung 12. <i>Xcv</i> transloziert AvrBs3 in <i>N. benthamiana</i>	43
Abbildung 13. Die NWR-Reaktion von <i>N. benthamiana</i> nach <i>Xcv</i> -Infektion.	45
Abbildung 14. Aminosäure-Konsensussequenz der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie.	46
Abbildung 15. <i>Ribbon</i> -Diagramm eines XopQ-Dimers.	47
Abbildung 16. Ausgewählte Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie verursachen identische Pflanzenreaktionen.....	47
Abbildung 17. <i>hopQ1_{Pto}</i> komplementiert <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopQ</i>	48
Abbildung 18. Identifizierung von Domänen und Aminosäuren von XopQ, die für Pflanzenreaktionen nach transienter Synthese essenziell sind.....	51
Abbildung 19. Synthese von XopQ-Derivaten <i>in planta</i>	52
Abbildung 20. Untersuchung der Avirulenzaktivität von XopQ-Derivaten.....	54
Abbildung 21. Die Synthese von XopQ, XopQ-Derivaten und HopQ1 _{Pto} in <i>Xcv</i>	56
Abbildung 22. XopQ supprimiert die XopL-, XopB-, XopJ-induzierten Zelltodreaktionen in <i>N. benthamiana</i> , aber führt in Kombination mit XopS zum Zelltod.	57
Abbildung 23. Charakterisierung der ETI-Suppression von XopQ-Derivaten und HopQ1 _{Pto}	59
Abbildung 24. Der Einfluss von Effektoren auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen in <i>N. benthamiana</i>	61
Abbildung 25. XopQ interagiert mit XopQ und XopS <i>in planta</i>	62
Abbildung 26. Verwendete Tomatenlinien im Vergleich.	64

Abbildung 27. Phytohormone beeinflussen die Virulenz von <i>Xcv</i> in Tomate.	65
Abbildung 28. ABA fördert die Symptombildung und das <i>Xcv</i> -Wachstum in Tomatenpflanzen.	66
Abbildung 29. Test auf Köderproteinsynthese und Autoaktivierung der Reportergene in Hefezellen.	69
Abbildung 30. Schematischer Aufbau von ARIA aus Tomate.	71
Abbildung 31. Lokalisierung möglicher XopL-Interaktoren <i>in planta</i>	72
Abbildung 32. XopL, LRR und CTD lokalisieren im Zytoplasma und Zellkern und beeinflussen die Position von Chloroplasten.	74
Abbildung 33. Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL beeinflusst die Akkumulation möglicher Zielproteine <i>in planta</i>	76
Abbildung 34. <i>Silencing</i> von <i>NbARIA</i> in <i>N. benthamiana</i>	78
Abbildung 35. Modell der Immunitäts- und Suszeptibilitätsmechanismen be+i der <i>Xcv</i> - <i>N. benthamiana</i> -Interaktion.	82
Abbildung 36. Modell der XopQ-Erkennungsmechanismen in <i>N. tabacum</i> und <i>N. benthamiana</i>	86
Abbildung 37. Modell der XopL-abhängigen Manipulation von Pflanzenzellen.	95
Abbildung 38. Die NWR-Reaktion von <i>N. benthamiana</i> nach Inokulation von <i>Xcv</i> nach drei Tagen.	112
Abbildung 39. Phylogenie von 24 Vertretern der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie.	112
Abbildung 40. Nachweis der Kernlokalisierung von XopL, LRR und CTD.	115
Abbildung 41. XopL beeinflusst nicht die Lokalisierung möglicher XopL-Interaktoren.	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Bekannte T3E von <i>Xcv</i> 85-10.....	11
Tabelle 2. Verwendete Bakterien- und Hefestämme.....	13
Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	14
Tabelle 4. In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.....	16
Tabelle 5. Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien.....	20
Tabelle 6. Umweltbedingungen bei Pflanzenexperimenten.....	22
Tabelle 7. Verwendete Antikörper.....	28
Tabelle 8. Reaktionen nach transienter T3E-Expression in 41 Vertretern der Familie <i>Solanaceae</i>	34
Tabelle 9. Reaktionen nach transienter T3E-Expression in 46 Vertretern der Art <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i>	35
Tabelle 10. Zusammenfassung der Charakterisierung von XopQ-Derivaten und -Homologen.....	55
Tabelle 11. Übersicht der in dieser Arbeit durchgeführten Sichtungen einer cDNA-Bibliothek mittels Y2H.....	69
Tabelle 12. Ergebnis der Sichtung der cDNA-Bibliothek mittels Y2H.....	70
Tabelle 13. Klonierte mögliche XopL-Interaktoren.....	71
Tabelle 14. Übersicht, ob bekannte T3E zum Wachstum von <i>Xcv</i> 85-10 in suszeptiblen Pflanzen beitragen.....	110
Tabelle 15. Reaktion von 18 verschiedenen Pflanzen der <i>Solanaceae</i> auf verschiedene T3E von <i>Xcv</i>	111
Tabelle 16. Bioinformatische Vorhersage von Kernlokalisierungssignalen.....	115

1 Einleitung

1.1 Warum werden Pflanzen-Mikroben-Interaktionen studiert?

Der Anbau von Nutzpflanzen bildet die Grundlage zur Ernährung der Weltbevölkerung (Tscharntke *et al.*, 2012; OECD und FAO, 2015). Neben abiotischen Faktoren (z. B. Trockenheit und Nährstoff-Verfügbarkeit) sind Nutzpflanzen verschiedensten mikrobiellen Pathogenen (z. B. Pilze und Bakterien) ausgesetzt, die deren Ertrag schmälern und sogar zu kompletten Ernteausfällen führen können (Dangl *et al.*, 2013; Schornack *et al.*, 2013). Pathogene leben und reproduzieren sich auf Kosten ihres pflanzlichen Wirtes und verfolgen dabei verschiedene Strategien. Biotrophe Pathogene besiedeln Pflanzengewebe ohne dieses tödlich zu schädigen, nekrotrophe besiedeln totes oder sterbendes Gewebe und hemibiotrophe Pathogene etablieren zunächst eine biotrophe Interaktion, die im Krankheitsverlauf nekrotroph verläuft (Vleeshouwers und Oliver, 2014). Da Pflanzen über verschiedene Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen verfügen, ist die erfolgreiche Infektion eine Ausnahme. Allen pathogenen Mikroorganismen ist gemein, dass sie Abwehrmechanismen in ihren jeweiligen suszeptiblen Wirtspflanzen effizient supprimieren können. Bei den Gram-negativen Bakterien werden Interaktionen mit Pflanzen anhand verschiedener Modell-Systeme bzw. -Organismen studiert, zu denen Vertreter der Gattungen *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* und *Agrobacterium* gehören. Diese Forschung liefert Einblicke in pflanzliche Abwehrmechanismen sowie bakterielle Strategien zur Etablierung einer Infektion. Die so gewonnenen Erkenntnisse können Grundlage zur Erzeugung resistenterer Nutzpflanzen sein (Gururani *et al.*, 2012; Schornack *et al.*, 2013; Vleeshouwers und Oliver, 2014).

1.2 Ein Überblick über Pflanzen-Pathogen-Interaktionen

Die Vorgänge bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion können in dem sog. Zick-Zack-Modell zusammengefasst werden, das die Interaktion in 4 Phasen unterteilt (Abbildung 1) und die pflanzliche Abwehr im Wesentlichen in zwei Mechanismen trennt (Jones und Dangl, 2006). Phase 1 ist ein basaler Abwehrmechanismus, der weit verbreitete, konservierte Pathogen-assoziierte Moleküle erkennt. Diese sog. PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“, auch als MAMPs „microbe-associated molecular patterns“ bezeichnet), lösen eine basale Abwehrreaktion aus, die als PTI („PAMP-triggered immunity“) bezeichnet wird (Schwessinger und Ronald, 2012). Erfolgreiche Pathogene supprimieren PTI in Phase 2 durch sog. Effektoren, was als ETS („effector-triggered susceptibility“) bezeichnet wird. Im Gegensatz zu PAMPs sind Effektoren direkt an der Virulenz des Pathogens beteiligt und nur in bestimmten taxonomischen Einheiten konserviert. Der zweite pflanzliche Abwehrmechanismus (Phase 3) erkennt spezifisch bestimmte Effektoren und wird als ETI („effector-triggered immunity“) bezeichnet. Die ETI resultiert häufig in einem schnellen, lokalen Zelltod, einer sog. hypersensitiven Reaktion (HR). Bei der ETI werden Effektoren, die auch als Avirulenz (Avr)-Faktoren bezeichnet werden, von pflanzlichen Resistenz (R)-Proteinen oder R-Genen

erkannt. In Phase 4 kann die ETI wiederum von Effektoren supprimiert werden (Jones und Dangl, 2006).

Obwohl das Zick-Zack-Modell gegenwärtig weitgehend akzeptiert ist, wird mit zunehmendem Verständnis von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen deutlich, dass dessen strikte Trennung von PAMP/PTI und Effektoren/ETI nur in begrenztem Maße zutrifft (Thomma *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2015). Außerdem vereinfacht das Zick-Zack-Modell und berücksichtigt beispielsweise nicht, dass verschiedene pflanzliche Erkennungsmechanismen parallel stattfinden, Signalwege parallel ablaufen und miteinander wechselwirken können (Tsuda und Katagiri, 2010; Cook *et al.*, 2015).

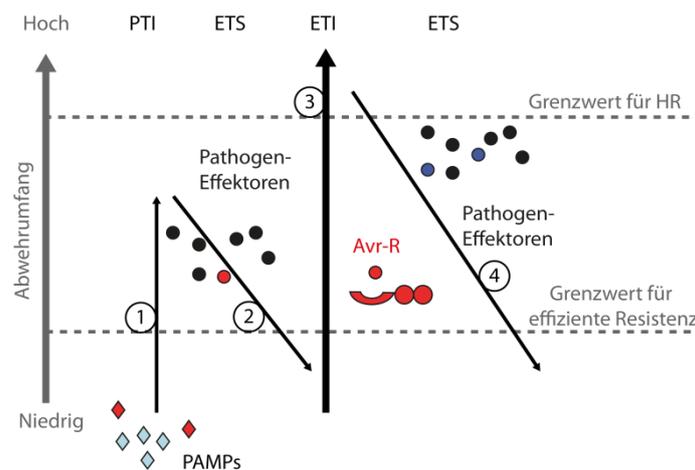


Abbildung 1. Das Zick-Zack-Modell illustriert pflanzliche Immunitäts- und Suszeptibilitätsmechanismen.

1) PTI („PAMP-triggered immunity“) wird ausgelöst durch die pflanzliche Erkennung von konservierten Pathogen-assoziierten Molekülen (PAMPs). 2) Effektoren erfolgreicher Pathogene supprimieren die PTI durch die ETS („effector-triggered susceptibility“). 3) Einzelne Effektoren (roter Kreis, Avr-Faktor) können von pflanzlichen Resistenz (R)-Proteinen oder -Genen erkannt werden, was zu einer ETI („effector-triggered immunity“) führt. Die ETI resultiert meist in einer hypersensitiven Reaktion (HR). 4) Einige Effektoren können die ETI unterdrücken, was wiederum zu ETS führt. Modifiziert nach Jones und Dangl (2006).

1.2.1 Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren Gram-negativer phytopathogener Bakterien

Gram-negative phytopathogene Bakterien besitzen verschiedene Faktoren, die zu ihrer Virulenz beitragen (Virulenzfaktoren) oder essenziell für deren Pathogenität sind (Pathogenitätsfaktoren). Pathogenitätsfaktor der meisten phytopathogenen Gram-negativen Bakterien ist das Typ III-Sekretionssystem (T3SS), das bakterielle Effektorproteine direkt vom bakteriellen Zytoplasma in die Pflanzenzelle transloziert (Büttner, 2012; Tampakaki, 2014). Das T3SS ist ein Multiproteinkomplex, bestehend aus einem extrazellulären Pilus und einem Basalapparat, der beide bakteriellen Membranen sowie das Periplasma durchspannt (Büttner und He, 2009). Bevor T3SS-Effektoren (T3E) transloziert werden, sekretiert das T3SS Translokonproteine, die vermutlich eine Pore in der Plasmamembran der Pflanzenzelle bilden (Büttner und He, 2009). Die meisten Gram-negativen phytopathogenen Bakterien kodieren regulatorische und strukturelle T3SS-Komponenten im *hrp* („hypersensitive response and pathogenicity“)-Gencluster (Tampakaki, 2014). In dieser Arbeit wurden T3E des Pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) untersucht, dessen *hrp*-Gencluster aus acht Operonen

besteht und das essenziell für die Pathogenität ist (Bonas *et al.*, 1991; Büttner und Bonas, 2002; Büttner *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007). In *Xcv* wird die Expression des *hrp*-Genclusters durch den OmpR-ähnlichen Regulator HrpG und den transkriptionellen Aktivator des AraC-Typs, HrpX, kontrolliert, die beide außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert sind (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996). Durch ein bisher unbekanntes Pflanzensignal wird HrpG aktiviert, woraufhin u. a. die *hrpX*-Expression induziert wird. HrpX bindet an *cis*-regulatorische PIP („plant-inducible promoter“-)Boxen in Promotoren von Genen des *hrp*-Genclusters und weiterer T3SS-assoziiierter Gene (Koebnik *et al.*, 2006). Die Translokation von T3E wird meist durch N-terminale T3SS-Translokationssignale vermittelt und wird durch die zytoplasmatische T3SS-ATPase HrcN energetisiert (Büttner und He, 2009; Lorenz und Büttner, 2009). Das T3SS von *Xcv* transloziert zahlreiche T3E, die in unterschiedlicher Weise und in unterschiedlichem Maße zur Virulenz beitragen (siehe Abschnitt 1.3).

Neben dem T3SS und T3E können vielseitige weitere Faktoren zur Pathogenität Gram-negativer Bakterien beitragen. Häufig sind dies weitere Sekretionssysteme bzw. von diesen sekretierte oder translozierte Moleküle. So sekretieren Typ I-Sekretionssysteme Toxine, Proteasen und Lipasen (Gerlach und Hensel, 2007), Typ II-Sekretionssysteme sekretieren Proteasen und Xylanasen (Szczeny *et al.*, 2010b; Solé *et al.*, 2015), Typ IV-Sekretionssysteme translozieren Proteine und DNA in pflanzliche Wirtszellen (Christie *et al.*, 2014) und Typ V-Sekretionssysteme sekretieren Adhäsine (Gerlach und Hensel, 2007).

1.2.2 Verteidigungsrunde 1 – Die pflanzliche Basalabwehr

Noch bevor pflanzliche Abwehrreaktionen auf molekularer Ebene ablaufen, müssen Pathogene passive Barrieren, z. B. die pflanzliche Kutikula und Zellwand, überwinden (Yeats und Rose, 2013). Gelangen Pathogene in unmittelbare Nähe von Pflanzenzellen, wird die pflanzliche Basalabwehr (PTI) ausgelöst, wenn spezifische pflanzliche Rezeptoren („pattern recognition receptor/s“, PRR) PAMPs erkennen. PAMP sind sehr divers, so erkennt *A. thaliana* beispielsweise mindestens sieben verschiedene PAMP, z. B. Flagellin, den Elongationsfaktor EF-Tu und Peptidoglykan aus Bakterien sowie pilzliches Chitin und eine Transglutaminase von Oomyceten (Brunner und Nürnberger, 2012). Häufig perzipieren PRRs kurze, konservierte PAMP-Bereiche, z. B. erkennt der PRR FLS2 („flagellin sensing 2“) ein 22 Aminosäure-langes Flagellin-Motiv, das als flg22 bezeichnet wird (Navarro *et al.*, 2004). PRRs sind meist Transmembranproteine, häufig mit einer extrazellulären LRR („leucin-rich repeat“-)Domäne zur Ligandbindung und einer zytoplasmatischen Kinase-Domäne zur Signalweiterleitung (Zipfel, 2014). Nach PAMP-Bindung interagieren viele PRRs mit einem transmembranen Ko-Rezeptor, z. B. BAK1 („brassinosteroid insensitive kinase 1“), der ebenfalls eine zytoplasmatische Kinase-Domäne hat. Die räumliche Nähe von Rezeptor und Ko-Rezeptor führt zur gegenseitigen Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen, woraufhin verschiedene Signalwege aktiviert werden (Bigéard *et al.*, 2015). Die FLS2- und BAK1-Phosphorylierung führt beispielsweise

zur Aktivierung der zytosmatischen Kinase BIK1 („*Bortrytis*-induced Kinase 1“) und zum Ca^{2+} -Ionen-Einstrom in die Zelle. Dieser Ca^{2+} -„burst“ aktiviert wiederum Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPK), die z. B. gemeinsam mit aktivem BIK1 RBOH-Proteine („respiratory burst oxidase homolog“) aktivieren, was die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) induziert (O’Brien *et al.*, 2012; Kadota *et al.*, 2015). Ca^{2+} - und ROS-„burst“ treten bereits wenige Minuten nach PAMP-Perzeption auf. Während der PTI werden auch MAPK („mitogen-activated protein kinases“-Kaskaden und Transkriptionsfaktoren aktiviert, was zu einer Transkriptionsinduktion von PTI-Antwortgenen führt (Meng und Zhang, 2013). Neben dem ROS-„burst“ induziert PTI weitere Abwehrreaktionen, z. B. das Schließen von Stomata (Sawinski *et al.*, 2013), die apoplastische Nährstofflimitierung (Wang *et al.*, 2012) oder Modifizierungen der pflanzlichen Zellwand durch Lignin- und Kallose-Einlagerung (Malinovsky *et al.*, 2014). Abbildung 2 zeigt die grundlegenden Schritte der PTI-Aktivierung am Beispiel der flg22-vermittelten Prozesse in *A. thaliana*.

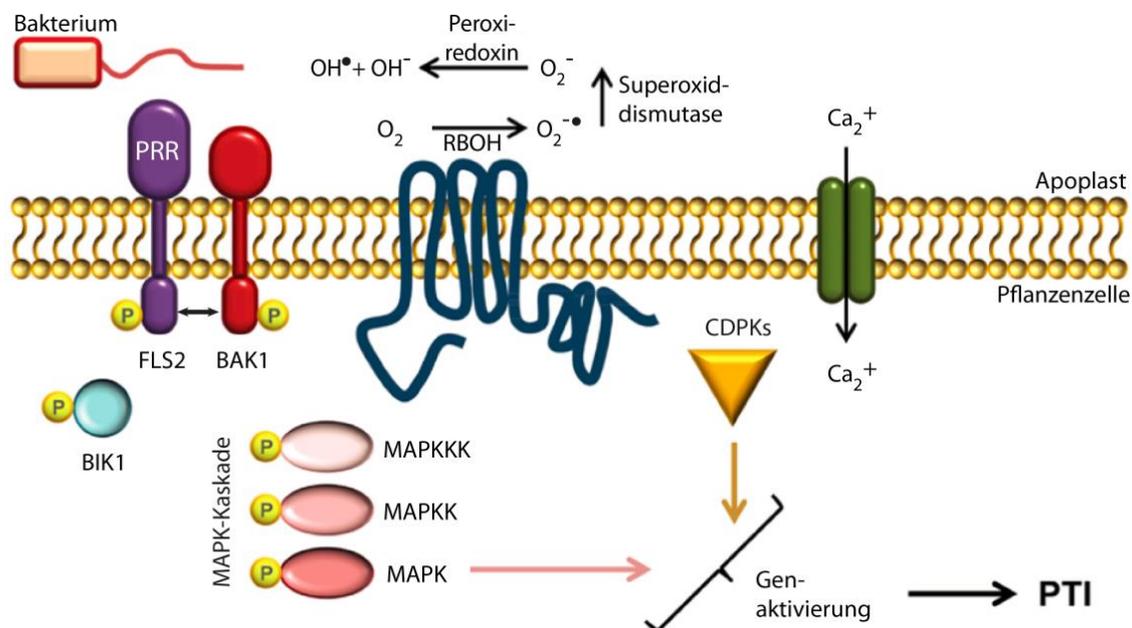


Abbildung 2. Modell der PTI-Aktivierung durch flg22 in *Arabidopsis thaliana*.

Die extrazelluläre Domäne des PRRs FLS2 bindet das bakterielle PAMP flg22, woraufhin FLS2 mit dem Ko-Rezeptor BAK1 interagiert. Die Phosphorylierung der zytosmatischen Rezeptor-Kinase-Domänen aktiviert verschiedene PTI-Signalwege, z. B. MAPK-Kaskaden und Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs), was zur Transkription von PTI-Antwortgenen führt. Ein Merkmal von PTI ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Aktivierung von RBOH („respiratory burst oxidase homolog“). Abbildung modifiziert nach Malinovsky *et al.* (2014).

1.2.3 Verteidigungsrunde 2 – Die pflanzliche Effektor-vermittelte Abwehr

PTI-vermittelte Abwehrreaktionen genügen meist als Schutz der Pflanze vor der Infektion mit wenig-adaptierten Mikroorganismen (Cui *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu verfügen spezialisierte Pathogene über Effektoren, die die PTI der jeweiligen Wirtspflanze effizient supprimieren. In resistenten Wirtspflanzen können wiederum einzelne Effektoren erkannt werden. Die Erkennung von Effektoren erfolgt meist im Zytoplasma durch NLR („nucleotide-binding/leucine-rich-repeat“-)Rezeptoren, die in einer großen Anzahl und Vielfalt von Pflanzen kodiert werden (Li *et al.*, 2015). Neben einer meist

zentralen Nukleotid-Bindedomäne (NB) und C-terminalen LRR-Domäne können diese R-Proteine unterschiedliche N-terminale Domänen haben, was gleichzeitig die Grundlage für deren Klassifizierung darstellt. Typische N-terminale Domänen sind TIR („Toll interleukin-1 receptor“-) oder CC („coiled coil“-) Domänen (Li *et al.*, 2015). In Abwesenheit von Effektoren bindet häufig ein ADP (Adenosindiphosphat) an NLR-Rezeptoren, welche in einem inaktiven Zustand vorliegt (Autoinhibierung). Bei Anwesenheit eines Effektors werden korrespondierende NLR-Rezeptoren aktiviert, häufig, indem eine Konformationsänderung zum Austausch von ADP durch ATP (Adenosintriphosphat) führt. Daraufhin wird die N-terminale Domäne exponiert und ist nun in der Lage mit anderen Proteinen zu interagieren (Takken und Goverse, 2012). Die Aktivierung von NLR-Rezeptoren durch Effektoren kann sowohl direkt als auch indirekt stattfinden, wobei die Spezifität meist durch die LRR-Domäne vermittelt wird. Bei der indirekten Aktivierung modifizieren Effektoren beispielsweise an inaktive R-Proteine gebundene Faktoren (Li *et al.*, 2015). Ein Beispiel für dieses „Guard“-Modell sind die beiden CC-NLRs RPM1 („resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1“) und RPS2 („resistance to *Pseudomonas syringae* 2“), die konstitutiv von RIN4 („RPM1-interacting protein 4“) gebunden werden und dadurch inaktiv sind. RIN4 wird bei der Anwesenheit der *P. syringae*-T3E AvrRpm1, AvrB oder AvrRpt2 modifiziert, wodurch dieser die beiden NLR-Rezeptoren nicht mehr inaktiviert und die ETI induziert wird. RIN4 wird durch die Cystein-Protease-Aktivität von AvrRpt2 gespalten, wohingegen RIN4 bei AvrRpm1- oder AvrB-Anwesenheit durch RIPK („PRM1-induced protein kinase“) phosphoryliert wird (Spoel und Dong, 2012). ETI-Reaktionen können auch ohne NLR-Rezeptoren verlaufen. Dies ist beispielsweise für den TAL („transcription activator-like“-)Effektor AvrBs3 von *Xcv* bekannt, der in resistenten Wirtspflanzen an den Promotor des *Bs3-R*-Gens, das eine Flavin-Monooxygenase kodiert, bindet und dessen Transkription induziert, woraufhin eine HR ausgelöst wird (Römer *et al.*, 2007).

Die Aktivierung von R-Proteinen kann ein breites Signalweg-Netzwerk induzieren, zu denen auch die bereits erwähnten MAPK-Kaskaden, Ca²⁺-„Burst“, ROS-„Burst“ und CDPKs gehören (Cui *et al.*, 2015). Bei der ETI-Antwort kommt es zu komplexen Änderungen des Transkriptom, die zu einem großen Teil mit den Transkriptom-Änderungen nach PTI-Induktion überlappen (Buscaill und Rivas, 2014). Eine zentrale Rolle bei Abwehrprozessen spielen außerdem pflanzliche Hormone, sodass es sowohl bei ETI als auch bei PTI zu komplexen Änderungen der Phytohormon-Homöostase kommt (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2012). Im Vergleich zur PTI sind ETI-vermittelte Änderungen (z. B. ROS-„Burst“, Ca²⁺-„Burst“) gewöhnlich stärker, langanhaltender und resultieren schließlich meist in einer schnellen, lokalen, programmierten Zelltodreaktion (HR), die die Ausbreitung des Pathogens verhindert (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Dodds und Rathjen, 2010; Cui *et al.*, 2015). Ein mögliches Modell zur Erklärung der Intensitätsunterschiede zwischen PTI und ETI wurde von Cui *et al.* (2015) zusammengefasst: möglicherweise aktiviert die PTI positive und auch negative Abwehrregulatoren, um ein Gleichgewicht zwischen Abwehr und Wachstum zu gewährleisten und nicht mit einer übermäßig starken Abwehrreaktion (insbesondere

einer HR) auf „ungefährliche“ Mikroorganismen zu reagieren. ETI-Induktion signalisiert nun, dass Abwehrmechanismen gegen einen „ernstzunehmenden“ Mikroorganismus (Pathogen) einzuleiten sind, was einen negativen Einfluss auf die Abwehr-hemmenden Mechanismen der PTI und einen positiven Einfluss auf weitere Abwehrmechanismen hat. Dieses Modell wird beispielsweise dadurch bekräftigt, dass PTI-Mechanismen einen hemmenden Einfluss auf die Intensitäten der von *P. syringae*-Stämmen in *Nicotiana tabacum* und *N. benthamiana* ausgelösten Nicht-Wirtsresistenz (NWR)-Reaktionen haben (Wei *et al.*, 2012).

Die NWR ist die Resistenz aller Genotypen einer Pflanzenart gegenüber allen Genotypen einer Pathogenart und ist die am weitesten verbreitete Form der Resistenz bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen (Heath, 2000; Niks und Marcel, 2009). NWR-Mechanismen könnten sehr effektiv gegen eine Vielzahl von Pathogenen sein und stehen daher im besonderen Fokus der Forschung (Fan und Doerner, 2012). Bei wenig-spezialisierten Pathogenen beruht NWR meist ausschließlich auf physischen Barrieren und der PTI, aber auch ETI-Mechanismen können NWR vermitteln (Thordal-Christensen, 2003; Uma *et al.*, 2011; Senthil-Kumar und Mysore, 2013). Phänotypisch kann diese Resistenz zu einer HR des infizierten Bereiches führen (Typ-II-NWR-Reaktion) oder ohne HR verlaufen (Typ-I-NWR-Reaktion) (Uma *et al.*, 2011).

1.2.4 Der Gegenangriff – Wie Effektoren die Pflanzenzelle manipulieren

Pflanzenpathogene Bakterien kodieren eine Vielzahl verschiedener Effektoren, mit denen sie die Pflanzenzelle manipulieren. Gut untersucht sind beispielsweise T3E von *Xanthomonas* spp., die als „*Xanthomonas* outer protein“ (Xop) bezeichnet werden, und von *Pseudomonas* spp., die „Hrp outer protein“ (Hop) genannt werden. Häufigste Funktion von Effektoren ist die Suppression von pflanzlichen Abwehrprozessen. Dabei können verschiedene Komponenten der Abwehr beeinflusst werden, und es ist nicht ungewöhnlich, wenn verschiedene Effektoren die gleiche Abwehrkomponente manipulieren (Dou und Zhou, 2012; Macho und Zipfel, 2015).

Um PTI zu supprimieren, manipulieren einige T3E direkt PRRs oder deren Ko-Rezeptoren (z. B. BAK1). Dies ist beispielsweise für den T3E AvrPtoB mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von *P. syringae* beschrieben. AvrPtoB ubiquitiniert PRRs (z. B. FLS2, CERK1) und vermittelt damit deren proteasomalen Abbau (Göhre *et al.*, 2008; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2012). AvrPto bindet FLS2 direkt und blockiert damit dessen Signalweiterleitung (Xiang *et al.*, 2008). HopAO1, ein T3E von *P. s. pv. tomato* DC3000 (*Pto*) mit Tyrosin-Phosphatase-Aktivität dephosphoryliert ein Tyrosin des PRRs EFR („EF-Tu receptor“) und verhindert damit die EFR-BAK1-Aktivierung nach PAMP-Perzeption (Macho *et al.*, 2014). Die Aktivierung von BAK1 wird beispielsweise auch von dem *Pto* T3E HopF2 und dem *X. oryzae pv. oryzae* (*Xoo*) T3E Xoo2875 gehemmt (Wu *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2013).

Auch MAPK-Kaskaden können von Effektoren manipuliert werden, beispielsweise von HopAI1 und HopF2. So inaktiviert HopAI1 MAP-Kinasen, indem es mittels Phosphothreonin-Lyase-Aktivität eine

Phosphatgruppe bestimmter MAP-Kinasen entfernt (Zhang *et al.*, 2007) und die ADP-Ribosyltransferase HopF2 verhindert die Aktivierung der MAP-Kinase MKK5 (Wang *et al.*, 2010). Verschiedene Effektoren supprimieren die Abwehr, indem sie den Vesikeltransport manipulieren. Dies wurde z. B. für XopB und XopJ von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) beschrieben (Bartetzko *et al.*, 2009; Schulze *et al.*, 2012). Der Vesikeltransport dient beispielsweise zum Transport von Rezeptoren und Ko-Rezeptoren und zur Sekretion von antimikrobiell-wirkenden Proteinen (Inada und Ueda, 2014).

Neben der Suppression von Abwehrprozessen können Effektoren auch andere Pflanzenprozesse zum Vorteil für das Pathogen beeinflussen. Dies wurde beispielsweise für die bereits erwähnten TAL-Effektoren (TALEs) gezeigt. TALEs besitzen ein Kernlokalisierungssignal und werden nach Translokation durch das T3SS in den pflanzlichen Zellkern transportiert. Im Kern binden TALEs an bestimmte DNA-Sequenzen (sog. „effector binding elements“) und aktivieren die Transkription ihrer Zielgene (Boch und Bonas, 2010). Zahlreiche TALEs von *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) induzieren die Expression bestimmter *SWEET*-Gene, deren Genprodukte für den Export von Saccharose bzw. Glukose aus der Pflanzenzelle verantwortlich sind (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Es ist naheliegend, dass der Zuckerexport der bakteriellen Nährstoffversorgung dient (Chen *et al.*, 2012). TALEs können auch die Expression von Sulfat-Transporter-Genen induzieren (Cernadas *et al.*, 2014) oder zu Hypertrophie führen (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007)

1.3 Die Verbreitung von T3E bei Gram-negativen Bakterien

Die meisten Pflanzenarten stellen Nicht-Wirte für die meisten Pathogenarten dar, sodass die erfolgreiche Infektion nur spezialisierten Pathogenen vorbehalten bleibt. Diese Spezialisierung wird maßgeblich durch das T3E-Repertoire bestimmt, über das eine Bakterienart verfügt. Werden T3E in (nahezu) allen Vertretern einer Bakteriengattung oder sogar in verschiedenen Gattungen kodiert, werden diese häufig als „Core“-Effektoren bezeichnet. Da „Core“-Effektoren in unterschiedlichsten Pflanzen wirken, manipulieren sie vermutlich konservierte pflanzliche Prozesse (Hajri *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2011; Lindeberg *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2013). Ein Beispiel für eine sehr weit verbreitete T3E-Familie ist die XopQ/HopQ1/RipB-Effektorfamilie, die weitestgehend in *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. und *Ralstonia* spp. konserviert ist (Roden *et al.*, 2004; Peeters *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu „Core“-T3E können Effektoren auch sehr spezifisch sein, sodass sich selbst verschiedene Stämme einer Bakterienart im T3E-Repertoire unterscheiden. Ein Beispiel für sehr divers verbreitete T3E sind TALEs (Boch *et al.*, 2014). So ist der TAL-Effektor AvrBs3 beispielsweise kodiert in dem Stamm Xcv 82-8, nicht aber in dem eng verwandten Stamm Xcv 85-10 (Knoop *et al.*, 1991). Weitere Beispiele für sehr spezifische T3E sind XopAG und XopC1, die

ausschließlich in einigen Vertretern von Citrus-pathogenen *Xanthomonas* spp.-Stämmen vorkommen (Escalon *et al.*, 2013).

Die T3E-Anzahl in phytopathogenen Gram-negativen Bakterien kann deutlich variieren, und insbesondere Nicht-„Core“-Effektoren können einer großen evolutionären Dynamik unterworfen sein (Baltrus *et al.*, 2011; Escalon *et al.*, 2013; Schwartz *et al.*, 2015; Teper *et al.*, 2015). *P. syringae*-Stämme kodieren für gewöhnlich 15 - 30 verschiedene T3E, die in mindestens 57 verschiedenen T3E-Familien unterteilt werden können (Lindeberg *et al.*, 2012). Die T3E von *Xanthomonas* spp. können in mindestens 52 verschiedene Familien unterteilt werden (Ryan *et al.*, 2011) und von *R. solanacearum*-Stämmen sogar in 94 Gruppen (Peeters *et al.*, 2013).

1.4 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und dessen Effektoren

Die Gattung *Xanthomonas* spp. umfasst eine große Gruppe Gram-negativer γ -Proteobakterien, die Krankheiten in hunderten Pflanzenarten hervorrufen (Hayward, 1993). Charakteristisches Merkmal dieser Gattung ist die Bildung des Exopolysaccharids Xanthan und des Pigments Xanthomonadin, welches zu einer Gelbfärbung der Bakterien führt (Rajagopal *et al.*, 1997; Becker und Vorhölter, 2009). Die Pathogenität von fast allen *Xanthomonas* spp.-Vertretern beruht auf der Translokation von T3E durch ein Hrp-T3SS. Eine Ausnahme bildet *X. albilineans*, Erreger der Blattstreifigkeit („leaf scald“) auf Zuckerrohr. *X. albilineans* kodiert kein Hrp-T3SS, sondern ein T3SS des *Salmonella* SPI-1-Typs, welches allerdings nicht essenziell für dessen Pathogenität ist (Pieretti *et al.*, 2015). Weitere ökonomisch bedeutende Xanthomonaden sind die Reispathogene *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), Auslöser der Adernschwärze („black rot“) bei Kreuzblütlern und *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), Erreger des Zitruskrebs‘ („citrus canker“) auf Zitruspflanzen (Gottwald *et al.*, 2002; Nino-Liu *et al.*, 2006; Mansfield *et al.*, 2012).

Diese Arbeit befasst sich mit dem *Xcv*-Stamm 85-10 (Thieme *et al.*, 2005). *Xcv*-Stämme, auch bezeichnet als *X. euvesicatoria*, sind Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“) auf Paprika (*Capsicum* spp.) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) (Jones *et al.*, 2004). Die bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate ist nahezu weltweit verbreitet und wird neben *Xcv* von *X. perforans*, *X. vesicatoria* und *X. gardneri* verursacht (Potnis *et al.*, 2015). *Xcv* dringt über Spaltöffnungen und Wunden in den pflanzlichen Interzellularraum ein. Dort verbleiben die Bakterien lokal begrenzt im Apoplasten und lösen in suszeptiblen Pflanzen charakteristische Krankheitssymptome aus. Natürliche Krankheitssymptome zeichnen sich durch wässrige Läsionen aus, die im Krankheitsverlauf austrocknen sowie braun-schwarz und nekrotisch werden (Abbildung 3). *Xcv* 85-10 ist ein etablierter Modellorganismus zum Studium von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen, insbesondere von T3E. Bereits 1988 und 1990 wurden mit AvrBs1 und AvrBs2 die ersten T3E von *Xcv* charakterisiert (Ronald und Staskawicz, 1988; Minsavage *et al.*, 1990). Das Spektrum bekannter, verifizierter T3E wurde seither in verschiedenen Studien sukzessive erweitert (Tabelle 1). Dazu trugen bioinformatische T3E-Vorhersagen und die Entschlüsselung des *Xcv* 85-10-Genoms maßgeblich bei

(Thieme *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde das Repertoire bekannter T3E von *Xcv* 85-10 um sieben Effektoren auf >30 T3E erweitert (Teper *et al.*, 2015).



Abbildung 3. Typische Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit.

Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf (A) Blättern und (B) Früchten von Paprika und Tomate sind dargestellt. Abbildung aus Potnis *et al.* (2015).

Zahlreiche T3E von *Xcv* 85-10 wurden bereits charakterisiert; die genauen molekularen Wirkmechanismen sind aber häufig nicht im Detail bekannt (Tabelle 1). Einer der ersten Schritte der T3E-Charakterisierung ist die Analyse, ob die genomische Mutation des T3E (Deletion, Insertion oder Leserasterverschiebung) das *in planta*-Wachstum von *Xcv* 85-10 negativ beeinflusst. Ein positiver Einfluss auf das Wachstum in suszeptiblen Tomaten- oder Paprikapflanzen wurde für AvrBs2, XopD, XopJ, XopN, XopX, XopAD und HpaA beschrieben, für 24 weitere T3E hingegen nicht festgestellt (Auflistung und Referenzen in Tabelle 14 im Anhang). HpaA ist ein Regulator des T3SS, der selbst T3SS-abhängig transloziert wird und zur Translokation anderer T3E beiträgt (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008). Daher kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Virulenzfunktion von HpaA ausschließlich auf dessen Beitrag zur T3E-Translokation zurückzuführen ist, oder ob HpaA die Pflanze darüber hinaus beeinflusst. Die Einzelmutation der meisten T3E von 85-10 hat keinen Einfluss auf das *in planta*-Wachstum, was meist mit möglichen redundanten Funktionen von T3E erklärt wird (Roden *et al.*, 2004; Thieme *et al.*, 2007; Büttner und Bonas, 2010; Schulze *et al.*, 2012). Ein Beispiel für T3E, die vermutlich redundante Funktionen haben, sind XopB und XopS. Sowohl $85-10\Delta xopS$ als

auch 85-10 Δ *xopB* zeigen im Vergleich zum Wildtyp (WT) kein verändertes *in planta*-Wachstum, jedoch verringerte Symptombildung in suszeptiblen Wirtspflanzen (Schulze *et al.*, 2012). Die Doppeldeletion hatte allerdings ein signifikant geringeres Wachstum zur Folge, und für beide T3E wurde eine PTI-supprimierende Aktivität festgestellt. Ein weiterer T3E, dessen Mutation die Symptombildung, aber nicht das *in planta*-Wachstum beeinflusst, ist XopAP (Teper *et al.*, 2015). Aufgrund der vorhergesagten Klasse III-Lipase-Aktivität und der Homologie zu einer pflanzlichen DAD1-Domäne, die an der Bildung des Pflanzenhormons Jasmonat (JA) beteiligt ist, wird vermutet, dass XopAP die JA-Biosynthese positiv beeinflusst (Teper *et al.*, 2015). Damit wäre XopAP der erste bekannte T3E von *Xcv* 85-10, der die pflanzliche JA-Homöostase direkt manipuliert. JA ist Antagonist des Hormons Salizylsäure (SA), das ein essenzieller Faktor bei der Pflanzenabwehr gegen (hemi)biotrophe Pathogene ist und bei ETI und PTI produziert wird (Pieterse *et al.*, 2012). XopAP könnte also die Pflanzenabwehr durch Induktion der JA-Biosynthese hemmen.

Phytohormone spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation pflanzlicher Abwehrprozesse (Pieterse *et al.*, 2009). Neben den „klassischen Abwehrhormonen“ Ethylen (ET), JA und SA, geraten auch Abscisinsäure (ABA), Auxine, Gibberellinsäuren (GA), Cytokinine (CK) und Brassinosteroide (BA) als wichtige Regulatoren der Pflanzenabwehr zunehmend in den Fokus der Forschung (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Denancé *et al.*, 2013). Die Manipulation Pflanzenhormon-assoziiierter Prozesse wurde für T3E von *P. syringae* beschrieben: mit SA-Signalwegen interferieren beispielsweise die Cysteinprotease HopZ1a (Macho *et al.*, 2010) und HopI1 (Jelenska *et al.*, 2007). HopX1 aktiviert JA-Signalwege (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014), HopQ1 aktiviert Cytokinin-Signalwege (Hann *et al.*, 2013) und ABA-Signalwege werden beispielsweise von HopAM1 (Goel *et al.*, 2008) und AvrPtoB (de Torres-Zabala *et al.*, 2007) induziert. Bisher wurde lediglich für zwei T3E von *Xcv* 85-10 eine Modulation von Pflanzenhormon-assoziierten Prozessen beschrieben, XopJ und XopD. XopJ interagiert mit einer Proteasom-Untereinheit (RPT6) und inhibiert die Proteasom-Aktivität (Üstün *et al.*, 2013). Dies geht mit einer verringerten SA-Akkumulation während der *Xcv*-Infektion einher und resultiert in einer verringerten SA-vermittelten Pflanzenabwehr (Üstün *et al.*, 2013). Mittels SUMO-Protease-Aktivität destabilisiert XopD einen Transkriptionsfaktor des ET-Signalwegs (ERF4, „ethylene responsive transcription factor“), was zur Suppression der ET-Antwort und einer reduzierten Pflanzenabwehr gegen *Xcv* führt (Kim *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit nehmen die „Core“-Effektoren XopQ und XopL eine zentrale Position ein. XopL wurde in Vorarbeiten charakterisiert (Singer *et al.*, 2013). Dabei wurde festgestellt, dass XopL PTI-Reaktionen in einem *A. thaliana*-Protoplastensystem supprimiert, dass die transiente *xopL*-Expression mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *N. benthamiana* zu einem langsamen Zelltod führt, und dass die *xopL*-Deletion keinen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* hat. XopL besteht im Wesentlichen aus einer N-terminalen LRR-Domäne und einer C-terminalen Domäne (CTD), für die eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität *in planta* und *in vitro* nachgewiesen wurde. Während allein die XopL-LRR für die PTI-supprimierende Aktivität verantwortlich ist, ist die Aktivität der CTD und die Fusion von CTD

und LRR essenziell zum Auslösen der Zelltodreaktion in *N. benthamiana*. Während der *Xcv*-Infektion bindet die LRR vermutlich Proteine, die dann durch die CTD ubiquitiniert werden, wobei Substrate oder Interaktoren nicht bekannt sind (Singer *et al.*, 2013).

Für XopQ von *Xcv* 85-10 war zu Beginn der Arbeit bekannt, dass es T3SS-abhängig in Pflanzenzellen transloziert wird und die Mutation von *xopQ* die Virulenz von 85-10 in suszeptiblen Paprika- und Tomatenpflanzen nicht beeinflusst (Roden *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine strukturelle Ähnlichkeit von XopQ zu einer Nukleosid-Hydrolase aus Protozoen vorhergesagt, die vornehmlich Inosin- und Uridin-haltige Nukleoside hydrolytisch in Base und Zucker spaltet (Roden *et al.*, 2004). XopQ ist ein „Core“-T3E von *Xanthomonas* spp. mit Homologen in *Ralstonia* spp. und *Pseudomonas* spp. und das XopQ-Homolog HopQ1 aus *Pto* determiniert das Wirt-Spektrum des Bakteriums (Wei *et al.*, 2007). Seit 2013 wurden zahlreiche Erkenntnisse zu XopQ aus *Xcv* (Teper *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2015) oder dessen Homologen aus *Xoo* (Sinha *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015) und *P. syringae* (Giska *et al.*, 2013; Hann *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2013b) publiziert. U. a. wurde dabei festgestellt, dass XopQ aus *Xcv* mit pflanzlichen 14-3-3-Proteinen interagiert (Teper *et al.*, 2014). Weitere wesentliche Erkenntnisse dieser Studien werden gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Diskussionsteil erwähnt.

Tabelle 1. Bekannte T3E von *Xcv* 85-10.

Effektor	(Vorhergesagte) Funktion / Merkmal	Referenz
AvrBs1	Unbekannte Funktion	(Ronald und Staskawicz, 1988; Escobar <i>et al.</i> , 2001)
AvrBs2	Glycerolphosphodiesterase	(Kearney und Staskawicz, 1990; Zhao <i>et al.</i> , 2011)
AvrRxo1 ^{a)}	Unbekannte Funktion	(Salomon <i>et al.</i> , 2011)
AvrRxv	YopJ/AvrRxv-Familie, Protease / Acetyltransferase, 14-3-3-Bindung	(Whalen <i>et al.</i> , 1993; Whalen <i>et al.</i> , 2008)
XopB	HopD1-Familie, unbekannte Funktion	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopC	HAD-like Hydrolase	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Salomon <i>et al.</i> , 2011)
XopD	SUMO-Protease, SIERF4-Destabilisierung, unspezifische DNA-Bindedomäne	(Noël <i>et al.</i> , 2002; Hotson <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2013)
XopE1	Vorhergesagte Transglutaminase, N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopE2	Vorhergesagte Transglutaminase, N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopF1	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopF2	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopG	HopH-Familie, vorhergesagte Zink-Metalloprotease	(Potnis <i>et al.</i> , 2011; Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopH	Tyrosin-Phosphatase	(Potnis <i>et al.</i> , 2012)
XopI	F-Box Protein	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopJ	YopJ/AvrRxv-Familie, Protease / Acetyltransferase, N-Myristoylierungsmotiv	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Thieme <i>et al.</i> , 2007; Üstün <i>et al.</i> , 2013)
XopK	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopL	E3-Ubiquitin-Ligase	(Singer <i>et al.</i> , 2013)
XopM	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopN	14-3-3-Bindung	(Roden <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2009; Taylor <i>et al.</i> , 2012)
XopO	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopP	Unbekannte Funktion	(Roden <i>et al.</i> , 2004)

XopQ	Nukleosid-Hydrolase-Faltung, 14-3-3-Bindung	(Roden <i>et al.</i> , 2004; Teper <i>et al.</i> , 2014)
XopR	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopS	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopV	Unbekannte Funktion	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopX	Unbekannte Funktion	(Metz <i>et al.</i> , 2005; Stork <i>et al.</i> , 2015)
XopZ^{a)}	Unbekannte Funktion	(Ryan <i>et al.</i> , 2011)
XopAA	Unbekannte Funktion, („ <i>Early chlorosis factor</i> “)	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
XopAD	Vorhergesagte Nukleotidyl-Transferase	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAK	Vorhergesagte Deaminase	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAP	Vorhergesagte Typ III-Lipase	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAU	Vorhergesagte Serin/Threonin-Kinase	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAV	Unbekannte Funktion	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAW	Vorhergesagtes Kalzium-Bindemotiv	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
XopAX	Unbekannte Funktion	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
HpaA	T3SS-Kontrollprotein	(Huguet <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 2008)
AvrBs3 ^{b)}	TAL-Effektor, Transkriptionsaktivator	(Bonas <i>et al.</i> , 1989; Boch und Bonas, 2010)
AvrBsT ^{b)}	YopJ/AvrRxv-Familie, Acetyl-Transferase	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; Kim <i>et al.</i> , 2010; Cheong <i>et al.</i> , 2014)

a) Die Translokation von AvrRxo1 (XCV4428) und XopZ (XCV2059) durch *Xcv* 85-10 wurde bisher nicht nachgewiesen.
 b) AvrBsT und AvrBs3 werden nicht von *Xcv* 85-10 kodiert, sondern von *Xcv* 75-3 (AvrBsT) bzw. *Xcv* 82-8 (AvrBs3) und werden aufgeführt, da sie in dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert wurden. Die 9 von Ryan *et al.* (2011) als „Core“-Effektoren von *Xanthomonas* spp. beschriebenen T3E sind fett gedruckt.

1.5 Zielstellung

Die Verbreitung pflanzlicher Resistenz- bzw. Erkennungsfaktoren gegen *Xcv* oder einzelne T3E in Nicht-Wirtspflanzen der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) wurde bisher nicht gezielt untersucht. In dieser Arbeit sollte deshalb eine mögliche Korrelation zwischen der *Solanaceae*-Phylogenie und den pflanzlichen Reaktionen nach *Xcv*-Infektion bzw. transienter T3E-Expression analysiert werden. Dies sollte zeigen, ob mögliche pflanzliche Resistenz- und Erkennungsfaktoren in einer bestimmten taxonomischen Einheit konserviert, oder zufällig verbreitet sind. Ausgehend von dieser Studie wurde die Verbreitung von Avirulenzmechanismen gegen den T3E XopQ erforscht. Auf Grundlage der in der Arbeitsgruppe A. Savchenko (Universität Toronto, Kanada) ermittelten, unveröffentlichten XopQ-Kristallstruktur, sollten funktionell relevante Bereiche dieses Effektors bestimmt werden.

Im Vergleich zu anderen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen ist die mögliche Manipulation von hormonellen Signalwegen durch T3E bei der *Xcv*-Wirt-Interaktion bisher wenig erforscht. Durch Virulenzversuche in Tomatenpflanzen mit veränderter Hormon-Homöostase, sollte ein Einfluss von Ethylen, Gibberellinsäure und Abscisinsäure auf die Pflanzenabwehr gegen *Xcv* analysiert werden. Schließlich sollte untersucht werden, wie ein einzelner T3E (XopL) den ABA-Signalweg beeinflussen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 beschriebenen Bakterien- und Hefestämme verwendet. Die Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte in „Lysogeny Broth“ (LB)-Medium (Miller, 1972) bei 37°C. Die Anzucht von *Xcv* erfolgte in „Nutrient-Yeast-Glycerol“ (NYG)-Vollmedium (Daniels *et al.*, 1984), von *Agrobacterium tumefaciens* in „Yeast Extract Broth“ (YEB)-Medium und von *Saccharomyces cerevisiae* in YPDA-Vollmedium oder SD-Minimalmedium (*Yeast Protocol Handbook*, Clontech) bei 30°C. Festmedien enthielten, wenn nicht anders angegeben, 1,5% (w/v) Agar. Wenn nötig, wurden den Medien folgende Antibiotika hinzugefügt: Ampicillin (100 µg/ml in Festmedium, 50 µg/ml in Flüssigmedium), Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (15 µg/ml), Rifampicin (100 µg/ml), Spectinomycin (100 µg/ml), Cycloheximid (50 µg/ml), X-Gal (40 µg/ml).

Tabelle 2. Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
DH5α (λpir)	<i>endA1 hsdR17 (rK- mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA [Nal^r] relA1</i> Δ[<i>lacZYA-argF</i>]U169 F ⁺ [φ80 <i>dlacZ</i> Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i>] [λpir]	(Ménard <i>et al.</i> , 1993)
MM294 (pRK2013)	F- <i>endA1 hsdR17 (rK⁻ mK⁺) glnV44 thi-1relA1 RfbD1 SpoT1</i> ; Helferstamm für die Konjugation; pRK2013 trägt <i>tra</i> -Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates	(Backman <i>et al.</i> , 1976; Figurski und Helinski, 1979)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Paprika Tomatenrasse 2, Wildtyp, Rif ^r	(Bonas <i>et al.</i> , 1989)
85-10Δ <i>xopQ</i>	Derivat von <i>Xcv</i> 85-10, <i>xopQ</i> -Deletionsmutante	Diese Arbeit
85-10Δ <i>xopN</i>	Derivat von <i>Xcv</i> 85-10, <i>xopN</i> -Deletionsmutante	Diese Arbeit
85-10Δ <i>avrBs2</i>	Derivat von <i>Xcv</i> 85-10, <i>avrBs2</i> -Deletionsmutante	(Schulze, 2013)
85-10Δ <i>hrcN</i>	Derivat von <i>Xcv</i> 85-10, <i>hrcN</i> -Deletionsmutante	(Lorenz und Büttner, 2009)
85*	Derivat von <i>Xcv</i> 85-10 mit <i>hrpG</i> *-Mutation (konstitutive Expression von T3SS-Komponenten)	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	C58-Derivat, Ti-Plasmid pMP90 (pTiC58-Derivat), Nopalinsynthesegene, Rif ^r , Gent ^r	(Holsters <i>et al.</i> , 1980)
GV2260	C58-Derivat, Ti-Plasmid pGV2260 (pTiB6S3-Derivat), Octopinsynthesegene Rif ^r , Gent ^r	(Deblaere <i>et al.</i> , 1985)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
MAV103	MATa, <i>his3</i> -Δ200, <i>ade2</i> -Δ101, <i>trp1</i> -Δ901, <i>leu2-3,112 gal4</i> Δ <i>gal80</i> Δ <i>SPAL10::URA3 GAL1::HIS3@LYS2 GAL1::lacZ</i>	(Vidal <i>et al.</i> , 1996)
PJ69-4a	MATa <i>trp1</i> -Δ901 <i>leu2-3,112 901 ura3-52 his3</i> -Δ200 <i>gal4</i> Δ <i>gal80</i> Δ <i>GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)

Rif^r, Rifampicin-Resistenz; Gent^r, Gentamycin-Resistenz.

2.2 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide

In Tabelle 3 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Diese dienten zum Großteil zur Erstellung der in Tabelle 4 aufgeführten Plasmide. Plasmide wurden mittels chemischer Transformation oder Elektroporation in *E. coli* oder *A. tumefaciens* (Sambrook *et al.*, 1989) und mittels triparentaler Konjugation in *Xcv* eingebracht (Figurski und Helinski, 1979). In *S. cerevisiae* wurden Plasmide mittels „LiAc/SS carrier DNA/PEG“-Methode transformiert bzw. ko-transformiert (Gietz und Schiestl, 2007).

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'-3'	Verwendung
XopQ_5'del.for	TTTGGTCTCTCGACCGCGATTACTACTCCGAAGG	Generieren von pOGG2: <i>xopQ</i> .del
XopQ_5'del.rev	TTTGGTCTCTTCCC CGCTCCG CAGCTTTCGCG	
XopQ_3'del.for	TTTGGTCTCTGGGAGGACCTCTGGCAGTGAAAGG	
XopQ_3'del.rev	TTTGGTCTCTATGGCAACCGCCGCCAGTGCGC	
XopN_5'del_for	TTTGGTCTCTCGACCCAAGACCGGAAAAGAACGA	Generieren von pOGG2: <i>xopN</i> .del
XopN_5'del_rev	TTTGGTCTCTCGGGACATCTCCTGACGTGTAT	
XopN_3'del_for	TTTGGTCTCTCCCGGGTGATGATCCGGCATGTTGC	
XopN_3'del_rev	TTTGGTCTCTATGGGGGCAGGAGGTTACGG	
XCC1072_ENTR_for	CACCATGGATTCCATCAGGCATCGC	Klonierung von pENTR/D: <i>XopQ</i> _{xcc}
XCC1072_rev_ns	TTGTTTCGTGGCAAGCGCCGCTTT	
XopQ_D116A,N118A_for	CTGTTCACCGCCCCGGCCAAGGACCC*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_D116,N118A</i>
XopQ_D116A,N118A_rev	CAGCGTGTGCGAGCGGCAACGGCG	
XopQ_D120A,D122A,D123A_for	CCGAACAAGGCCCCCGCCGCTGTCGTGACC*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_D120A,D122A,D123A</i>
XopQ_D120A,D122A,D123A_rev	GTCGGTGAACAGCAGCGTGTGCGAGCGG	
XopQ_E308A,Y311F_for	CCTGAGCAAGGCAGCTGCCTTCAGGGCCGCGG*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_E308A,Y311F</i>
XopQ_E308A,Y311F_rev	ATGCGCAGCGGAATGCCGAGTTGCTGCGCG	
XopQ_N396A,Y398F,D399A_for	GACCAAGCTCGCTCTCTTCGCTCCGCTGACCCT	Generieren von pUC57: <i>xopQ_N396A,Y398F,D399A</i>
XopQ_N396A,Y398F,D399A_rev	ACCTGCGGCCAGATGGCGTCAAGCTCA	
XopQ_D275A,R277A_for	TCGTGCAACCGGCCACGGCCGCTACAACAA*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_D275A,R277A</i>
XopQ_D275A,R277A_rev	GACCATCGGGCTCCCTGGCCGGGTCGATG	
XopQ_N280A,N281A,D284A_for	GCGCCTACGCCGCCACCGCCATCCACGC*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_N280A,N281A,D284A</i>
XopQ_N280A,N281A,D284A_rev	GCGTGTCCGGTTGCACGAGACCATCGG	
XopQ_N340D,A341D_for	GATGTGCAGAAAGACGACTTGAAAGGCCTG*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_N340D,A341D</i> und pUC57: <i>xopQ_A341W</i>
XopQ_N340D,A341D_rev	GCGCAGATACTCGCCACGGGGTGGC	
XopQ_N340A,K343A_for	GCAGAAAGCCGCTTGGCAGGCCTGTG*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_N340A,K343A</i>
XopQ_N340A,K343A_rev	ACATCGCGCAGATACTCGCCACGG	
XopQ_A341W_for	GATGTGCAGAAAACTGGTTGAAAGGCCTG*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_A341W</i>
XopQ_Δ335_for	CAGAAAAACGCCTTGAAAGGCCTG*	Generieren von pUC57: <i>xopQ_ΔR335</i> und pUC57: <i>xopQ_Y333A</i>
XopQ_Δ335_rev	CACATCCAGATACTCGCCACGGGGT	
XopQ_Y333A_rev	CACATCGCGCAGAGCCTCGCCACG	Generieren von pUC57: <i>xopQ_Y333A</i>
XopQ_F319E_for	GTACCGCCAGCGGAGTACGAAGGCATC*	Generieren von
XopQ_F319E_rev	GGCGGCCCTGTAGGCAGCTTCT	pUC57: <i>xopQ_F319A</i> und

Material und Methoden

XopQ_Y320A_for	GTACCGCCAGCGTTCGCCGAAGGCATC*	pUC57: <i>xopQ_Y320A</i>
XopQ_+207fGG	TTTGGTCTCTTATGTTGACGCCTGCCAGCGCGG	Generieren von
XopQ_ns_rev	TTTGGTCTCTACCGCGCCCGCGTTGCCCTCGTCC TG	pUC57: <i>xopQ</i> Δ 2-69 und pUC57: <i>xopQ</i>
XopQ_Δ157-217_for	GAGCGTCTGGCGACCTC*	
XopQ_Δ175-205_for	GACGCGGTGCACACCG*	
XopQ_Δ157-217_rev	TTGCGATCGCATGTCCGGC	
XopQ_Δ175-217_rev	GCGAACCTCCGGCAATGC	
XopQ_Δ157-217_rev	TTGCGATCGCATGTCCGGC	
XopQ_Δ157-174_for	GTCGCGCGCGGTCAGGA*	
XopQ_Δ157-165_for	GATCGCCTGGCATTGCCG*	
XopQ_Δ157-174_for	GTCGCGCGCGGTCAGGA*	Generieren von pUC57- Derivaten, die XopQ mit verschiedenen internen Deletionen kodieren
XopQ_Δ166-174_rev	GAAGACACCTTTGGCC	
XopQ_Δ319-391_for	GTGACCAAGCTCAATCTCTAC*	
XopQ_Δ319-391_rev	CGCTGGCGGTACGGCG	
XopQ_Δ336-389_for	CCGCAGGTGACCAAGCT*	
XopQ_Δ336-389_rev	GCGCAGATACTCGCCA	
XopQ_Δ369-391_rev	TGCGACGAACGTACGGAA	
XopQ_Δ336-353_for	ATCCCCGGCCTGGATACG*	
XopQ_Δ354-369_for	CAGGTTGGCCTGGATGCCT*	
XopQ_Δ354-369_rev	CAACCGCAGGATCCAGCGGC	
XopQ_Δ455-462_for	GGGCGCGGTGAGAGACAA*	Generieren von
XopQ_Δ455-462_rev	GAGCGCGCCTTGGCCA	pUC57: <i>xopQ</i> Δ 455-462
HopQ1-1_GG_for	TTTGGTCTCTTATGCATCGTCCTATCACCGCA	Klonierung von <i>hopQ1</i> _{Pro} ohne Stop-Codon
HopQ1-1_sl_GG-rev	TTTGGTCTCTACCATCTGGGGCTACCGTCGACT	
xopQ_GG_for	TTTGGTCTCTTATGCAGCCACCGCAATCCGT	Klonierung von <i>xopQ</i>
XopL.GG.for	TTTGGTCTCTTATGCGACGCGTCGATCAACCA	Klonierung von <i>xopL</i> ₁₋₄₄₉
LRR.GG.rev.ns	TTTGGTCTCTCACCTTCGGCGGGGCGCGCAACT	(LRR) ohne Stop-Codon
CTD.GG.for	TTTGGTCTCTTATGCCAGGGCGGACCGGACCG	Klonierung von <i>xopL</i> ₄₅₀₋₆₆₀
XopL.GG.rev.ns	TTTGGTCTCTCACCTGATGGCCTGAAGGTTCC	(CTD) ohne Stop-Codon
Sl.ARM.1.for	TTTGGTCTCTTATGGAGAACCAAGCAAAG	Klonierung von <i>CaARIA</i> ohne Stop-Codon
Sl.ARM.1.rev.ns	TTTGGTCTCTCACCGAGGTCAGCTTGAATTG	
Sl.LOC4533.for	TTTGGTCTCTTATGGAAGCGATACGAAAGCA	Klonierung von <i>CaITSN1</i> ohne Stop-Codon
Sl.LOC4533.rev.ns	TTTGGTCTCTCACCGAAAACCTTCGGCAACTTTGC	
Nb.ARIA.sil.for	CACCCTTTGGCTCTCCGAACAGGAG	Klonierung des <i>NbARIA</i> - <i>Silencing</i> Konstrukts
Nb.ARIA.sil.rev	CATGAAAATAGCAGCATCAAAGTCG	
Nb.ARIA.qRT.for	TCATTGTTGATGCTGGAGCTCTG	qRT-PCR für <i>NbARIA</i> - Transkriptakkumulation
Nb.ARIA.qRT.rev	CTTTGGCTCTCCGAACAGGAGG	
Nb.EF1a.qRT.for	AGCTTTACCTCCCAAGTCATC	qRT-PCR für <i>NbEF1a</i> - und F- Box Protein-Transkript- Akkumulation (Liu <i>et al.</i> , 2012)
Nb.EF1a.qRT.rev	AGAACGCCTGTCAATCTTGG	
Nb.FBox.qRT.for	GGCACTCACAAACGTCTATTC	
Nb.FBox.qRT.rev	ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT	

*) Oligonukleotid mit 5'-Phosphorylierung

Tabelle 4. In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmid/Vektor	Verwendung/Eigenschaft	Referenz
Klonierungsvektoren und -plasmide		
pUC57	Klonierungsvektor zur „blunt end“-Insertion von DNA-Fragmenten, Amp ^r	Genscript, USA
pUC57: <i>xopQ</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>hopQ1_{P10}</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>hopQ1_{P10}</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA2-69</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA2-69</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA455-462</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA455-462</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA157-217</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA157-217</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA175-217</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA175-217</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA175-205</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA175-205</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA157-174</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA157-174</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA157-165</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA157-165</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA166-174</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA166-174</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA319-391</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA319-391</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA336-389</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA336-389</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA369-391</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA369-391</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA372-382</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA372-382</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA336-353</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA336-353</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQA354-369</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQA354-369</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_S65A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_S65A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_D116,N118A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_D116,N118A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_D120A,D122A,D123A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_D120A,D122A,D123A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_E308A,Y311F</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_E308A,Y311F</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_N396A,Y398F,D399A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_N396A,Y398F,D399A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_D275A,R277A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_D275A,R277A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_N280A,N281A,D284A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_N280A,N281A,D284A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_F319A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_F319A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_Y320A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_Y320A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_A341W</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_A341W</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_N340D,A341D</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_N340D,A341D</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_A341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_A341W,N352G,L353D,I354Q</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_AR335,A341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_AR335,A341W,N352G,L353D,I354Q</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_R335A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_R335A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_AR335</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_AR335</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_Y333A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_Y333A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_N340A,K343A</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_N340A,K343A</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_G344E,L345E</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_G344E,L345E</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_A341E,G344E,L345E,G348E</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_A341E,G344E,L345E,G348E</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>xopQ_A341E,G344E,L345E</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopQ_A341E,G344E,L345E</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>SIARIA</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>ARIA</i> (XM_004247119.2) aus Tomate *	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert
pUC57: <i>CaARIA</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>ARIA</i> aus Paprika *	Diese Arbeit
pUC57: <i>CaITSN1</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>ITSN1</i> aus Paprika *	Diese Arbeit
pUC57: <i>SIHMGR2</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>HMGR2</i> (NM_001309190.1) aus Tomate *	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert
pUC57: <i>SIFBox</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>FBox</i> (XM_004239170.2) aus Tomate *	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert

pUC57: <i>xopL</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopL</i> *	P. John, U. Bonas, unpubliziert
pUC57: <i>LRR</i>	pUC57-Derivat, Insertion von <i>xopL_1-449</i> *	Diese Arbeit
pUC57: <i>CTD</i>	pUC57-Derivat, Expression von <i>xopL_450-660</i> *	Diese Arbeit
pENTR/D-TOPO	„Entry“-Vektor für GATEWAY-Klonierung, Kan ^r	Invitrogen, Deutschland
pENTR/D: <i>xopQ_{Xcc}</i>	pENTR/D-TOPO-Derivat, kodiert <i>xopQ_{Xcc}</i> aus <i>Xcc</i> ATCC 33913	Diese Arbeit
Vektoren und Plasmide zur Expression in <i>Xcv</i>		
pBRM	„Golden Gate“-Vektor, zur Expression in <i>Xcv</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors, Gent ^r	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010b)
pBRM: <i>xopQ</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>hopQ1_{Pto}</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>hopQ1_{Pto}:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA12-69</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA12-69:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA455-462</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA455-462:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA157-217</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA157-217:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA175-217</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA175-217:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA175-205</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA175-205:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA157-174</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA157-174:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA157-165</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA157-165:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA166-174</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA166-174:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA319-391</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA319-391:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA336-389</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA336-389:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA369-391</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA369-391:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA372-382</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA372-382:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA336-353</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA336-353:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQA354-369</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQA354-369:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_Δ65A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_Δ65A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_Δ116,N118A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_Δ116,N118A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_Δ120A,Δ122A,Δ123A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_Δ120A,Δ122A,Δ123A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔN396A,Y398F,Δ399A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔN396A,Y398F,Δ399A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_Δ275A,R277A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_Δ275A,R277A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔN280A,N281A,Δ284A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔN280A,N281A,Δ284A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔF319A</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔF319A:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔA341W</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔA341W:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔN340D,A341D</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔN340D,A341D:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔA341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔA341W,N352G,L353D,I354Q:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔR335,A341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔR335,A341W,N352G,L353D,I354Q:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔG344E,L345E</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔG344E,L345E:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pBRM: <i>xopQ_ΔA341E,G344E,L345E,G348E</i>	pBRM-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔA341E,G344E,L345E,G348E:c-Myc</i>	Diese Arbeit
pGGX1: <i>avrBs3</i>	zur Expression in <i>avrBs3:FLAG</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors in <i>Xcv</i> , Gent ^r	A. Sorgatz, U. Bonas, unpubliziert
Vektoren und Plasmide zur <i>A. tumefaciens</i>-vermittelten Expression in <i>planta</i>		
pGGA1	„Golden Gate“-Binärvektor, zur Expression von 3'-translationalen Fusionen an <i>GFP</i> unter Kontrolle des 35S-Promotors in <i>planta</i> , Spec ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pGGA1: <i>xopQ</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_{Xcc}</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_{Xcc}:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>hopQ1_{Pto}</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>hopQ1_{Pto}:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQA12-69</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQA12-69:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQA455-462</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQA455-462:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQA157-217</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQA157-217:GFP</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pGGA1: <i>xopQ1175-217</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1175-217:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1175-205</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1175-205:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1157-174</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1157-174:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1157-165</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1157-165:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1166-174</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1166-174:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1319-391</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1319-391:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1336-389</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1336-389:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1369-391</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1369-391:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1372-382</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1372-382:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1336-353</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1336-353:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ1354-369</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ1354-369:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_D116,N118A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_D116,N118A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_D120A,D122A,D123A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_D120A,D122A,D123A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_E308A,Y311F</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_E308A,Y311F:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_N396A,Y398F,D399A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_N396A,Y398F,D399A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_D275A,R277A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_D275A,R277A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_N280A,N281A,D284A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_N280A,N281A,D284A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_F319A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_F319A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_Y320A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_Y320A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_A341W</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_A341W:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_N340D,A341D</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_N340D,A341D:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_A341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_A341W,N352G,L353D,I354Q:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_ΔR335,A341W,N352G,L353D,I354Q</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔR335,A341W,N352G,L353D,I354Q:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_R335A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_R335A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_ΔR335</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_ΔR335:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_Y333A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_Y333A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_N340A,K343A</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_N340A,K343A:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_G344E,L345E</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_G344E,L345E:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_A341E,G344E,L345E,G348E</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_A341E,G344E,L345E,G348E:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopQ_A341E,G344E,L345E</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopQ_A341E,G344E,L345E:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>xopO</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopO:GFP</i>	P. John, U. Bonas, unpubliziert
pGGA1: <i>xopP</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopP:GFP</i>	P. John, U. Bonas, unpubliziert
pGGA1: <i>SIARIA</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>SIARIA:GFP</i>	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert
pGGA1: <i>CaARIA</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>CaARIA:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>CaITSN1</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>CaITSN1:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>SIHMGR2</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>SIHMGR2:GFP</i>	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert
pGGA1: <i>SIFBox</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>SIFBox:GFP</i>	C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert
pGGA1: <i>XopL</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopL:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>LRR</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopL_1-449:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA1: <i>CTD</i>	pGGA1-Derivat, Expression von <i>xopL_450-660:GFP</i>	Diese Arbeit
pGGA2: <i>xopG</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert GFP:XopG, Spec ^f	H. Prochaska, U. Bonas, unpubliziert
pGGA7: <i>gfp</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert GFP:c-Myc, Spec ^f	O. Müller, U. Bonas, unpubliziert
pGGA11: <i>XopL</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopL:mOrange2, Spec ^f	P. John, U. Bonas,

Material und Methoden

		unpubliziert
pGGA27	„Golden Gate“-Binärvektor für BiFC-Analysen, 35S-Promotor, zur Expression von 3'-translationalen Fusionen an $3 \times HA:YFP_C$ unter Kontrolle des 35S-Promotors <i>in planta</i> , Spec ^f	O. Müller, U. Bonas, unpubliziert
pGGA27: <i>xopS</i>	pGGA27-Derivat zur Expression von <i>xopS:HA:YFP_C</i>	O. Müller, U. Bonas, unpubliziert
pGGA27: <i>avrBs1</i>	pGGA27-Derivat zur Expression von <i>avrBs1:HA:YFP_C</i>	O. Müller, U. Bonas, unpubliziert
pGGA27: <i>xopQ</i>	pGGA27-Derivat zur Expression von <i>xopQ:HA:YFP_C</i>	Diese Arbeit
pGGA29	„Golden Gate“-Binärvektor für BiFC-Analysen, 35S-Promotor, zur Expression von 3'-translationalen Fusionen an $4 \times c-Myc:YFP_N$ unter Kontrolle des 35S-Promotors <i>in planta</i> , Spec ^f	O. Müller, U. Bonas, unpubliziert
pGGA29: <i>xopQ</i>	pGGA29-Derivat zur Expression von <i>xopQ:c-Myc:YFP_N</i>	Diese Arbeit
pGWB2: <i>xopL_strep</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopL:Strep, Kan ^r	(Singer <i>et al.</i> , 2013)
pGWB2: <i>xopLm_strep</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopL_H584A,L585A,G586E:Strep, Kan ^r	(Singer <i>et al.</i> , 2013)
pGWB2: <i>avrBs2</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert AvrBs2, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pGWB5: <i>xopJ</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopJ:GFP, Kan ^r	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pGWB5: <i>xopK</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopK:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pGWB5: <i>xopM</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopM:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pGWB5: <i>xopV</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopV:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pGWB5: <i>avrBs1</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert AvrBs1:GFP, Kan ^r	(Gürlebeck <i>et al.</i> , 2009)
pGWB5: <i>avrBs3</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert AvrBs3:GFP, Kan ^r	(Morbiter <i>et al.</i> , 2011)
pGWB5: <i>avrRxv</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert AvrRxv:GFP, Kan ^r	R. Szczesny, U. Bonas, unpubliziert
pGWB6: <i>avrBsT</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert GFP:AvrBsT, Kan ^r	R. Szczesny, U. Bonas, unpubliziert
pGWB17: <i>xopJ</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopJ:c-Myc, Kan ^r	S. Schulze, U. Bonas, unpubliziert
pK7FWG2: <i>xopB</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopB:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pK7FWG2: <i>xopC</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopC:GFP, Kan ^r	E. Herzfeld, U. Bonas, unpubliziert
pK7FWG2: <i>xopE1</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopE1:GFP, Kan ^r	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pK7FWG2: <i>xopE2</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopE2:GFP, Kan ^r	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
pK7FWG2: <i>xopH</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopH:GFP, Kan ^r	A. Schonsky, U. Bonas, unpubliziert
pK7FWG2: <i>xopI</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopI:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pK7FWG2: <i>xopS</i>	Binärvektor, 35S-Promotor, kodiert XopS:GFP, Kan ^r	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
Vektoren und Plasmide zur Expression in Hefe		
pOGG2	„Golden Gate“-Vektor, Suizidvektor, <i>sacB sacQ mobRK2</i> oriR6K, Spec ^f	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pOGG2: <i>xopQ_del</i>	pOGG2-Derivat mit flankierenden Sequenzen von <i>xopQ</i>	Diese Arbeit
pOGG2: <i>xopN_del</i>	pOGG2-Derivat mit flankierenden Sequenzen von <i>xopN</i>	Diese Arbeit
Vektoren und Plasmide zur Expression in Hefe		
pGBT9	Vektor zur Synthese von Proteinen in Hefe, die C-terminal an die Gal4-Bindedomäne fusioniert sind, <i>adh1</i> -Promotor, Amp ^r	Clontech, Heidelberg, Deutschland
pGBT9: <i>BDAD</i>	pGBT9-Derivat zur Synthese von Gal4 in Hefe	S. Mücke, U. Bonas,

		unpubliziert
pGBT9: <i>BD</i>	pGBT9-Derivat zur Synthese der Gal4-Bindedomäne in Hefe	S. Mücke, U. Bonas, unpubliziert
pGBT9: <i>xopL</i>	pGBT9-Derivat zur Synthese von Gal4-Bindedomäne:XopL in Hefe	Diese Arbeit
pGBT9: <i>xopLm</i>	pGBT9-Derivat zur Synthese von Gal4-Bindedomäne:XopL_H584A,L585A,G586E in Hefe	Diese Arbeit
pGADT7	Vektor zur Synthese von Proteinen in Hefe, die C-terminal an die Gal4-Aktivierungsdomäne und HA-Epitop fusioniert sind, <i>adh1</i> -Prmotor, Amp ^r	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Vektoren und Plasmide für VIGS		
TRV-RNA1	Binärer VIGS-Vektor, der Replikasen, „ <i>Movement</i> “ Protein und Cystein-reiches Protein von TRV kodiert, Kan ^r	(Liu <i>et al.</i> , 2002)
TRV-RNA2a	GATEWAY-kompatibles Derivat von pTRV-RNA2 (Liu <i>et al.</i> , 2002), kodiert 3 TRV-Proteine und enthält Integrationsstelle für <i>Silencing</i> -Fragment von Interesse, Kan ^r , Amp ^r	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010a)
TRV-RNA2a_ <i>NbARIA</i>	Derivat von pTRV-RNA2a, der ein 347 Bp langes <i>Silencing</i> -Konstrukt zum <i>Silencing</i> von <i>NbARIA</i> kodiert	Diese Arbeit
TRV-RNA2a_ <i>gfp</i>	Derivat von pTRV-RNA2a zur Verbreitung der GFP-Sequenz mittels TRV-basiertem VIGS-System	(Gürlebeck, 2007)

*) Insetierte DNA-Fragmente sind flankiert von *BsaI*-Restriktionsschnittstellen und Überhängen zur „Golden Gate“-Klonierung. Kan^r, Kanamycin-Resistenz; Amp^r, Ampicillin-Resistenz; Spec^r, Spectinomycin-Resistenz.

2.3 Pflanzenexperimente

2.3.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien sind in Tabelle 5 aufgeführt. Pflanzen wurden in Gewächshauskammern (GWH) unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen angezogen. Zur Inokulation verwendete Pflanzen waren 4 - 8 Wochen alt. Nach der Inokulation wurden Paprikapflanzen in Phytokammern (Series 101, Percival Scientific, „Percival“) transferiert. Bis auf die in Abschnitt 3.1, 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Experimente wurden *N. benthamiana*-Pflanzen nach der Inokulation ebenfalls in eine Phytokammer überführt. Alle übrigen Pflanzen verblieben aus Kapazitätsgründen nach Inokulation im GWH. Die Umweltbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Bestrahlungsintensität) für GWH und Phytokammern sind vergleichend in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5. Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien.

Abk.	Botanischer Name	<i>Nicotiana</i> subgenus	Akzessionsname ⁺	Akzessionsnummer ⁺	Ursprung ⁺	Herkunft*
<i>Nphy 1</i>	<i>Nicandra physalodes</i> (L.) Gaertn.	-	-	NICA 1	Unbekannt	IPK
<i>Nphy 2</i>	<i>Nicandra physalodes</i> (L.) Gaertn.	-	bingfeng zi â	NICA 7	China	IPK
<i>Nacu</i>	<i>Nicotiana acuminata</i> (Graham) Hook.	<i>Petunioides</i>	-	NIC 471	USA	IPK
<i>Nafr</i>	<i>Nicotiana africana</i> Merxm.	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 464	Namibia	IPK
<i>Nala</i>	<i>Nicotiana alata</i> "Sweet White"	<i>Alatae</i>	-	32558	Unbekannt	B & T
<i>Nbena</i>	<i>Nicotiana benavidesii</i> Goodsp.	<i>Paniculatae</i>	-	NIC 442	Unbekannt	IPK
<i>Nbent</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 660	Unbekannt	IPK
<i>NbentL</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> (Laborintern)	<i>Suaveolentes</i>			Unbekannt	intern
<i>Nbon</i>	<i>Nicotiana bonariensis</i> Lehm.	<i>Alatae</i>	-	NIC 524	Unbekannt	IPK
<i>Ncle</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i> A.Gray	<i>Polydichiae</i>	-	NIC 420	Unbekannt	IPK
<i>Nexc</i>	<i>Nicotiana excelsior</i> (J.M.Black) J.M.Black	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 400	Australien	IPK
<i>Nglu</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Noctiflorae</i>	-	400282	Unbekannt	B & T
<i>Nglu</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	<i>Undulatae</i>	-	NIC 419	Unbekannt	IPK
<i>Ning</i>	<i>Nicotiana ingulba</i> J.M.Black	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 427	Unbekannt	IPK

Material und Methoden

<i>Nkaw</i>	<i>Nicotiana kawakamii</i> Y.Ohashi	<i>Tomentosae</i>	-	NIC 486	Unbekannt	IPK
<i>Nlan</i>	<i>Nicotiana langsdorffii</i> Weinm.	<i>Alatae</i>	-	NIC 528	Unbekannt	IPK
<i>Nnoc</i>	<i>Nicotiana noctiflora</i> Hook.	<i>Noctiflorae</i>	-	NIC 476	Unbekannt	IPK
<i>Nnud</i>	<i>Nicotiana nudicaulis</i> S.Watson	<i>Repandae</i>	-	NIC 433	Unbekannt	IPK
<i>Npal</i>	<i>Nicotiana palmeri</i> A.Gray	<i>Trigonophyllae</i>	-	NIC 439	Unbekannt	IPK
<i>Npan</i>	<i>Nicotiana paniculata</i> L.	<i>Paniculatae</i>	-	NIC 435	Peru	IPK
<i>Npau</i>	<i>Nicotiana pauciflora</i> J.Remy	<i>Petunioides</i>	-	NIC 454	Unbekannt	IPK
<i>Nplu</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> Viv.	<i>Alatae</i>	-	NIC 430	Peru	IPK
<i>Nqua</i>	<i>Nicotiana quadrivalvis</i> Pursh var. wallacei (A.Gray) Mansf.	<i>Polydichiae</i>	-	NIC 421	Unbekannt	IPK
<i>Nrep</i>	<i>Nicotiana repanda</i> Willd. ex Lehm.	<i>Repandae</i>	-	NIC 521	Unbekannt	IPK
<i>Nrot</i>	<i>Nicotiana rotundifolia</i> Lindl.	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 482	Unbekannt	IPK
<i>Nrus</i>	<i>Nicotiana rustica</i> "Midewiwan Sacred Tobacco"	<i>Rusticae</i>	-	406310	Unbekannt	B & T
<i>Nsan</i>	<i>Nicotiana sanderae</i> "Lime Green"		-	32557	Unbekannt	B & T
<i>Nsyl</i>	<i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes	<i>Sylvestres</i>	-	NIC 6	Unbekannt	IPK
<i>Ntab 1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>attenuata</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Joiven	NIC 264	Unbekannt	IPK
<i>Ntab 2</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>attenuata</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Dresden	NIC 311	Deutschland	IPK
<i>Ntab 3</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>attenuata</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Tamasesti 50	NIC 364	Romania	IPK
<i>Ntab 4</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Orinoco (TI 81)	NIC 1020	Indonesien	IPK
<i>Ntab 5</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	TI 419	NIC 1026	Mexico	IPK
<i>Ntab 6</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Boliviano (TI 437)	NIC 1027	USA	IPK
<i>Ntab 7</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	TI 579	NIC 1035	Ecuador	IPK
<i>Ntab 8</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	TI 1309	NIC 1042	Papua Neu Guinea	IPK
<i>Ntab 9</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Baiano (TI 128)	NIC 1051	Brasilien	IPK
<i>Ntab 10</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Orinoco (TI 125)	NIC 1052	Indonesien	IPK
<i>Ntab 11</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Palmira (TI 330)	NIC 1053	Kolumbien	IPK
<i>Ntab 12</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Dubeque (TI 1241)	NIC 1055	Spanien	IPK
<i>Ntab 13</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	TI 1275	NIC 1056	Korea	IPK
<i>Ntab 14</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	TI 1687	NIC 1058	Sambia	IPK
<i>Ntab 15</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>havanensis</i> Comes	<i>Nicotiana</i>	Pulawski Bialokwitnacy	NIC 239	Polen	IPK
<i>Ntab 16</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>macrophylla</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Sumatra Mitlingskaja	NIC 215	Sowjetunion	IPK
<i>Ntab 17</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>macrophylla</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	-	NIC 480	Georgien	IPK
<i>Ntab 18</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Elsässer Virgin	NIC 104	Unbekannt	IPK
<i>Ntab 19</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Herzegowina	NIC 205	Jugoslawien	IPK
<i>Ntab 20</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Mont Calme Brun	NIC 280	Unbekannt	IPK
<i>Ntab 21</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Micurinskij	NIC 366	Sowjetunion	IPK
<i>Ntab 22</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Plovdiv 34	NIC 416	Bulgarien	IPK
<i>Ntab 23</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	pelo de oro	NIC 514	Kuba	IPK
<i>Ntab 24</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>palescens</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	tabaco	NIC 527	Peru	IPK
<i>Ntab 25</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>sagittata</i> Danert	<i>Nicotiana</i>	Cabot	NIC 245	Unbekannt	IPK
<i>Ntab 26</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>sagittata</i> Danert	<i>Nicotiana</i>	Baragan 221	NIC 265	Rumänien	IPK
<i>Ntab 27</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>serotina</i> Schrank	<i>Nicotiana</i>	Kerti Kapolnai	NIC 318	Ungarn	IPK
<i>Ntab 28</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Badische Geuderthimer Landsorte	NIC 102	Deutschland	IPK
<i>Ntab 29</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Jaffna (TI 501)	NIC 1030	Guatemala	IPK
<i>Ntab 30</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Chileno Grande Amari (TI 1098)	NIC 1040	Argentinien	IPK
<i>Ntab 31</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	TI 1295	NIC 1041	Jugoslawien	IPK
<i>Ntab 32</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Ostrollst 2747 11 (TI 1568)	NIC 1047	Polen	IPK
<i>Ntab 33</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Correntino (TI 57)	NIC 1048	Argentinien	IPK
<i>Ntab 34</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Pina Blanca (TI 1456)	NIC 1057	Honduras	IPK
<i>Ntab 35</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Uckermärker x U Stamm	NIC 114	Deutschland	IPK
<i>Ntab 36</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Maryland	NIC 123	USA	IPK
<i>Ntab 37</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Virginia Gold Leaf	NIC 251	USA	IPK
<i>Ntab 38</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Virginia A	NIC 261	Ukraine	IPK

Material und Methoden

Ntab 39	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>tabacum</i>	<i>Nicotiana</i>	Jamaika	NIC 277	Unbekannt	IPK
Ntab 40	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh.	<i>Nicotiana</i>	Giron (TI 1113)	NIC 1038	Venezuela	IPK
Ntab 41	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	Friedrichstaler	NIC 113	Deutschland	IPK
Ntab 42	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	-	NIC 168	Ukraine	IPK
Ntab 43	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	Havanna 322	NIC 282	Unbekannt	IPK
Ntab 44	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	Greenwood	NIC 341	Unbekannt	IPK
Ntab 45	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	Virginia Bright Leaf	NIC 372	USA	IPK
Ntab 46	<i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>undulata</i> Erh	<i>Nicotiana</i>	-	NIC 511	Nord Korea	IPK
NtabL	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>Nicotiana</i>	-	-	Unbekannt	intern
Ntom	<i>Nicotiana tomentosiformis</i> Goodsp.	<i>Tomentosae</i>	-	NIC 479	Unbekannt	IPK
Nvel	<i>Nicotiana velutiana</i> H.-M.Wheeler	<i>Suaveolentes</i>	-	NIC 428	Australien	IPK
Pet	<i>Petunia</i> spec.	-	-	-	Unbekannt	intern
Pper 1	<i>Physalis peruviana</i> L.	-	-	PHY 35	Ruanda	IPK
Pper 2	<i>Physalis peruviana</i> L.	-	-	PHY 43	Südafrika	IPK
Same 1	<i>Solanum americanum</i> Mill.	-	-	SOLA 424	Amerika	IPK
Same 2	<i>Solanum americanum</i> Mill.	-	-	SOLA 435	El Salvador	IPK
Snig 1	<i>Solanum nigrum</i> L. subsp. <i>nigrum</i> var. <i>atropicifolium</i> (Desp.) G.Mey.	-	-	SOLA 50	Rumänien	IPK
Snig 2	<i>Solanum nigrum</i> L. subsp. <i>nigrum</i> var. <i>nigrum</i> f. <i>humile</i> (Bernh.) Lindm.	-	-	SOLA 40	Unbekannt	IPK
Snig 3	<i>Solanum nigrum</i> L. subsp. <i>nigrum</i> var. <i>nigrum</i> f. <i>nigrum</i>	-	-	SOLA 55	Unbekannt	IPK
Snig 4	<i>Solanum nigrum</i> L. subsp. <i>schultesii</i> (Opiz) Wessely	-	-	SOLA 294	Österreich	IPK
Ssua	<i>Solanum suaveolens</i>	-	-	PI 476478 01 SD	Peru	USDA
Stub	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-	-	Unbekannt	intern
Tomate						
AC	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. convar. <i>infiniens</i> Lehm. var. <i>flammatum</i> Lehm.		Ailsa Craig	LYC 1314	Niederlande	IPK
MM	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. convar. <i>infiniens</i> Lehm. var. <i>flammatum</i> Lehm.		MoneyMaker	-	-	intern
NR	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Mutante		Ailsa Craig NR (NEVER RIPE)	MLE 503	Unbekannt	IPK
PRO	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Mutante		Ailsa Craig PRO (PROCERA)	MLE 467	Deutschland	IPK
RR	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. convar. <i>infiniens</i> Lehm. var. <i>flammatum</i> Lehm.		Rheinlands Ruhm	LYC 144	Deutschland	IPK
SIT	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Mutante		sitiens	MLE 259	Unbekannt	IPK
Paprika						
Abkürzung	Wissenschaftlicher Name				Referenz	
ECW	<i>Capsicum annuum</i> Kultivarietät Early Californian Wonder				(Minsavage <i>et al.</i> , 1990)	
ECW-10R	<i>Capsicum annuum</i> Kultivarietät Early Californian Wonder 10R				(Minsavage <i>et al.</i> , 1990)	
ECW-30R	<i>Capsicum annuum</i> Kultivarietät Early Californian Wonder 30R				(Minsavage <i>et al.</i> , 1990)	

*) Bezugsquellen des Saatgutes: IPK; Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Corrensstraße 3, 06466 Stadt Seeland, Deutschland. B & T; B & T World Seeds, Route des Marchandes, Pagnignan, 34210 Aigues-Vives, Frankreich. USDA; United States Department of Agriculture, Plant Genetic Resources Conservation Unit, Georgia, USA.
+) Akzessionsname, -nummer und Ursprung wurde den Datenbanken der Bezugsquellen entnommen.

Tabelle 6. Umweltbedingungen bei Pflanzenexperimenten.

	GWH Paprika	Percival Paprika	GWH Alle außer Paprika	Percival <i>N. benthamiana</i>
Lichtperiode	05 - 21 Uhr	07 - 23 Uhr	05 - 21 Uhr	06 - 22 Uhr
Temperatur [°C]	~23	~26	~22	~20
Luftfeuchtigkeit [%]	60 - 80	~65	60 - 80	~75
Beleuchtungsstärke [klx]	8 - 24	9 - 16	8 - 24	3 - 6
Dunkelperiode	21 - 05 Uhr	23 - 07 Uhr	21 - 05 Uhr	22 - 06 Uhr
Temperatur [°C]	19 - 21	~22	19 - 21	~18
Luftfeuchtigkeit [%]	40 - 60	~65	40 - 60	~70

GWH, Gewächshaus; Percival, Phytokammer (Series 101, Percival Scientific).

2.3.2 Inokulationsexperimente und *in planta*-Wachstum von *Xcv*

Zur Inokulation wurden *Xcv*-Stämme in 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Die gewünschte Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) eingestellt. Dabei wurde für *Xcv* eine Konzentration von 5×10^8 Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) bei einer OD₆₀₀ von 0,4 angenommen. Anschließend wurden die Suspensionen mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseiten von Versuchspflanzen inokuliert. Das bakterielle *in planta*-Wachstum wurde nach Bonas *et al.* (1991) ermittelt. Dazu wurden Bakteriensuspensionen mit einer Konzentration von 4×10^4 KBE/ml (*C. annuum*) bzw. 4×10^5 KBE/ml (*S. lycopersicum*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. paniculata*, *N. clevelandii*, *N. rustica*) inokuliert und die KBE/cm² infiziertem Blattmaterial zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation ermittelt.

2.3.3 Inokulationsexperimente mit *A. tumefaciens*

A. tumefaciens-Stämme wuchsen auf YEB-Festmedium und wurden in *Agrobacterium*-Inokulationsmedium (5 mM MES pH 5,3, 10 mM MgCl₂, 150 µM Acetosyringon) resuspendiert. Die gewünschte Zelldichte wurde photometrisch (OD₆₀₀) eingestellt und die Suspension wurde mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseiten von Versuchspflanzen inokuliert. Wenn nicht anders angegeben, dann wurde der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 verwendet.

Zur *Agrobacterium*-vermittelten transienten Ko-Expression wurden Stämme vor der Inokulation in den angegebenen Verhältnissen (meist 1:1 oder 2:1) gemischt.

2.3.4 Sprühapplikation von Abscisinsäure

Zur Sprühapplikation von Abscisinsäure („2-cis,4-trans-Abscisic acid“, Sigma Aldrich) wurde zunächst eine 10 mM ABA-Stammlösung in 5% Ethanol hergestellt. Zur Sprühapplikation wurde eine ABA-Lösung (100 µM ABA in 0,02% Ethanol) bzw. eine Mock-Lösung (0,02% Ethanol) verwendet. Die Lösungen wurden mittels Finger-Zerstäuber auf die Ober- und Unterseite von Blättern besprüht, die später mit *Xcv* infiziert wurden.

2.3.5 Infiltration von flg22 in *N. benthamiana*

Gereinigtes flg22 mit einer Konzentration von 1 mM wurde von L. Eschen-Lippold und J. Lee (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) zur Verfügung gestellt. flg22 wurde in H₂O bis zu einer Konzentration von 100 nM verdünnt und mit einer nadellosen Spritze in die Unterseiten von *N. benthamiana*-Blättern infiltriert.

2.3.6 Kategorisierung von Pflanzenreaktionen

In den Abschnitten 3.2 und 3.4 werden Zelltodreaktionen kategorisiert in kompletter Zelltod (> 90% des inokulierten Bereiches tot), partieller Zelltod (10% - 90% des inokulierten Bereiches tot) und kein

Zelltod (< 10% des inokulierten Bereiches tot). Bei diesen Experimenten wurden die Reaktionen von mindestens 18 Inokulationssspots auf 6 verschiedenen Versuchspflanzen analysiert.

Bei den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Experimenten wurden die Pflanzenreaktionen nach T3E-Expression oder *Xcv*-Infektion an verschiedenen Tagen nach Inokulation (dpi) dokumentiert. Dabei wurde unterschieden in Zelltod (mindestens 10% des Inokulationssspots tot), Chlorose (mindestens 10% des Inokulationssspots mit gelber, hellgrüner oder brauner Verfärbung) und keine Reaktion (keine sichtbare Änderung des Inokulationssspots). Um individuelle Unterschiede einzelner Pflanzen zu kompensieren wurden je Probe entweder 10 Inokulationssspots von 5 verschiedenen Pflanzen oder 6 Spots von 3 verschiedenen Pflanzen analysiert. Die beobachteten Phänotypen wurden in 8 verschiedene Gruppen unterteilt: schneller Zelltod (Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 3 dpi), langsamer Zelltod (Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi), Chlorose oder Zelltod (Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi), Chlorose (Chlorose bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi), keine sichtbare Reaktion (keine Reaktion bei $\geq 7/10$ bzw. $4/6$ Spots 8 dpi), inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei $4-6/10$ bzw. $3/6$ Spots 8 dpi) und wässrige Läsion (wässrige Läsion bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi).

2.4 Deletionsmutagenese von *Xcv*

In dieser Arbeit wurde der proteinkodierende Bereich von *xopQ* und *xopN* in *Xcv* 85-10 deletiert. Dazu wurden 1000 Bp 5' und 1000 Bp 3' von *xopQ* sowie 751 Bp 5' und 702 Bp 3' von *xopN* mittels PCR amplifiziert und durch „Golden Gate“-Klonierung in den Suizidvektor pOGG2 (Schulze *et al.*, 2012) kloniert. Die resultierten Plasmide pOGG2:*xopQ*_{del} und pOGG2:*xopN*_{del} wurden mittels triparentaler Konjugation in *Xcv* 85-10 eingeführt. T3E-Deletionen als Ergebnis von Doppelrekombinationsereignissen wurden mittels PCR überprüft.

2.5 Sichtung einer cDNA-Bibliothek mittels Hefe-Di-Hybrid-System

Zur Erstellung der Köderplasmide wurden *xopL* und *xopLm* mittels GATEWAY®-Klonierung aus den entsprechenden pENTR/D-TOPO-Plasmiden (Singer *et al.*, 2013) in den Ködervektor pGBT9 (Clontech) kloniert. Anschließend wurden die Köderplasmide pGBT9:*xopL* und pGBT9:*xopLm* zusammen mit dem Beutevektor pGADT7 in die beiden *S. cerevisiae* Stämme MAV103 und PJ69-4a transformiert und die Synthese der Köderproteine mittels Immunoblot überprüft. Die Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen erfolgte mittels „LiAc/SS carrier DNA/PEG“-Methode (Gietz und Schiestl, 2007).

Die beiden verwendeten Hefestämme kodieren die Reportergene *URA3*, *HIS3* und *lacZ* (MAV103) bzw. *URA3*, *ADE2* und *lacZ* (PJ69-4a), die exprimiert werden, wenn ein aktiver Gal4-Transkriptionsfaktor, bestehend aus Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und Gal4-Aktivitätsdomäne (AD), gebildet wird. Um auszuschließen, dass die verwendeten Köderproteine allein zur Transkriptionsaktivierung der Reportergene führen, wurde deren Autoaktivierung getestet. Dazu

wurden Hefestämme, die den Vektor der cDNA-Bibliothek (pGADT7) und die Köderplasmide pGBT9:*xopL* bzw. pGBT9:*xopLm* trugen, auf Minimalmedium ohne Tyrosin und Leucin (-TL; Auxotrophie-Marker der Plasmide) getropft. Außerdem wurden die Stämme auf -TL-Medium getropft, dem zusätzlich 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-alpha-D-Galactopyranosid beigefügt war (X-Gal, Blaufärbung nach *lacZ*-Expression) bzw. zusätzlich Uracil (-U; Wachstum nach *URA3*-Expression möglich), Histidin (-H; Wachstum nach *HIS3*-Expression möglich) oder Adenin (-A; Wachstum nach *ADE2*-Expression möglich) fehlte. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden Konstrukte verwendet, die den Gal4-Transkriptionsfaktor (BD+AD) bzw. nur die Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) kodieren. Um eine geringe Autoaktivität des *HIS3*-Reporters zu unterdrücken, wurde dem Medium zusätzlich 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT, bis zu 50 mM Endkonzentration) zugegeben.

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA-Bibliothek wurde aus Paprikapflanzen-RNA erstellt. Dazu wurde eine Mischung aus Blattmaterial von ECW-10R (unbehandelt, *Xcv* 85-10- und 85-10(pDS400)-infiziert) sowie ECW-30R (unbehandelt und 85-10(pDSF300)-infiziert) verwendet (Szczesny *et al.*, 2010a).

Zur Sichtung der cDNA-Bibliothek wurden die jeweiligen Köderplasmide gemeinsam mit Plasmiden der cDNA-Bibliothek in den Hefestamm MAV103 bzw. PJ69-4a ko-transformiert und anschließend auf die Selektivmedien -TLU und -TLH (MAV103) bzw. -TLU und -TLA (PJ69-4a) plattiert. Zusätzlich wurde ein kleiner Teil des Transformationsansatzes in verschiedenen Verdünnungsstufen auf -TL-Medium plattiert und die Transformationseffizienz ermittelt.

Von Hefezellen, die auf Selektivmedien wuchsen, wurden die Beuteplasmide mittels „EZ Yeast™ Plasmid Prep“ (G-Biosciences) laut Herstellerangaben isoliert. Die Beuteplasmide wurden anschließend in *E. coli* Top10 elektroporiert, von diesen vervielfältigt und schließlich erneut isoliert. Zur Untersuchung, ob die Beuteplasmide eine spezifische Interaktion mit den Köderproteinen (*XopL* oder *XopLm*) vermitteln, wurden sie mit pGBT9:*BD*, pGBT9:*xopL* oder pGBT9:*xopLm* in Hefezellen ko-transformiert und die Reporter-gen-Aktivierung durch Wachstum auf Selektivmedien bzw. Blaufärbung auf X-Gal-haltigem Festmedium analysiert.

2.6 Klonierungen und *xopQ*-Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente klassisch, mittels GATEWAY®- sowie „Golden Gate“-Klonierung fusioniert. Für GATEWAY®-Klonierungen wurde das „pENTR/D-TOPO Directional TOPO Cloning Kit“ (Invitrogen) verwendet, um PCR-Produkte in den Vektor pENTR/D-TOPO zu klonieren. Anschließend wurden DNA-Fragmente mittels „GATEWAY® LR Clonase Enzyme Mix“ (Invitrogen) in Zielvektoren kloniert. Die GATEWAY®-Klonierung basiert auf der Eigenschaft des λ -Phagen zur spezifischen Rekombination und DNA-Fragmente werden zwischen attL-Sequenzen des Ausgangsvektors und attR-Sequenzen des Zielvektors rekombiniert.

Bei der „Golden Gate“-Klonierung werden DNA-Fragmente mittels Typ IIS-Restriktionsenzymen geschnitten, die DNA außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und spezifische

Nukleotidüberhänge erzeugen (Engler *et al.*, 2008). Dies erlaubt eine Restriktion und Ligation in einem Reaktionsansatz („cut ligation“). Zur „Golden Gate“-Klonierung wurde in dieser Arbeit das Enzym *BsaI* verwendet. Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden Oligonukleotide so gewählt, dass das PCR-Produkt von *BsaI*-Schnittstellen flankiert wird und nach *BsaI*-Restriktion ein vier Nukleotide langer 5'-Überhang entsteht, der kompatibel zu Überhängen des Zielvektors ist.

Einige Konstrukte, z. B. pUC57-Derivate, wurden durch klassische Klonierung erstellt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden Enzyme und Puffer nach Herstellerangaben (NEB, Fermentas) verwendet.

Zur Erstellung von Plasmiden, die XopQ-Derivate mit internen Substitutionen oder Deletionen kodieren, wurde ortsspezifische („site directed“) Mutagenese verwendet (Carter, 1986). Dazu wurden lineare Fragmente von pUC57:*xopQ* oder pUC57-Derivaten mittels PCR amplifiziert und durch Ligation zirkularisiert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass amplifizierte Fragmente nach Zirkularisierung interne Substitutionen oder Deletionen trugen. Je ein Oligonukleotid trug eine 5'-Phosphorylierung zur späteren Ligation des PCR-Produktes und die als Template verwendeten Ausgangsplasmide wurden mittels *DpnI*, das methylierte DNA schneidet, verdaut.

2.7 Virus-induziertes Gen-Silencing

In dieser Arbeit wurden Virus-induzierte Gen-Silencing (VIGS)-Experimente mittels „tobacco rattle virus“ (TRV) in *N. benthamiana* durchgeführt. Bei dieser Methode ist das Virusgenom, bestehend aus TRV-RNA1 und TRV-RNA2, auf zwei Binärvektoren (pTRV1, pTRV2) zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation verteilt (Liu *et al.*, 2002). pTRV1 kodiert vier virale Proteine, nämlich eine RNA-abhängigen RNA-Polymerase, ein „movement“ Protein, ein Cystein-reiches Protein sowie ein selbstschneidendes Ribozym. pTRV2 kodiert das virale Hüllprotein und trägt eine attR-Kassette zur Integration von *Silencing*-Fragmenten mittels GATEWAY[®]-Klonierung.

Ein 347 Nukleotide langes *Silencing*-Konstrukt zum *Silencing* von *NbARIA* wurde mittels PCR amplifiziert, in pENTR/D-TOPO und anschließend in pTRV2a (Derivat von pTRV2 (Szczesny *et al.*, 2010a)) kloniert und in *A. tumefaciens* GV3101 elektroporiert. *A. tumefaciens*-Stämme, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a_*NbARIA* trugen, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 zu gleichen Teilen gemischt und in Keimblätter von *N. benthamiana* (3 - 4 Wochen nach Aussaat) inokuliert. Die Integration der T-DNAs beider Plasmide in das Pflanzengenom ermöglicht die Replikation der Viruskomponenten und die Assemblierung von Viruspartikeln, die sich systemisch in der Pflanze ausbreiten und das Virusgenom (incl. *Silencing*-Fragment) in das Genom anderer Pflanzenzellen inserieren. Bei der Transkription des *Silencing*-Fragmentes wird mRNA synthetisiert, die komplementär zu der mRNA von Genen ist, die durch VIGS beeinflusst werden sollen. Die Bildung von doppelsträngiger mRNA löst das post-transkriptionelle Gen-Silencing aus. Als Vergleichspflanzen wurden Pflanzen mit *A. tumefaciens*-Stämmen behandelt, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a_*gfp* tragen, sodass die GFP-kodierende Sequenz durch TRV verbreitet wurde.

2.8 Quantitative „real time“ PCR

Etwa drei Wochen nach Inokulation von *A. tumefaciens*-Stämmen zum VIGS in *N. benthamiana* wurden die Transkriptmengen der *Silencing*- und Kontrollpflanzen mittels quantitativer „real time“ PCR (qRT-PCR) ermittelt. Dazu wurde zunächst RNA aus Blattmaterial (ca. 60 mg) von Versuchspflanzen mittels „Qiagen RNeasy[®] Plant Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert und ein DNase I-Verdau durchgeführt. Zur cDNA-Synthese wurde das „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kits for RT-qPCR“ (Thermo Fischer Scientific) ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben.

Ein qRT-PCR-Reaktionsansatz von 20 µl bestand zu 50% aus „Absolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix“ (ABgene), 4 ng cDNA und beinhaltete je 1,4 pmol der verwendeten Oligonukleotide. Zur Normalisierung wurden die Mittelwerte der Transkriptmengen von dem Elongationsfaktor 1- α und einem F-Box Protein ermittelt. Diese wurden zuvor als geeignete Referenzgene für VIGS-Studien in *N. benthamiana* beschrieben (Liu *et al.*, 2012). Zur Ermittlung der *NbARIA*-Transkriptmenge wurden ein Oligonukleotidpaar verwendet, das Transkripte aller vier *NbARIA*-Homologe gleichzeitig amplifiziert, wohingegen das *Silencing*-Konstrukt nicht amplifiziert wird. Die ermittelte *NbARIA*-Transkriptmenge der GFP-Kontrollpflanzen wurde als 1 definiert und die *NbARIA*-Transkriptmenge der *Silencing*-Pflanzen relativ dazu berechnet. Die Spezifität der PCR-Amplifikationen wurde durch Schmelzkurven überprüft und die PCR-Effizienz durch Standardkurven überprüft, bei der cDNA in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt wurde. Die ermittelten Effizienzen bei der Verwendung der verschiedenen Oligonukleotidpaare waren 1,927 (F-Box Protein), 1,871 (Elongationsfaktor 1- α) und 1,751 (ARIA).

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM780 und die Software Zen (Carl Zeiss) verwendet. Blattmaterial von *N. benthamiana* wurde 2 - 3 Tage nach *A. tumefaciens*-vermittelter transientser Synthese von Proteinen analysiert. Die Visualisierung von Zellkernen erfolgte nach Infiltration von 0,01%-iger 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung 1 - 2 h vor der Mikroskopie. Für Interaktionsstudien mittels BiFC wurde das gelb fluoreszierende Protein YFP verwendet, welches in einen N-terminalen (YFP_N, As 1-154) und C-terminalen (YFP_C, As 155-239) Teil geteilt wurde. YFP_N und YFP_C waren fusioniert an Proteine, deren Interaktion untersucht wurde. Für Lokalisierungs- und Ko-Lokalisierungsstudien wurde ein GFP- oder mOrange2-Epitop verwendet.

2.10 Detektion von Proteinen

Proteinextrakte wurden mit verschiedenen Methoden isoliert. Zur Isolation von Gesamtproteinextrakt aus *Xcv* wurden 1/10 OD₆₀₀-Einheit in 40 µl 2×Lämmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycerin, 10% β -Mercaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 0,05% Bromphenolblau) resuspendiert und anschließend ca.

10 min gekocht. Die Proteinexpression aus Blattgewebe von Pflanzen erfolgte mittels Pflanzenextraktionspuffer (Tsugama *et al.*, 2011). Dazu wurde Blattgewebe (3-5 Blattscheiben, Durchmesser 0,6 cm) in 130 µl Pflanzenextraktionspuffer für etwa 15 min gekocht. Zur Proteinextraktion aus Hefezellen wurden 2,5 OD₆₀₀-Einheiten Zellmaterial in 0,1M NaOH für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend pelletiert, in 50 µl 2×Lämmli resuspendiert und für 10 min bei 70°C inkubiert.

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Anschließend wurden Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Proteindetektion erfolgte mittels Ponceau-Färbelösung (0,1% Ponceau in 5% Essigsäure), immunologisch mittels Antikörper oder mittels Strep-Tactin.

Zum immunologischen Nachweis wurden die in Tabelle 7 verwendeten primären und sekundären Antikörper gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Detektion erfolgte mittels „enhanced chemiluminescence“-Lösung (ECL: 100 mM Tris-HCl, 225 nM p-Cumarinsäure, 1,25 mM Luminol, 0,3 % (v/v) H₂O₂, pH 8,5). Zur Detektion des Strep-Epitops wurde außerdem „Strep-Tactin® AP Conjugate“ (IBA lifescience) verwendet, das durch eine alkalische Phosphatase-Reaktion sichtbar gemacht wurde. Dazu wurde eine BCIP („5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat“, 5% (w/v) in H₂O)- und NBT („Nitro Blue Tetrazolium“, 5% (w/v) in DMF)-Lösung verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde für ca. 20 min mit der Färbelösung (80 µl BCIP-Lösung und 60 µl NBT-Lösung in 10 µl Wasser) inkubiert.

Tabelle 7. Verwendete Antikörper.

Antikörper	Genauere Bezeichnung, ggf. sekundärer Antikörper und Hersteller
α-GFP	„Anti-GFP from mouse IgG ₁ κ“, α-mouse, Sigma Aldrich
α-c-Myc	„c-Myc Antibody“, α-mouse, Santa Cruz Biotechnology
α-HA	„Anti-HA High Affinity from rat IgG ₁ “, α-rat, Sigma Aldrich
α-Strep	„Strep•Tag® II Antibody HRP Conjugate“ Merk Millipore
α-FLAG	„Monoclonal ANTI-FLAG®“, α-mouse, Sigma Aldrich
α-P-p44/42 MAPK	„Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody“, α-rabbit, Cell signaling technology
α-Gal4-Bindedomäne	„Anti-Gal4 (DNA binding domain) Antibody“, α-rabbit, Merk Millipore
α-mouse	„Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep)“, GE Healthcare
α-rabbit	„Goat Anti-Rabbit IgG - Horseradish Peroxidase“, GE Healthcare
α-rat	„Anti-Rat IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat“, Sigma Aldrich

2.11 Bioinformatische Methoden und statistische Tests

In dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und bioinformatische Programme verwendet. Die Identifizierung von eukaryotischen Proteindomänen und -motiven wurde mittels „ELM“ (Dinkel *et al.*, 2013) und „NLS MAPPER“ (Kosugi *et al.*, 2009) durchgeführt. Die Datenbanken von „www.solgenomics.net“ und „www.ncbi.nlm.nih.gov“ dienten zur Entnahme von Sequenzinformationen und für Sequenzvergleiche mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Ein Sequenzvergleich und die Konsensussequenz von 24 Vertretern der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie wurde mittels ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) ermittelt und deren Stammbaum wurde mit Jalview 2.8

(Waterhouse *et al.*, 2009) unter Verwendung der „average distant tree; percentage identity distance“-Methode, generiert. Die Auswertung von qRT-PCR-Daten und die Bearbeitung von Bildern der konfokalen Mikroskopie wurde mit Software der Gerätehersteller durchgeführt: „CFX Manager 3.1“ (Bio-Rad) und „ZEN“ (Carl Zeiss).

Die Signifikanz von Unterschieden im bakteriellen *in planta*-Wachstum wurde mittels studentischen t-Tests untersucht. Dabei wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Triplikaten zur Berechnung verwendet. Der „Wilcoxon signed rank test“ wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen Pflanzenreaktionen zu ermitteln, wenn die Stichprobenanzahl der zu vergleichenden Proben identisch war. Waren die Stichprobenanzahlen von zu vergleichenden Proben nicht identisch, dann wurde der „Wilcoxon signed rank sum test“ verwendet. Die studentischen t-Tests wurden mittels Excel durchgeführt. Die Wilcoxon-Tests wurden mittels „RStudio“ (www.rstudio.com) unter Verwendung der „stats“-Erweiterung durchgeführt. Datensätze wurden in eine Matrix umgewandelt und mit der Funktion `wilcox.test(x, y, paired = F/T)` mit `x = Datensatz 1`, `y = Datensatz 2`, `paired = F = false` („rank sum test“) oder `T = True` („rank test“) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der von T3E verursachten Reaktionen in verschiedenen Nicht-Wirtspflanzen der *Solanaceae*

Da für zahlreiche Effektoren von *Xcv* zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, ob ihre Expression in Nicht-Wirtspflanzen eine Reaktion auslöst, wurde dies systematisch untersucht. Dazu wurden 21 verschiedene T3E aus drei verschiedenen *Xcv*-Stämmen (Tabelle 1) mittels *Agrobacterium* transient in Blättern von 86 verschiedenen Nicht-Wirtspflanzen der *Solanaceae* (Tabelle 5) exprimiert und die pflanzlichen Reaktionen 1, 2, 3, 6 und 8 Tage nach Inokulation („days post inoculation“, dpi) dokumentiert. Die transiente Expression von *gfp::c-Myc* diente als Kontrolle, um mögliche T3E-unabhängige Pflanzenreaktionen nach *A. tumefaciens*-Inokulation als Vergleich zu haben.

Bei diesem Versuch wurden auch Effektoren verwendet, von denen bereits bekannt war, dass pflanzliche Reaktionen nach transienter Expression in *Solanaceae*-Vertretern ausgelöst werden. Beispielsweise war bekannt, dass XopL (Singer *et al.*, 2013), XopB (Salomon *et al.*, 2011) und XopM (Schulze *et al.*, 2012) in *N. benthamiana* und XopG (Schulze *et al.*, 2012) in *N. tabacum* eine Zelltodreaktion induzieren. Dies diente einerseits als Kontrolle und andererseits sollte es Rückschlüsse auf die phylogenetische Verbreitung möglicher pflanzlicher *R*-Gene erlauben. Um zu analysieren, ob Resistenzmechanismen gegen einzelne T3E bereits auf der phylogenetischen Ebene der Gattungen konserviert sind, wurden Pflanzenlinien von fünf verschiedenen Gattungen getestet. Die Gattung *Nicotiana* wurde gewählt, um einen genaueren Einblick in untergeordnete phylogenetische Einheiten zu erhalten. Diese Gattung unterteilt sich in 13 Sektionen (z. B. *Nicotiana* und *Suaveolentes*), und mindestens ein Vertreter jeder Sektion wurde untersucht. Die Sektionen unterteilen sich weiter in verschiedene Arten, welche wiederum in Varietäten und schließlich Akzessionen (bzw. Linien) unterteilt werden. Die Abbildung 4 zeigt einen Überblick der phylogenetischen Einordnung der verwendeten Pflanzenlinien (Informationen zu den Pflanzenlinien und Abkürzungen in Tabelle 5).

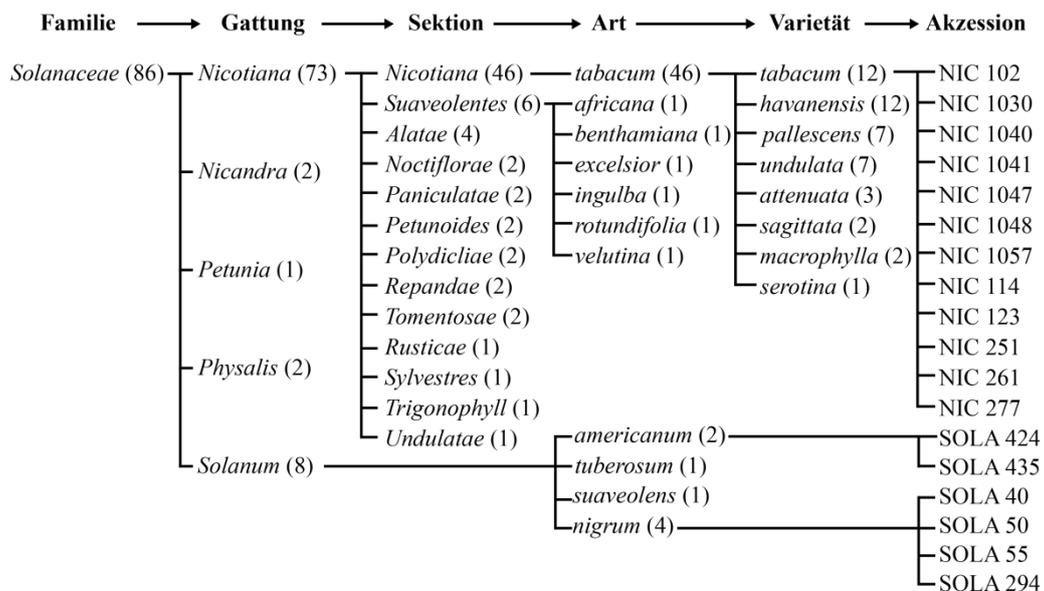


Abbildung 4. Phylogenetische Einordnung der verwendeten Pflanzenlinien.

Die Einordnung verwendeter Pflanzenlinien in die taxonomischen Einheiten Familie, Gattung, Sektion, Art, Varietät und Akzession ist dargestellt. Die Aufschlüsselung bis zur Akzession ist nur für 16 der 86 Linien gezeigt. Angaben in Klammern beschreiben die Anzahl der Pflanzenlinien in der jeweiligen taxonomischen Einheit. Die Unterteilung der Gattung *Nicotiana* beruht auf Clarkson *et al.* (2004 und 2010).

3.1.1 Die von Effektoren verursachten Reaktionen sind divers

Zur Analyse der 86 verschiedenen Pflanzenlinien wurden 22 verschiedene *Agrobacterium*-Stämme verwendet, die die konstitutive Expression jeweils eines T3E-Gens bzw. *gfp::c-Myc* mittels T-DNA-Transfer *in planta* ermöglichen. Pro Pflanzenlinie wurden fünf Pflanzen genutzt und jeder verwendete *Agrobacterium*-Stamm wurde in zwei verschiedene Blätter pro Pflanze inokuliert, sodass je zehn Inokulationsspot analysiert wurden. Bis auf AvrBs2 waren alle Effektoren mit einem Epitop markiert, sodass die Proteinsynthese *in planta* aus infiziertem Material einer sechsten Pflanze mittels immunologischem Nachweis möglich war. Bei der Inokulation der 86 Linien waren insgesamt 5 weitere Kollegen der AG Bonas beteiligt: D. Blüher, H. Prochaska, S. Schulze, O. Müller und P. John. Die Analyse der Pflanzenreaktionen offenbarte deutlich unterschiedliche Phänotypen, die in folgende Gruppen eingeteilt wurden:

- Schneller Zelltod: HR-ähnliche Reaktion, Zelltod nach bis zu drei Tagen (meist kompletter Inokulationsspot)
- Langsamer Zelltod: Zelltod erst nach dem dritten Tag sichtbar, häufig aus einer Chlorose hervorgehend und gelegentlich nur partiell
- Chlorose: gelbe oder bräunliche Verfärbung des Inokulationsspot
- Zelltod oder Chlorose: entweder Chlorose oder (partieller) Zelltod nach T3E-Expression
- Keine Reaktion: keine phänotypische Veränderung des Inokulationsspot

Abbildung 5 zeigt ausgewählte Beispiele der Phänotypen.

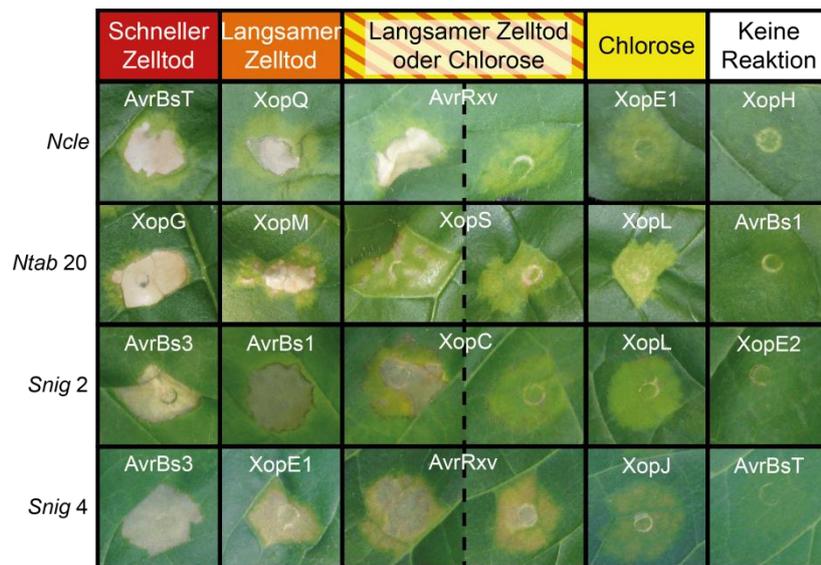


Abbildung 5. Beispiele pflanzlicher Reaktionen nach transienter Expression von T3E aus *Xcv*.

Die angegebenen T3E wurden mittels *Agrobacterium*-vermittelter Expression in den Pflanzenlinien *Ncle*, *Ntab 20*, *Snig 2* und *Snig 4* (Abkürzungen siehe Tabelle 5) synthetisiert und Pflanzenreaktionen dokumentiert. Die Phänotypen wurden folgendermaßen klassifiziert: schneller Zelltod 3 Tage nach Inokulation (dpi), langsamer Zelltod 8 dpi, Chlorose oder Zelltod 8 dpi, Chlorose 8 dpi und keine sichtbare Reaktion. Die dargestellten Phänotypen (Blattoberseiten) wurden 8 dpi fotografiert.

3.1.2 Die Pflanzenreaktionen nach transienter Expression von T3E in 86 verschiedenen *Solanaceae*

Die Infiltration des *Agrobacterium*-Stammes, der die transiente Expression von *gfp::c-Myc* vermittelt, löste in keiner untersuchten Pflanzenlinie eine sichtbare Reaktion aus, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die im Folgenden beschriebenen Reaktionen T3E-abhängig sind. Die Abbildung 6 zeigt einen Überblick über die Häufigkeit der Reaktionen, die von einzelnen T3E ausgelöst wurden. Da die Art *N. tabacum* mit 46 verschiedenen Akzessionen in diesem Experiment stark überrepräsentiert war, wurden nur die Reaktionen einer zufällig gewählten *N. tabacum*-Akzession (*Ntab 1*) einbezogen.

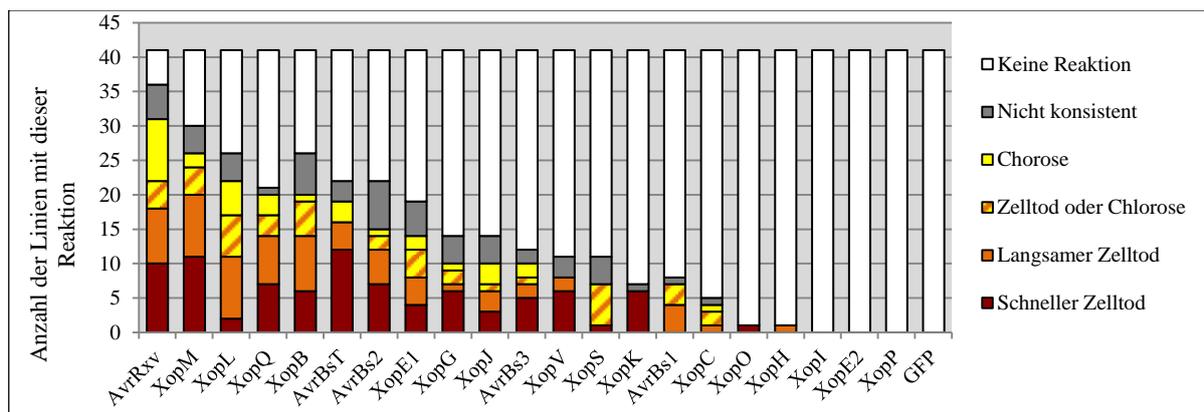


Abbildung 6. Häufigkeit von Pflanzenreaktionen nach transienter Expression von 21 *Xcv*-T3E in 41 Nicht-Wirtspflanzen.

Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter *in planta*-Synthese von T3E oder GFP in 41 verschiedenen Pflanzenlinien. Stellvertretend für die 46 Linien der Art *N. tabacum* wurde ausschließlich *Ntab 1* (s. Tabelle 5) zur Berechnung verwendet. 10 Inokulationssspots pro Linie wurden analysiert und Pflanzenreaktionen gruppiert. rot, schneller Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 3 dpi; orange, langsamer Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb-orange-gestreift, Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb, Chlorose bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; weiß, keine sichtbare Reaktion bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; grau, inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei 4-6/10 Spots) 8 dpi.

Mittels Immunoblot wurde von H. Prochaska (AG Bonas) die *in planta*-Synthese der Epi-top-markierten T3E in allen Pflanzenlinien untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengefasst. Dieser Nachweis war in den einzelnen Linien unterschiedlich erfolgreich und variierte von der Detektion aller Effektoren (*Snig 3*) bis zum Nachweis keines T3E (*Npal*). Ein ähnlich diverses Bild zeigte sich bei der Auswertung der Synthesedaten hinsichtlich der einzelnen Effektoren, welches von der Detektion in 4/86 Linien (*XopK*) bis zum Nachweis in 82/86 Linien (*XopE2*) variierte.

Die Tabelle 8 zeigt einen Überblick der Reaktionen von Pflanzen verschiedener Gattungen und aller Sektionen der Gattung *Nicotiana*; die Tabelle 9 stellt die Reaktionen der 46 Vertreter der Art *N. tabacum* dar. Während die T3E *XopE2*, *XopI* und *XopP* in keiner untersuchten Linie eine Reaktion auslösten, führte die Synthese von *AvrRxv*, *AvrBsT*, *XopB*, *XopL*, *XopM* und *XopQ* in ca. der Hälfte oder mehr Linien zu einer Reaktion. Unter anderem wurde auch eine Zelltod-induzierende Aktivität von *XopC*, *XopK*, *XopO* und *XopV* in verschiedenen Pflanzenlinien identifiziert. Von diesen Effektoren war zuvor nicht bekannt, dass sie sichtbare pflanzliche Reaktionen auslösen. Weiterhin wurden Pflanzenlinien identifiziert, in denen Reaktionen durch die Effektoren *AvrBs1*, *AvrBs3*, *AvrRxv*, *XopH* und *XopS* ausgelöst werden. Von diesen Effektoren war bisher nur bekannt, dass sie in verschiedenen Paprikaliniern erkannt werden bzw. Zelltodreaktionen auslösen.

Interessanterweise korreliert zumindest in einigen Fällen die Phylogenie mit den Reaktionen nach T3E-Expression. Es fällt beispielsweise auf, dass *XopV* in fast allen Vertretern der Gattungen *Solanum* und *Nicandra* zu einer Reaktion führt, aber nie in Vertretern der Gattungen *Petunia*, *Physalis* und *Nicotiana*. Diese Korrelation beruht nicht auf Effizienzunterschieden der T3E-Synthese, da *XopV*-spezifische Signale für 82 der 86 getesteten Pflanzenlinien (95%) detektiert wurden (Tabelle 8 und Tabelle 9). Ähnlich wie *XopV* führten auch *AvrBs3* und *XopK* nahezu ausschließlich in Vertretern der Gattungen *Solanum* und *Nicandra* zu Reaktionen. Im Gegensatz dazu löste die Synthese von *XopQ* in fast allen Vertretern der Gattung *Nicotiana* eine Reaktion aus, allerdings nie in Linien der anderen vier Gattungen (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Bei dem Vergleich der Reaktionen der 46 verschiedenen Vertreter der Art *N. tabacum* wird deutlich, dass die Variabilität deutlich geringer ist, als beim Vergleich der verschiedenen *Nicotiana*-Sektionen untereinander. Beispielsweise lösen *XopE1* und *XopG* in nahezu allen *N. tabacum*-Akzessionen eine Reaktion aus, wohingegen dies nur bei einem Drittel (*XopE1*) bzw. einem Viertel (*XopG*) der anderen 27 Linien der Gattung *Nicotiana* der Fall ist (Tabelle 8 und Tabelle 9). Von den 46 verschiedenen *N. tabacum*-Linien löste *XopB* in 21, *XopM* in 44 und *XopS* in 34 Chlorosen oder Zelltodreaktionen aus. Dies war insofern überraschend, da diese Effektoren in Schulze *et al.* (2012) keine Reaktionen in *N. tabacum* auslösten. Ursache für die Diskrepanz könnte eine fehlende T3E-Synthese in *N. tabacum* sein, da dies von Schulze *et al.* (2012) nicht analysiert wurde.

Tabelle 8. Reaktionen nach transientser T3E-Expression in 41 Vertretern der Familie *Solanaceae*.

Linie	Analysiertes Protein																			Sektion			
	AvrBs1	AvrBs2	AvrBs3	AvrBsT	AvrRxv	XopB	XopC	XopE1	XopE2	XopG	XopH	XopI	XopJ	XopK	XopL	XopM	XopO	XopP	XopQ		XopS	XopV	GFP
Gattung: Solanum																							
<i>Same 1</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Same 2</i>	+	n	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Snig 1</i>	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Snig 2</i>	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Snig 3</i>	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Snig 4</i>	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Ssua</i>	+	n	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Stub</i>	+	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gattung: Nicandra																							
<i>Nphy 1</i>	+	n	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nphy 2</i>	+	n	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Gattung: Petunia																							
<i>Pet</i>	+	n	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Gattung: Physalis																							
<i>Pper 1</i>	+	n	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pper 2</i>	+	n	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Gattung: Nicotiana																							
<i>Nafr</i>	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nbent</i>	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nexc</i>	+	n	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Ning</i>	+	n	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Nrot</i>	+	n	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nvel</i>	+	n	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nala</i>	+	n	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nbon</i>	-	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Nlan</i>	+	n	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nplu</i>	+	n	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Ngla</i>	+	n	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nnoc</i>	+	n	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Npan</i>	+	n	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nbena</i>	+	n	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nacu</i>	-	n	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Npau</i>	-	n	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Ncle</i>	+	n	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nqua</i>	+	n	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nnud</i>	+	n	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Nrep</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nkaw</i>	+	n	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Ntom</i>	+	n	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nrus</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nsyl</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Npal</i>	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nglu</i>	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Nsan</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Ntab 1</i>	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+

Die Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter transientser Synthese von *Xcv*-T3E oder GFP:c-Myc in 41 verschiedenen Pflanzenlinien wurden in folgende Gruppen unterteilt: rot, schneller Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 3 dpi; orange, langsamer Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb-orange-gestreift, Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb, Chlorose bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; weiß, keine sichtbare Reaktion bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; grau, inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei 4-6 Spots) 8 dpi. Der immunologische Nachweis der *in planta*-Proteinsynthese wurde von H. Prochaska durchgeführt: +, detektiert; -, nicht detektiert; n, nicht analysiert. *Noc*, *Noctiflorae*; *Pan*, *Paniculatae*; *Pet*, *Petunioides*; *Pol*, *Polydichiae*; *Rep*, *Repandae*; *Tom*, *Tomentosae*; *Rus*, *Rusticae*; *Syl*, *Sylvestres*; *Tri*, *Trigonophyllae*; *Und*, *Undulatae*; *Nic*, *Nicotiana*; k.A., keine Angabe. Abkürzungen der Linien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 9. Reaktionen nach transientser T3E-Expression in 46 Vertretern der Art *Nicotiana tabacum*.

Linie	Analysiertes Protein																				Varietät			
	AvrBs1	AvrBs2	AvrBs3	AvrBsT	AvrRxv	XopB	XopC	XopE1	XopE2	XopG	XopH	XopI	XopJ	XopK	XopL	XopM	XopO	XopP	XopQ	XopS		XopV	GFP	
<i>Art: Nicotiana tabacum</i>																								
Ntab 1	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	att	
Ntab 2	+	n	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+		
Ntab 3	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 4	-	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	havanensis	
Ntab 5	+	n	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		
Ntab 6	+	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		
Ntab 7	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		
Ntab 8	-	n	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		
Ntab 9	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
Ntab 10	-	n	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
Ntab 11	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
Ntab 12	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		
Ntab 13	+	n	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+		
Ntab 14	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+		
Ntab 15	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
Ntab 16	+	n	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+		mac
Ntab 17	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+		
Ntab 18	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+		pallescens
Ntab 19	+	n	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+		
Ntab 20	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+		
Ntab 21	-	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+		
Ntab 22	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 23	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 24	+	n	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 25	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	sag	
Ntab 26	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+		
Ntab 27	+	n	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ser	
Ntab 28	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 29	+	n	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	tabacum	
Ntab 30	+	n	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 31	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 32	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 33	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+		
Ntab 34	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+		
Ntab 35	+	n	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+		
Ntab 36	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		
Ntab 37	+	n	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		
Ntab 38	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		
Ntab 39	+	n	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 40	+	n	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	undulata	
Ntab 41	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
Ntab 42	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+		
Ntab 43	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+		
Ntab 44	+	n	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		
Ntab 45	+	n	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ntab 46	+	n	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		

Die Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter transientser Synthese von Xcv-T3E oder GFP in 46 verschiedenen *N. tabacum*-Linien wurden unterteilt in: rot, schneller Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 3 dpi; orange, langsamer Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb-orange-gestreift, Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; gelb, Chlorose bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; weiß, keine sichtbare Reaktion bei $\geq 7/10$ Spots 8 dpi; grau, inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei 4-6 Spots) 8 dpi. Der immunologische Nachweis der *in planta*-Proteinsynthese wurde von H. Prochaska durchgeführt: +, detektiert; -, nicht detektiert; n, nicht analysiert. att, *attenuata*; mac, *macrophylla*; sag, *sagittata*; ser, *serotina*. Abkürzungen der Linien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Verschiedene T3E lösten in einigen Pflanzen Zelltodreaktionen aus, wohingegen sie in sehr eng verwandten Linien keine Reaktion verursachten. Dies wurde beispielsweise für XopJ beobachtet, dessen Synthese zwar in allen 46 getesteten *N. tabacum*-Akzessionen detektiert wurde, allerdings ausschließlich in *Ntab 9*, *Ntab 12* und *Ntab 26* eine Reaktion auslöste (Tabelle 9). Ein weiteres Beispiel ist der T3E XopO (Nachweis der Synthese in 71/86 Pflanzenlinien), der zwar in *Nnud* (Sektion *Repandae*) zu einem schnellen Zelltod führte, aber in keiner weiteren Linie (Tabelle 8). Im Gegensatz zu diesen Beispielen führte XopL in 43 *N. tabacum*-Linien zu Reaktionen, allerdings nicht in *Ntab 29*, *Ntab 35* und *Ntab 40*, obwohl XopL-spezifische Signale in Proteinextrakten dieser Linien detektiert wurden (Tabelle 9).

Bei dem zuvor beschriebenen Experiment wurden 86 verschiedene Pflanzenlinien verwendet, deren Homozygotie nicht gewährleistet werden konnte, sodass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft werden sollte. Der große Umfang des Experiments mit 18.920 Inokulationsspots (86 Linien \times 22 Stämme \times 5 Pflanzen \times 2 Spots), ließ keine 1:1-Wiederholung zu. Aus diesem Grund wurde in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten ein Set von 18 verschiedenen Pflanzenlinien dreier Gattungen untersucht. Um den experimentellen Aufwand weiter zu reduzieren, wurden außerdem drei, statt wie zuvor fünf, verschiedene Pflanzen pro Linie getestet. Wie die Tabelle 15 im Anhang zeigt, konnte das Gros der zuvor beschriebenen Reaktionen in Pflanzen unabhängiger Aussaaten reproduziert werden.

3.2 Analyse der von *Xcv* verursachten Nicht-Wirtsresistenz-Reaktionen in Vertretern der *Solanaceae*

Um einen Einblick in die NWR-Mechanismen von Vertretern der Gattung *Solanaceae* gegenüber *Xcv* zu erhalten, wurden die 86 oben beschriebenen Nicht-Wirtspflanzen mit dem Stamm 85-10 inokuliert und die Pflanzenreaktionen dokumentiert. Der T3E XopQ schien geeignet, um einen möglichen Einfluss eines einzelnen Effektors auf die NWR zu analysieren, da die Synthese von XopQ in fast allen Vertretern der Gattung *Nicotiana* eine Pflanzenreaktion hervorrief, allerdings in keiner anderen Gattung (siehe Abschnitt 3.1.2). Aus diesem Grund wurde der komplette *xopQ*-Leserahmen im Genom von *Xcv* 85-10 mit einem dafür erstelltem Suizidplasmid (pOGG2:*xopQ_del*) deletiert. Außerdem wurde die proteinkodierende Sequenz von *xopQ* in den *Xanthomonas*-Expressionsvektor pBRM kloniert (pBRM:*xopQ*), der die Genexpression durch den in *Xcv* konstitutiv aktiven *lac*-Promotor ermöglicht. Das ektopisch synthetisierte Protein ist zusätzlich C-terminal an ein c-Myc-Epitop fusioniert. Die Synthese von XopQ:c-Myc in dem Stamm *Xcv* 85-10 Δ *xopQ* pBRM:*xopQ* wurde mittels Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 7B).

3.2.1 XopQ beeinflusst die Nicht-Wirtsresistenz-Reaktion in *Nicotiana*-Linien, in denen die transiente Expression von XopQ eine Reaktion auslöst

Die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen in den 86 getesteten Pflanzenlinien variierten innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 8 Tagen stark. In den meisten Linien löste die Inokulation von *Xcv* eine Chlorose oder langsame Zelltodreaktion (6-8 dpi) aus, wobei häufig ein fließender Übergang von Chlorose zu Zelltod beobachtet wurde. Die Abbildung 7 fasst die Phänotypen 6 dpi zusammen. Unter Berücksichtigung der Phylogenie der verwendeten Pflanzenlinien fällt auf, dass die Reaktionen innerhalb einer Pflanzengattung, innerhalb einer Sektion und sogar innerhalb der Art *N. tabacum* teilweise sehr unterschiedlich waren. Beispielsweise löste *Xcv* in zwei der 46 *N. tabacum*-Akzessionen (*Ntab 4* und *Ntab 10*) einen schnellen Zelltod aus, wohingegen bei allen anderen *N. tabacum*-Akzessionen eine langsamere Reaktion sichtbar war (Abbildung 7).

Im Vergleich zu 85-10 führte die Inokulation des Stammes 85-10 Δ *xopQ* in Linien der Gattungen *Solanum*, *Nicandra*, *Physalis* und *Petunia* zu nahezu identischen Reaktionen, wohingegen die NWR-Reaktion in Linien der Gattung *Nicotiana* meist XopQ-abhängig war. Wie in der Abbildung 7 zusammengefasst, löste die Inokulation von 85-10 Δ *xopQ* in etwa 50 Linien schwächere oder langsamere Reaktionen aus als der Wildtyp. Ein Beispiel dafür ist *N. clevelandii* (*Ncle*): in dieser Linie löst *Xcv* 85-10 eine schnelle Zelltodreaktion (3 dpi) aus, während der *xopQ*-defiziente Stamm keine Zelltodreaktion auslöste (Abbildung 8A). In lediglich einer der untersuchten Linien, *N. rustica* (*Nrus*), verursachte 85-10 Δ *xopQ* eine stärkere Reaktion als der WT (Abbildung 8B). Überraschenderweise wurden nach der Inokulation von 85-10 Δ *xopQ* in *N. benthamiana* (*Nben*) und *N. paniculata* (*Npan*) etwa ab 3 dpi dunkelgrüne, wässrig erscheinende Reaktionen beobachtet (Abbildung 7 und Abbildung 8C). Diese Reaktionen ähneln stark den von *Xcv* verursachten wässrigen Läsionen in suszeptiblen Wirtspflanzen und werden daher im Folgenden als wässrige Läsionen bezeichnet.

Die ektopische Expression von *xopQ::c-Myc* in 85-10 Δ *xopQ* führte in der Regel zur Komplementation der *xopQ*-Deletion (Abbildung 7).

Interessanterweise war die von *Xcv* verursachte NWR-Reaktion in den Linien XopQ-unabhängig, in denen die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression von *xopQ* zu keiner sichtbaren Reaktion führte (Abbildung 7). Umgekehrt war die von *Xcv* verursachte NWR-Reaktion meist dann XopQ-abhängig, wenn die transiente Expression von *xopQ* mittels *Agrobacterium* auch zu einer sichtbaren Reaktion führte (Abbildung 7). Diese Korrelation führte zu der Hypothese, dass XopQ durch *Xcv* in Pflanzenzellen von Nicht-Wirtspflanzen der Gattung *Nicotiana* transloziert wird, wo XopQ erkannt wird und eine Abwehrreaktion gegen *Xcv* initiiert wird (ETI).

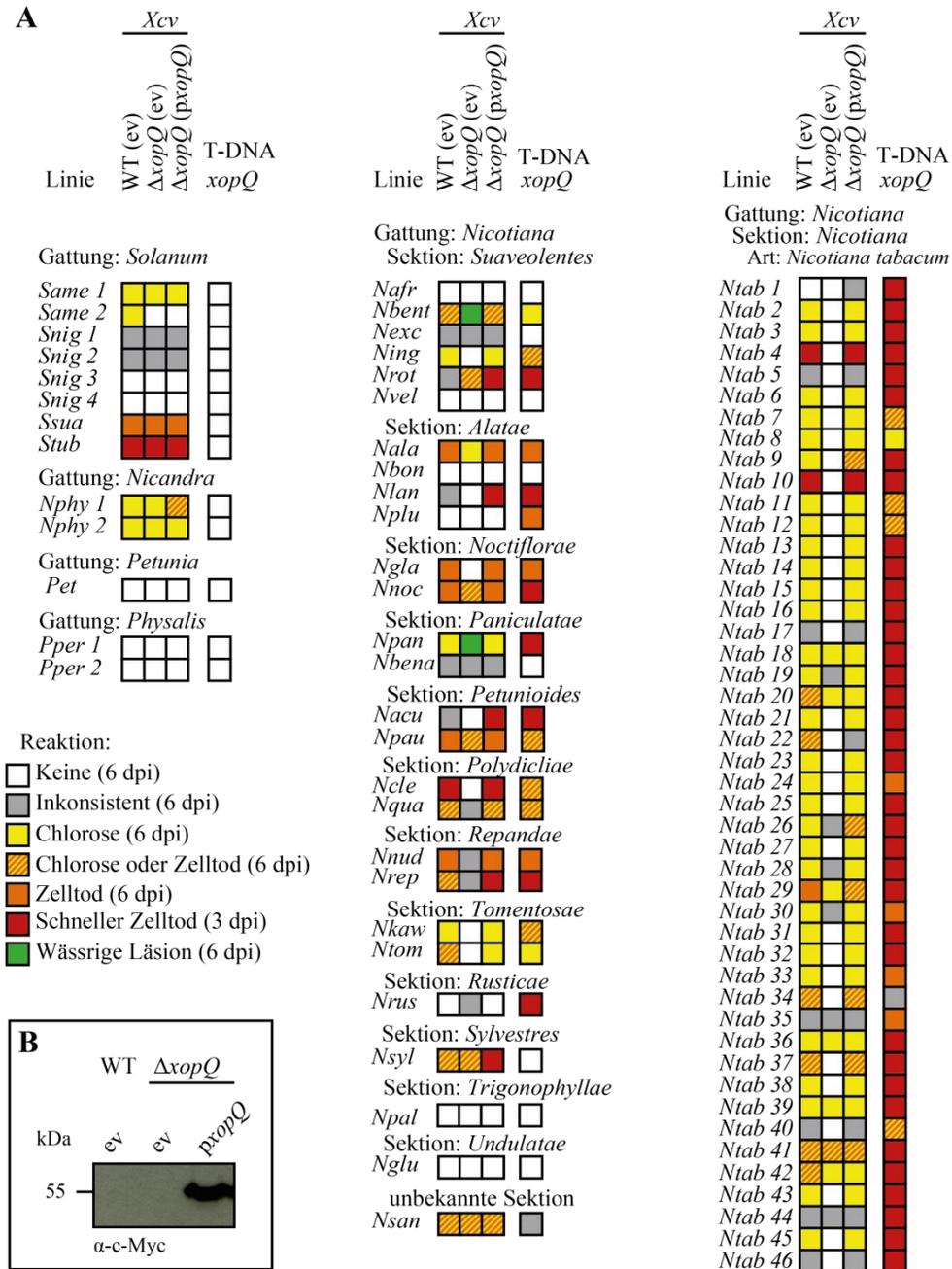


Abbildung 7. Der Einfluss von *xopQ* auf die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen in 86 *Solanaceae*-Linien.

A) Nicht-Wirtspflanzen (Abkürzungen siehe Tabelle 5) wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta xopQ$ ($\Delta xopQ$) mit einer OD₆₀₀ von 0,4 infiziert. Stämme trugen das Plasmid pBRM:*xopQ* (pxopQ) zur ektoptischen, konstitutiven Expression von *xopQ*:c-Myc oder pBRM (ev). Eine *Agrobacterium*-Inokulation zur transienten Expression von *xopQ*:gfp (T-DNA *xopQ*; OD₆₀₀ = 0,8) wurde zusätzlich durchgeführt. Reaktionen von 10 Inokulationssots (5 verschiedene Pflanzen) wurden zusammengefasst. Wenn mindestens 7/10 Spots zu den angegebenen Zeitpunkten eine der angegebenen Reaktionen zeigen, wurden sie der jeweiligen Kategorie zugeordnet. Waren Reaktionen lediglich bei 4-6/10 Spots sichtbar, wurden sie der Kategorie „inkonsistente Reaktion“ zugeordnet. **B)** Die Gesamtproteinextrakte der *Xcv*-Stämme wurden nach Wachstum auf Vollmedium immunologisch unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert.

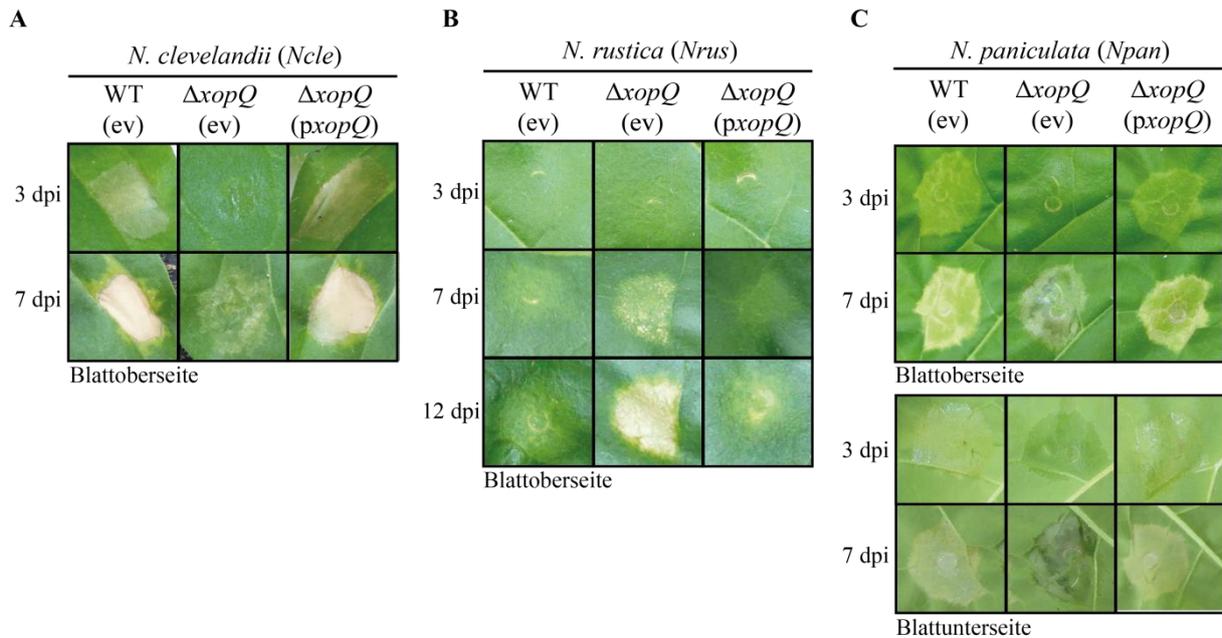


Abbildung 8. XopQ beeinflusst die NWR-Reaktionen in *N. paniculata*, *N. rustica* und *N. clelandii*.

Xcv 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta xopQ$ ($\Delta xopQ$), die pBRM:*xopQ* (*pxopQ*) zur ektopischen, konstitutiven Expression von *xopQ*:*c-Myc* oder pBRM (ev) trugen, wurden in die Blattunterseiten von (A) *N. clelandii*, (B) *N. rustica* und (C) *N. paniculata* inokuliert ($OD_{600} = 0,4$). Die Phänotypen wurden 3, 7 bzw. 12 dpi dokumentiert. Der Versuch wurde mindestens dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Das Experiment wurde, ähnlich wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, mit einer Auswahl von 18 verschiedenen Pflanzenlinien in unabhängigen Aussaaten reproduziert (Abbildung 9). Dabei wurde festgestellt, dass die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen in unabhängigen Aussaaten mitunter deutlich unterschiedlich sein konnten. So führte beispielsweise die Inokulation von *Xcv* in *Npan* in einem Experiment bereits nach drei Tagen zu einem Zelltod, wohingegen in zwei weiteren Experimenten lediglich eine Chlorose beobachtet wurde (Abbildung 9). Aufgrund dieser Beobachtung wurde der mögliche Einfluss von Umweltbedingungen auf die Variabilität der NWR-Reaktion gesondert untersucht (siehe Abschnitt 3.2.4). Die XopQ-Abhängigkeit der NWR-Reaktion in Linien, in denen die transiente Expression von *xopQ* zu einer sichtbaren Reaktion führte, konnte größtenteils reproduziert werden. Die Inokulation von 85-10 $\Delta xopQ$ in Blätter der Linien *N. paniculata* (*Npan*) löste in vier unabhängigen Experimenten wässrige Läsionen aus (Abbildung 9).

Um den Einfluss von T3E auf die NWR-Reaktion weiter zu analysieren wurden 18 Linien außerdem mit dem T3SS-defizienten Stamm 85-10 $\Delta hrcN$ infiziert. Dieser Stamm ist nicht in der Lage T3E durch das T3SS zu translozieren, da die ATPase des T3SS (*HrcN*) deletiert ist. Die Infektion mit 85-10 $\Delta hrcN$ führte in keiner der untersuchten Linien zu einer sichtbaren Reaktion (Abbildung 9).

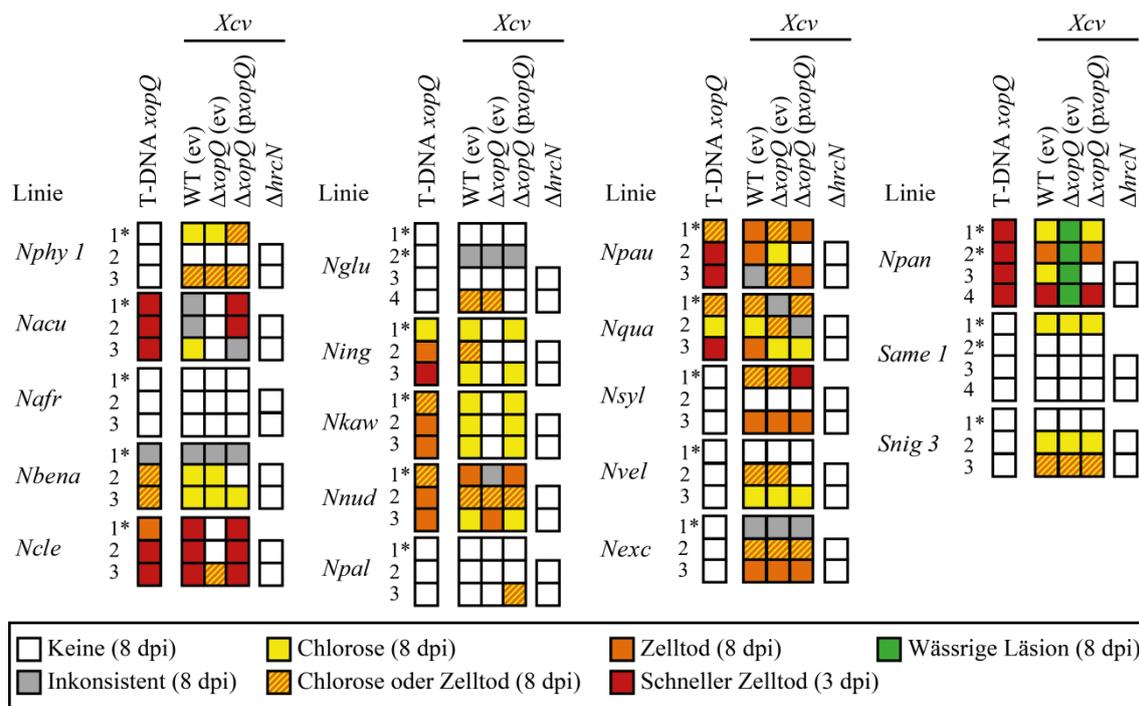


Abbildung 9. Reaktionen von 18 Nicht-Wirtspflanzen nach Inokulation von *Xcv*.

Die Ergebnisse von 3-4 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Experiment Nr. 1 entspricht dem in Abbildung 7 beschriebenen Experiment. Je Experiment wurden zwei Blätter von 5 verschiedenen Pflanzen (markiert mit *) oder 3 Pflanzen (alle anderen Experimente) inokuliert. Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression von *xopQ:gfp* (T-DNA *xopQ*) bzw. Inokulation der *Xcv*-Stämme 85-10 (WT), 85-10 $\Delta xopQ$ ($\Delta xopQ$), 85-10 $\Delta hrcN$ ($\Delta hrcN$), die pBRM:*xopQ* (*pxopQ*) oder pBRM (ev) trugen, wurden in folgende Gruppen unterteilt: rot, schneller Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 3 dpi; orange, langsamer Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; gelb-orange-gestreift, Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; gelb, Chlorose bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; weiß, keine sichtbare Reaktion bei $\geq 7/10$ bzw. $4/6$ Spots 8 dpi; grau, inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei 4-6/10 bzw. 3/6 Spots) 8 dpi.

3.2.2 XopQ beeinflusst das bakterielle Wachstum in Nicht-Wirtspflanzen und ist ein Avirulenzfaktor

In Abschnitt 3.2.1 wurde dargelegt, dass die Deletion von *xopQ* einen Einfluss auf die von *Xcv* ausgelöste NWR-Reaktion in zahlreichen Nicht-Wirtspflanzen hat. So löste 85-10 $\Delta xopQ$ im Vergleich zu 85-10 meist schwächere oder verzögerte Reaktionen aus, in einer Linie (*N. rustica*) allerdings auch eine stärkere Reaktion. Weiterhin führte die Inokulation von 85-10 $\Delta xopQ$ in *N. paniculata* und *N. benthamiana* zur Bildung wässriger Läsionen. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass XopQ neben dem Einfluss auf die sichtbare NWR-Reaktion auch das bakterielle Wachstum in Nicht-Wirtspflanzen determiniert. Um dies zu analysieren, wurde zunächst das *in planta*-Wachstum von *Xcv* in *N. clevelandii*, *N. rustica* und *N. paniculata* nach Inokulation mit geringer Zelldichte untersucht. Obwohl die *xopQ*-Deletion einen sehr unterschiedlichen und teilweise sogar gegensätzlichen Einfluss auf die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen hatte (Abbildung 8), wurde in allen drei Pflanzenlinien ein signifikant erhöhtes Wachstum von 85-10 $\Delta xopQ$ im Vergleich zu 85-10 festgestellt (Abbildung 10). Bemerkenswert ist weiterhin, dass 85-10 $\Delta xopQ$ in *N. paniculata* und *N. clevelandii* ein vergleichbar starkes Wachstum zeigt, obwohl 85-10 $\Delta xopQ$ nur in *N. paniculata* zu wässrigen Läsionen führt.

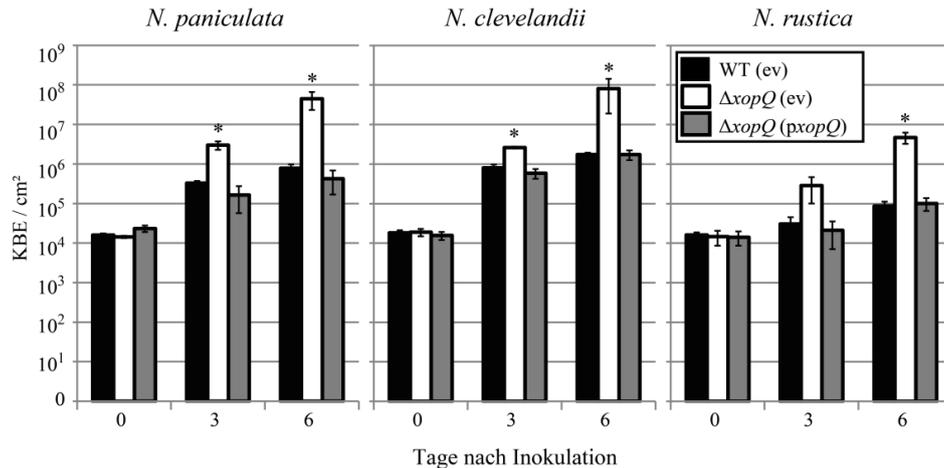


Abbildung 10. XopQ limitiert das Wachstum von *Xcv* in *N. paniculata*, *N. clevelandii* und *N. rustica*.

Xcv 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta xopQ$ ($\Delta xopQ$), die pBRM:*xopQ* (*pxopQ*) zur ectopischen, konstitutiven Expression von *xopQ*:*c-Myc* oder pBRM (ev) trugen, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,0004 in Blattunterseiten der angegebenen Pflanzenlinien inokuliert und die Anzahl Kolonie-bildender Bakterieneinheiten (KBE) *in planta* zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. *) Signifikante Unterschiede im Vergleich zu WT im studentischen t-Test, P < 0,05. Versuche wurden mind. zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Der Einfluss von XopQ auf die NWR-Reaktion und das bakterielle Wachstum wurde außerdem in einer *N. benthamiana*- und *N. tabacum*-Linie getestet, die regulär in der Arbeitsgruppe verwendet werden. Dies erlaubte es homozygote, nahezu isogene Versuchspflanzen zu analysieren. Pflanzen beider Linien wurden mit *Xcv* 85-10, 85-10 $\Delta xopQ$ und 85-10 $\Delta xopQ$ pBRM:*xopQ* inokuliert. In *N. benthamiana* führte die Inokulation von 85-10 $\Delta xopQ$ zu wässrigen Läsionen, wohingegen 85-10 kaum sichtbare NWR-Reaktionen auslöste (Abbildung 11A). In *N. tabacum* löste die Inokulation mit 85-10 eine Chlorose aus, die durch *xopQ*-Deletion deutlich reduziert und durch *xopQ*-Überexpression verstärkt wurde (Abbildung 11A). In beiden Pflanzenlinien zeigte sich für 85-10 $\Delta xopQ$ ein bis zu 100-fach erhöhtes Wachstum (Abbildung 11C). Das *in planta*-Wachstum von 85-10 $\Delta xopQ$ pBRM:*xopQ* entsprach etwa dem des WT-Stammes. Wie der WT-Stamm löste auch 85-10 $\Delta xopQ$ pBRM:*xopQ* NWR-Reaktionen aus. Diese waren sogar etwas stärker als nach Inokulation des WT-Stammes: in *N. tabacum* wurde eine stärkere Chlorose beobachtet und in *N. benthamiana* wurden die Inokulationsspotts in einigen Fällen partiell nekrotisch. Interessanterweise wurde weiterhin festgestellt, dass *Xcv* 85-10 in *N. benthamiana* ein signifikant geringeres *in planta*-Wachstum aufweist als *Xcv* 85-10 $\Delta hrcN$ (Abbildung 11C).

Um zu untersuchen, ob XopQ auch zur Virulenz von *Xcv* beiträgt, wurden 85-10 und 85-10 $\Delta xopQ$ in susceptible Wirtspflanzen inokuliert. Nach Inokulation zeigten die infizierte Bereiche wässrige Läsionen, die später nekrotisch wurden. Ein Einfluss der *xopQ*-Deletion auf die Symptombildung oder das bakterielle Wachstum wurde in susceptible Paprika- (ECW) und Tomatenpflanzen (cv. Moneymaker) nicht festgestellt (Abbildung 11A und B).

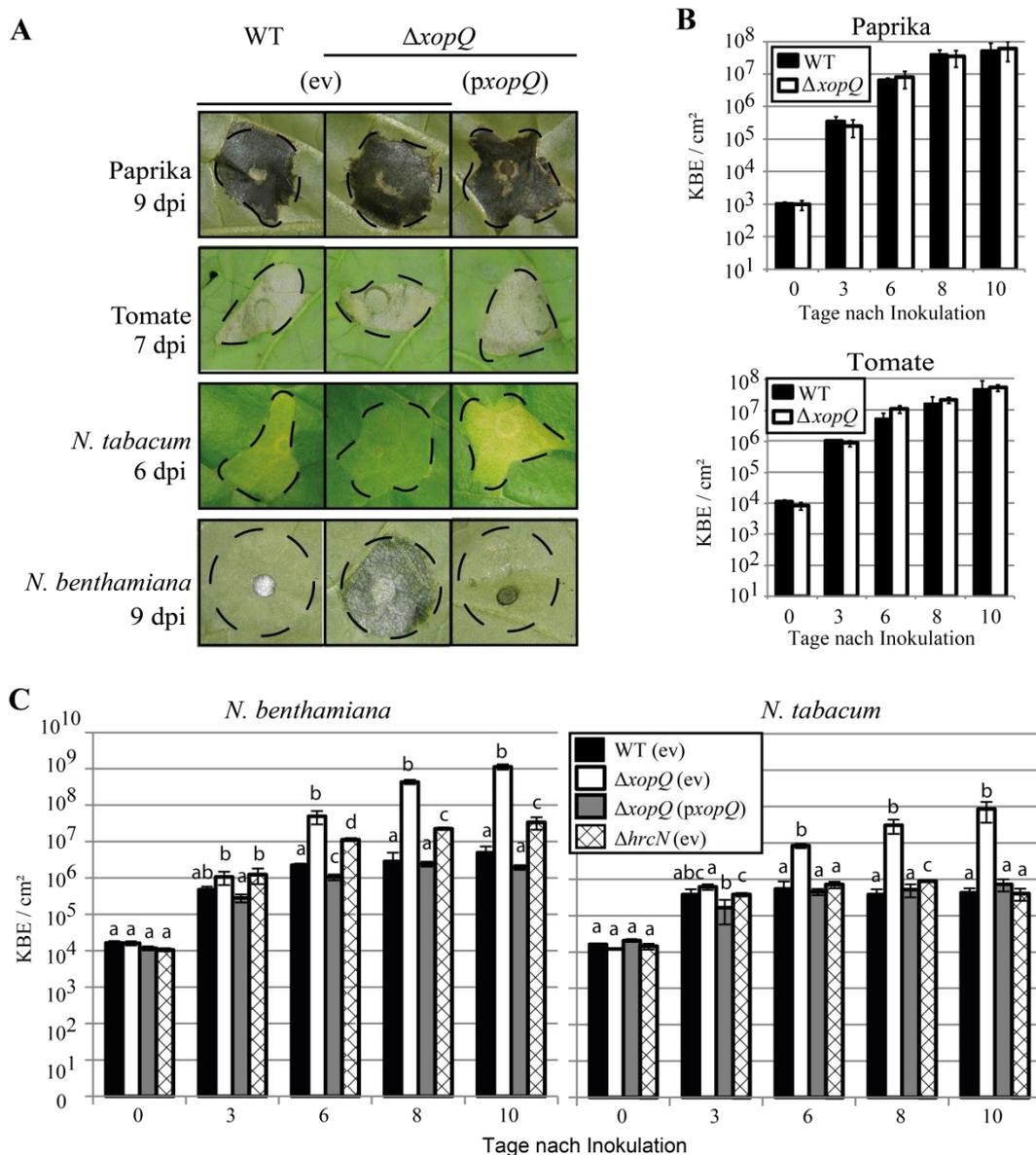


Abbildung 11. Der Einfluss von *xopQ* auf Pflanzenreaktionen und bakterielles Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen sowie *N. benthamiana* und *N. tabacum*.

Inokuliert wurden *Xcv* 85-10 (WT), 85-10 $\Delta xopQ$ ($\Delta xopQ$) und 85-10 $\Delta hrcN$ ($\Delta hrcN$), die pBRM:*xopQ* (pxopQ) zur ektopischen, konstitutiven Expression von *xopQ::c-Myc* oder pBRM (ev) trugen. **A**) Stämme wurden in die Blattunterseiten von suszeptiblen Paprikapflanzen (*C. annuum* cv. ECW) bzw. Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) und von den Nicht-Wirtspflanzen *N. benthamiana* und *N. tabacum* inokuliert ($OD_{600} = 0,4$). Pflanzenreaktionen an den angegebenen Tagen nach der Inokulation (dpi) wurden dokumentiert. Gestrichelte Linien markieren inokulierte Blattbereiche. **B** und **C**) Bakterienstämme wurden mit einer OD_{600} von 4×10^{-5} (Paprika cv. ECW) bzw. OD_{600} von 4×10^{-4} (Tomate cv. Moneymaker, *N. benthamiana* und *N. tabacum*) inokuliert und die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten (KBE) pro cm^2 *in planta* bestimmt. Signifikante unterschiedliche (studentischer t-Test, $P < 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt. Versuche wurden mindestens zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

3.2.3 *Xcv* transloziert Effektoren in *N. benthamiana*

Die Feststellung, dass XopQ Avirulenz von *N. benthamiana* und *N. paniculata* gegenüber *Xcv* vermittelt, legt nahe, dass *Xcv* T3E in die Zellen dieser Nicht-Wirtspflanzen transloziert. Um dies experimentell zu überprüfen, wurde die T3SS-abhängige Translokation des T3E AvrBs3 in *N. benthamiana* getestet. Dazu wurde ein Plasmid zur ektopischen, konstitutiven Expression von *avrBs3::FLAG* (pGGX1:*avrBs3*, A. Sorgatz, U. Bonas, unpubliziert) in *Xcv* 85-10, 85-10 $\Delta xopQ$ und

den 85-10 Δ *hrcN* konjugiert. Anschließend wurden die Stämme in *Bs3*-transgene *N. benthamiana* inokuliert, in denen die Anwesenheit von AvrBs3 zur Expression des *Bs3*-Resistenzgens führt, was in einer HR resultiert (Römer *et al.*, 2007).

Wie die Abbildung 12A zeigt, führten sowohl *Xcv* 85-10 als auch 85-10 Δ *xopQ* in *Bs3*-*N. benthamiana* zu einem Zelltod. Diese Reaktion trat nicht nach Inokulation von *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* auf, sodass AvrBs3 T3SS-abhängig transloziert wurde. Die Translokation von AvrBs3 hatte keinen Einfluss auf die von *Xcv* verursachten Reaktionen nach Inokulation in nicht-transgene *N. benthamiana*: hier führte 85-10 Δ *xopQ* zu wässrigen Läsionen, die anderen beiden Stämme hingegen nicht. Zur Kontrolle wurden die *Xcv*-Stämme zusätzlich in susceptible (ECW) und resistente Paprikapflanzen inokuliert. In resistenten Pflanzenzellen lösen die Effektoren AvrBs1 (Erkennung in ECW-10R) bzw. AvrBs3 (Erkennung in ECW-30R) eine HR aus (Minsavage *et al.*, 1990). In susceptible Paprikapflanzen induziert AvrBs3 die Bildung einer Hypertrophie (Marois *et al.*, 2002). Wie erwartet, löste 85-10 Δ *hrcN* keine Pflanzenreaktionen aus, wohingegen die Inokulation der anderen beiden Stämme eine AvrBs1- und AvrBs3-abhängige HR in resistenten und eine Hypertrophie in susceptible Paprikapflanzen auslöste. In Proteinextrakten aller verwendeten Stämme wurden AvrBs3:FLAG-spezifische Signale mittels FLAG-Epitop-spezifischem Antikörper nachgewiesen (Abbildung 12B).

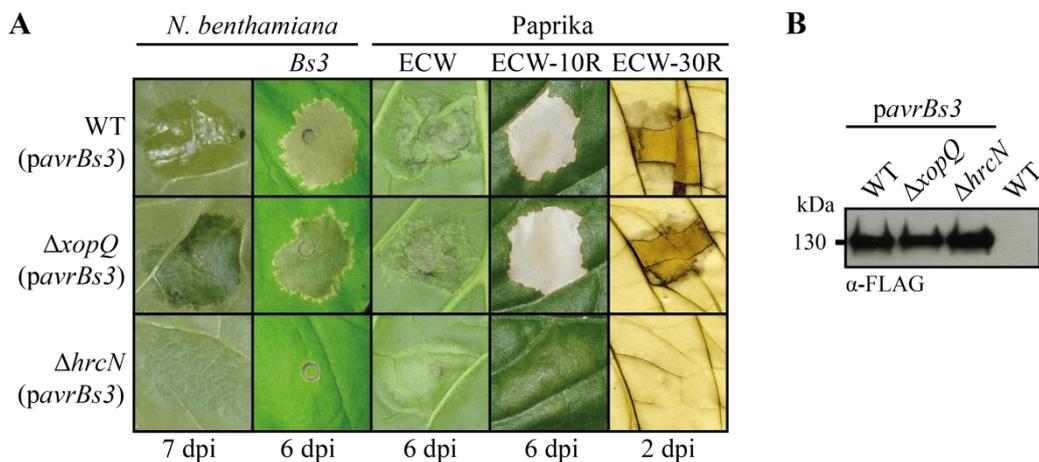


Abbildung 12. *Xcv* transloziert AvrBs3 in *N. benthamiana*.

Xcv 85-10 (WT), 85-10 Δ *xopQ* (Δ *xopQ*) und 85-10 Δ *hrcN* (Δ *hrcN*) trugen das Plasmid pGGX1:*avrBs3* zur ektopischen, konstitutiven Expression von *avrBs3:FLAG*. **A**) Bakterien wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,4 in die Blattunterseiten von susceptible Paprikapflanzen (ECW), resistenten Paprikapflanzen (ECW-10R, ECW-30R) sowie *Bs3*-transgenen (*Bs3*) und nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Reaktionen wurden an den angegebenen Tagen nach der Inokulation (dpi) dokumentiert, ECW-30R-Blätter wurden in EtOH gebleicht. **B**) AvrBs3:FLAG-spezifische Signale wurden in den *Xcv*-Proteinextrakten nach Wachstum auf Vollmedium immunologisch mittels FLAG-spezifischem Antikörper detektiert. Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.2.4 Die von *Xcv* verursachte NWR-Reaktion in *N. benthamiana* hängt von verschiedenen Faktoren ab

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, waren die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen bei einigen Pflanzenlinien in unterschiedlichen Experimenten deutlich verschieden (Abbildung 9). Beispielsweise reagierten die Linien *Ning* und *Npan* in unterschiedlichen Versuchen entweder mit einem schnellen Zelltod, einem langsamen Zelltod oder einer Chlorose (Abbildung 9). Als Ursache für die Unterschiede kam der Verbleib der inokulierten Pflanzen im Gewächshaus (GWH) in Betracht; diese konnten aus Kapazitätsgründen nicht in eine Phytokammer (sog. Percival) überführt werden. Um dies zu überprüfen, wurden die von *Xcv* verursachten NWR-Reaktionen in *N. benthamiana* genauer untersucht. Dazu wurden sechs homozygote, nahezu isogene Pflanzen nach der Inokulation in Percivals gestellt, während sechs Pflanzen im GWH verblieben. Wie die Tabelle 6 (Abschnitt 2.3.1) zeigt, herrschten in dem Percival im Vergleich zum GWH leicht reduzierte Temperaturen bei deutlich verringerter Beleuchtungsstärke. Während Percivals sehr konstante Bedingungen gewährleisten, sind in den Gewächshauskammern deutliche Schwankungen der Umweltbedingungen zu messen (Tabelle 6).

Wie in der Abbildung 13A zusammengefasst ist, hatte der Standort der Pflanzen einen signifikanten Einfluss auf die NWR-Reaktion. 7 Tage nach Inokulation von 85-10 mit einer Zelldichte von 5×10^8 KBE ml⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,4) zeigten beispielsweise etwa ein Drittel der Inokulationssots einen kompletten Zelltod, ein Drittel einen partiellen Zelltod und ein Drittel keine Reaktion, wenn die Pflanzen im Gewächshaus standen. Wurden die Pflanzen allerdings in Phytokammern transferiert, dann zeigten 17% der Inokulationssots eine partielle Zelltodreaktion und 83% keine Reaktion. Im Gegensatz zum Transfer der Pflanzen in Phytokammern begünstigt deren Verbleib im GWH also die Diversität und Intensität der Pflanzenreaktionen signifikant. Wurde *N. benthamiana* nach Inokulation mit 85-10 in Phytokammern gestellt, dann wurden die Inokulationssots nach etwa einer Woche meist chlorotisch (Blattoberseite), und die Blattunterseiten erschienen häufig glänzend (Abbildung 13B).

Neben 85-10 wurde bei diesem Experiment zusätzlich der Stamm 85* verwendet, der eine konstitutiv aktive Variante des Transkriptionsfaktors HrpG synthetisiert und aufgrund konstitutiv exprimierter *hrp*-Gene virulenter ist, als 85-10 (Wengelnik *et al.*, 1996; Wengelnik *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu 85-10 löste 85* in *N. benthamiana* meist eine Zelltodreaktion aus (Abbildung 13A und B). Die von 85* verursachten NWR-Reaktionen waren ebenfalls signifikant Standort-abhängig und waren schwächer, wenn Versuchspflanzen in Phytokammern transferiert wurden (Abbildung 13A). Die von 85* verursachten Zelltodreaktionen waren bereits 2 bis 3 Tage nach der Inokulation sichtbar (Abbildung 38 im Anhang). Bei der Verwendung einer deutlich geringeren Bakteriendichte (5×10^6 KBE ml⁻¹; OD₆₀₀ = 0,004) wurden meist keine sichtbaren Reaktionen beobachtet (Abbildung 13).

Der Unterschied zwischen einer Typ-I-NWR (ohne HR) und Typ-II-NWR (mit HR) in *N. benthamiana* hängt demzufolge maßgeblich von der Virulenz, Inokulationsdichte und Umweltbedingungen ab. Gleichzeitig machen die Ergebnisse deutlich, dass beide NWR-Typen nicht

strikt voneinander zu trennen sind, sondern ein dynamischer Übergang stattfindet, der von verschiedenen Faktoren abhängt.

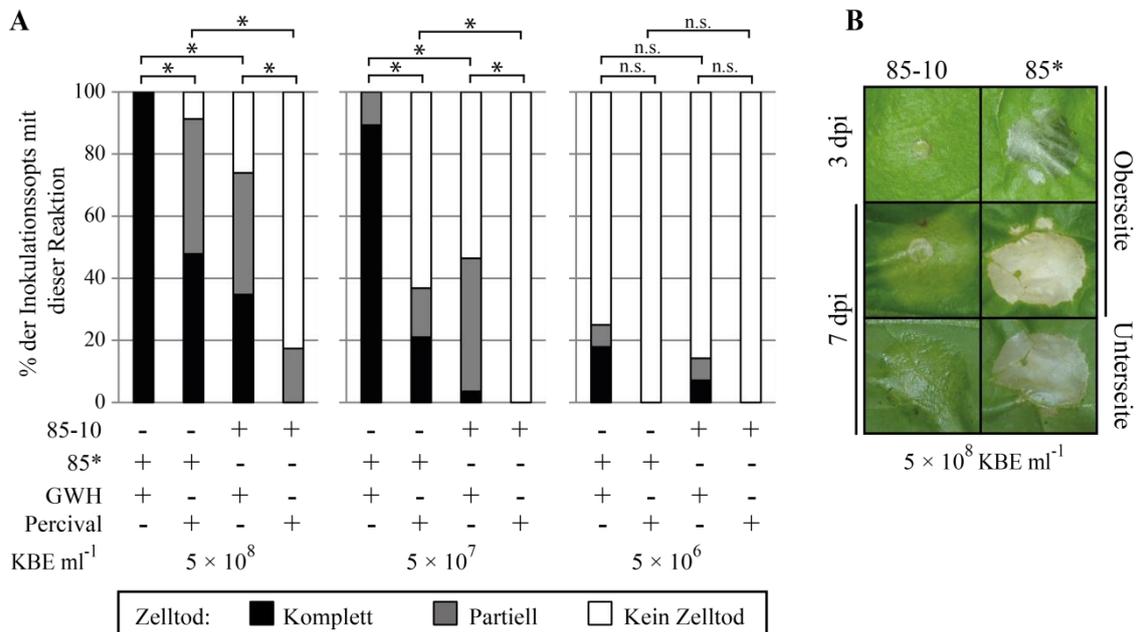


Abbildung 13. Die NWR-Reaktion von *N. benthamiana* nach *Xcv*-Infektion.

Xcv 85-10 und 85* wurden mit unterschiedlichen Zelldichten (5×10^6 [OD₆₀₀ 0,004] bis 5×10^8 [OD₆₀₀ 0,4] KBE ml⁻¹) in die Blattunterseiten von *N. benthamiana* inokuliert. Anschließend verblieben Pflanzen im Gewächshaus (GWH) oder wurden in eine Phytokammer (Percival) überführt. **A**) Pflanzenreaktionen wurden 7 dpi kategorisiert in kompletter Zelltod (> 90% des inokulierten Bereiches tot), partieller Zelltod (10% - 90% des inokulierten Bereiches tot) oder kein Zelltod (< 10% des inokulierten Bereiches tot). Die Balken repräsentieren die prozentuale Häufigkeit jeder Kategorie bei 20 - 28 Inokulationssspots. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde mittels „Wilcoxon signed rank test“ ermittelt (*, signifikant; n.s., nicht signifikant; P < 0,05). **B**) Repräsentative NWR-Reaktionen 3 und 7 dpi sind dargestellt. Experimente wurden mindestens zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

3.3 Charakterisierung von XopQ auf Grundlage der Kristallstruktur

Die Identifizierung von XopQ als Avirulenzfaktor führte zu der Fragestellung nach den molekularen Mechanismen der Erkennung dieses T3E *in planta*. Dazu sollten mit Hilfe von Deletions- und Substitutionsderivaten Proteinbereiche von XopQ identifiziert werden, die essenziell für die Erkennung in Nicht-Wirtspflanzen sind. Grundlage bei der Erstellung von XopQ-Derivaten stellten die unpublizierten Kristallstrukturen von XopQ aus *Xcv* 85-10 (XopQ_{Xcv}) und den beiden XopQ-Homologen der Organismen *Xcc* ATCC 33913 (im Folgenden XopQ_{Xcc}) und *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) Stamm 1448a (im Folgenden HopQ1_{Psp}) dar, die von A. Singer und A. Savchenko (Universität Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellt wurden. Zu Beginn der XopQ_{Xcv}-Charakterisierung auf Grundlage dieser Strukturen war keine weitere 3D-Struktur eines Effektors dieser Familie bekannt.

3.3.1 Die konservierte Struktur der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie

Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie werden in phytopathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Acidovorax* kodiert und sind meist zwischen 440 und 500 Aminosäuren (As) lang. Zunächst wurde ein Sequenzvergleich von 24 Vertretern dieser Effektorfamilie durchgeführt (Abbildung 14). Dabei wurde deutlich, dass der N-terminale Bereich (ca. 70 As) wenig konserviert ist, wohingegen weite Teile des restlichen Proteins auf As-Ebene zu > 75% konserviert sind. Die starke Konservierung der Primärstruktur spiegelt sich auch in den von A. Singer und A. Savchenko ermittelten Kristallstrukturen von XopQ_{Xcv}, XopQ_{Xcc} und HopQ_{Psp} wider: von allen drei Proteinen wurden Homodimere kristallisiert, deren Monomere jeweils in zwei Domänen unterteilt werden können, eine Nukleosid-Hydrolase (NH)-Domäne und eine *in vitro*-Dimerisierungsdomäne. Da bei der Kristallisierung ein limitierter Proteaseverdau durchgeführt wurde, wurden interne Regionen von 65 - 75 As nicht kristallisiert. Im Falle von XopQ_{Xcv} betrifft dies 69 As (Position 153 - 222). Außerdem wurde nicht versucht, den bei T3E meist unstrukturierten N-terminalen Bereich zu kristallisieren, sodass Strukturinformationen für XopQ_{Xcv} ab As 65 erhalten wurden. In der Abbildung 14 sind die ermittelten Sekundärstrukturelemente unter der Konsensussequenz angegeben. Die Abbildung 15 zeigt die Tertiär- und Quartärstruktur des XopQ-Dimers als *Ribbon*-Diagramm.

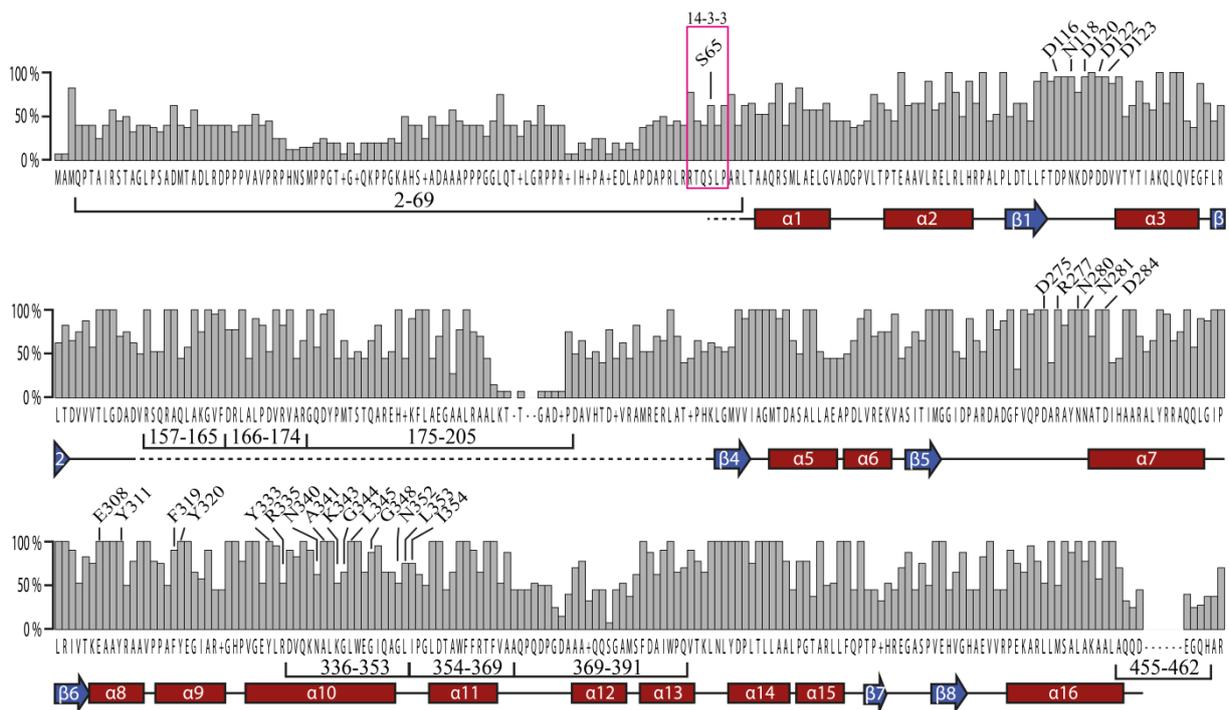


Abbildung 14. Aminosäure-Konsensussequenz der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie.

Die Aminosäure-Konsensussequenz von 24 Vertretern der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie (genaue Auflistung der verwendeten Proteine in Abbildung 39 im Anhang) ist angegeben. Balken beschreiben den Grad der Konservierung der einzelnen As in Prozent. Das pinkfarbene Kästchen kennzeichnet die Position der bekannten 14-3-3-Bindestelle (Teper *et al.*, 2014). Die Positionen von As, die im Rahmen dieser Arbeit substituiert oder deletiert wurden sind angegeben, dabei wurde die Nummerierung der As von XopQ_{Xcv} verwendet. Sekundärstrukturelemente der von A. Singer und A. Savchenko ermittelten Kristallstruktur von XopQ_{Xcc} sind unter der Konsensussequenz angegeben: rote Kästchen: α -Helices; blaue Pfeile: β -Faltblätter; durchgezogenen Linien: *loop*-Regionen; gestrichelten Linien: nicht-kristallisierte Bereiche.

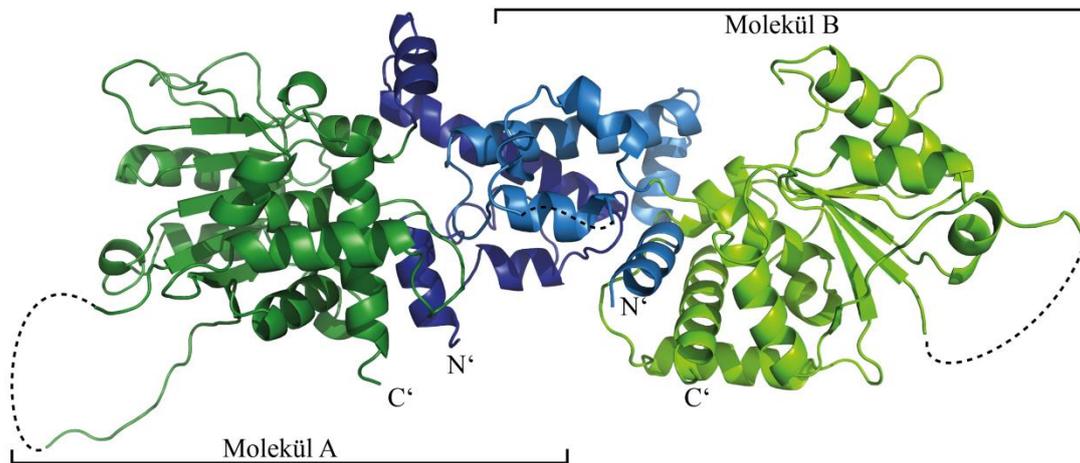


Abbildung 15. Ribbon-Diagramm eines XopQ-Dimers.

Die für XopQ_{Xcv}₆₅₋₄₅₉ ermittelte Kristallstruktur ist als *Ribbon-Diagramm* dargestellt. Die Positionen der N- und C-terminalen Bereiche ist angegeben. Blau: *in vitro*-Dimerisierungsdomäne; grün: NH-Domäne. Gestrichelte Linien repräsentieren nicht-kristallisierte Bereiche. Molekül B ist heller dargestellt als Molekül A. Modifizierte Abbildung von A. Singer (unpubliziert).

3.3.2 Homologe der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie verursachen identische Reaktionen in verschiedenen *Solanaceae*

Im Folgenden sollten die Reaktionen verglichen werden, die von verschiedenen XopQ/HopQ-Homologen in planta ausgelöst werden. Dazu wurden *xopQ*_{Xcv} (XCV4438 aus *Xcv* 85-10), *xopQ*_{Xcc} (XCC1072 aus *Xcc* ATCC 33913) sowie *hopQ1* aus *Pto* DC3000 (PSPTO_0788, im Folgenden *hopQ1*_{Pto}) in pGGA1 kloniert, mit dessen Hilfe die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Synthese der Effektoren, fusioniert an ein C-terminales GFP-Epitop, untersucht werden konnte.

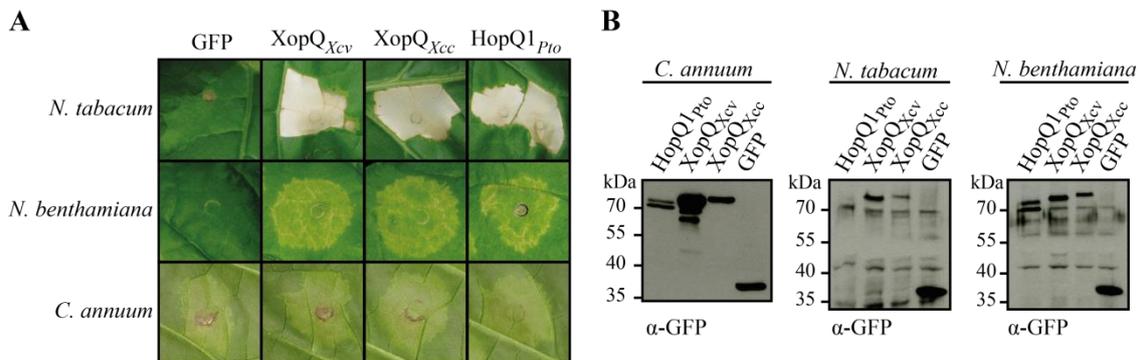


Abbildung 16. Ausgewählte Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie verursachen identische Pflanzenreaktionen.

A. tumefaciens-Stämme, die die Expression von *gfp::c-Myc* (GFP), *xopQ*_{Xcv}:*gfp* (XopQ_{Xcv}), *xopQ*_{Xcc}:*gfp* (XopQ_{Xcc}) und *hopQ1*_{Pto}:*gfp* (HopQ1_{Pto}) unter Kontrolle des 35S-Promoters vermitteln, wurden in Blätter von *N. tabacum*, *N. benthamiana* und Paprika (*C. annuum* cv. ECW) mit einer OD₆₀₀ von 0,8 inokuliert. **A)** Die Reaktionen wurden 3 dpi (*N. tabacum*) bzw. 6 dpi (*N. benthamiana*, *C. annuum*) dokumentiert. **B)** Gesamtproteinextrakte von infiziertem Blattmaterial wurde 1 dpi (*N. tabacum*) bzw. 2 dpi (*N. benthamiana*, *C. annuum*) mittels Immunoblot und einem GFP-spezifischen Antikörper analysiert. Die Experimente wurden mindestens zweimal mit ähnlichen Resultaten reproduziert.

Alle drei Homologe verursachten etwa 2 dpi in *N. tabacum* eine HR, etwa 6 dpi in *N. benthamiana* eine Chlorose und keine sichtbare Reaktion nach *Agrobacterium*-Inokulation in *C. annuum* (Abbildung 16A). Qualitative oder quantitative Unterschiede in den Reaktionen wurden nicht

festgestellt. Als Kontrolle diente die transiente Expression von *gfp:c-Myc*, die zu keiner sichtbaren Reaktionen führte. Spezifische Signale der C-terminal GFP-markierten Effektoren wurden mittels Immunoblot detektiert (Abbildung 16B).

Um auszuschließen, dass das verwendete C-terminale GFP-Epitop einen Einfluss auf die beobachteten Pflanzenreaktionen hatte, wurden auch die *XopQ_{Xcv}*-Varianten untersucht, an die ein N-terminales GFP, ein N-terminales c-Myc, ein C-terminales c-Myc oder kein Epitop fusioniert war. Kein Epitop beeinflusste die Reaktionen nach transientser Expression in *N. benthamiana* und *N. tabacum* (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 *hopQ1_{Pto}* komplementiert die Deletion von *xopQ* in *Xcv*

Wie in 3.2.2 beschrieben, vermittelt *XopQ_{Xcv}* die Avirulenz von *Xcv* in *N. benthamiana*. *N. benthamiana* ist ebenfalls eine Nicht-Wirtspflanze von *Pto* DC3000, und die Avirulenzreaktion wird von dem *XopQ*-Homolog *HopQ1_{Pto}* vermittelt (Wei *et al.*, 2007). Um zu eruieren, ob die Avirulenzaktivitäten von *XopQ_{Xcv}* und *HopQ1_{Pto}* in *N. benthamiana* auf identischen Mechanismen beruhen, wurde ein Inter-Spezies-Komplementationsversuch durchgeführt. Dazu wurde *hopQ1_{Pto}* in den *Xanthomonas*-Expressionsvektor pBRM kloniert (pBRM:*hopQ1_{Pto}*), sodass ein Konstrukt zur konstitutiven, ektopischen Expression von c-Myc-Epitop-fusioniertem *hopQ1_{Pto}* zur Verfügung stand, das in 85-10 Δ *xopQ* konjugiert wurde. Die Synthese von *HopQ1_{Pto}*:c-Myc (ca. 53 kDa groß) wurde zunächst im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 17A). Anschließend wurde analysiert, welche Reaktion 85-10 Δ *xopQ* pBRM:*hopQ1_{Pto}* in *N. benthamiana* auslöst. Wie die Abbildung 17B zeigt, komplementierte *HopQ1_{Pto}* den *XopQ*-Deletionsstamm, sodass die von *XopQ_{Xcv}* und *HopQ1_{Pto}* vermittelten Avirulenzreaktionen auf identischen Erkennungsmechanismen beruhen könnten. Wie bereits in 3.2.2 erwähnt, löste der Stamm 85-10 Δ *xopQ* pBRM:*xopQ* in *N. benthamiana* gelegentlich eine partielle Nekrose aus, was für 85-10 Δ *xopQ* pBRM:*hopQ_{Pto}* nicht beobachtet wurde.

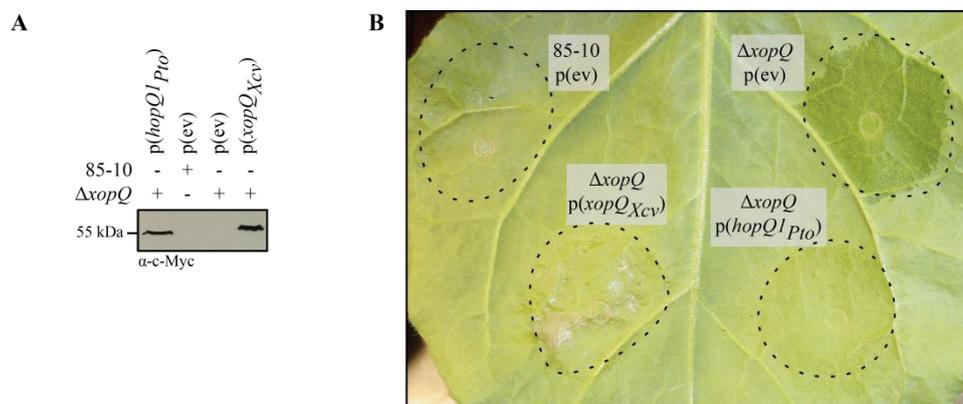


Abbildung 17. *hopQ1_{Pto}* komplementiert *Xcv* 85-10 Δ *xopQ*.

Xcv 85-10 und 85-10 Δ *xopQ* (Δ *xopQ*), die Plasmide zur konstitutiven Expression von *xopQ_{Xcv}*:c-Myc (p(*xopQ_{Xcv}*)) oder *hopQ1_{Pto}*:c-Myc (p(*hopQ1_{Pto}*)) bzw. pBRM (p(ev)) tragen, wurden verwendet. **A**) *Xcv*-Proteinextrakte wurden immunologisch mit c-Myc-spezifischem Antikörper untersucht. **B**) *Xcv* wurde in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert (OD₆₀₀ = 0,4) und die Phänotypen 7 dpi dokumentiert. Gestrichelte Linien markieren den inokulierten Bereich. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

3.3.4 Identifizierung von XopQ-Domänen, die für die Reaktionen nach transienter Expression in *N. benthamiana* und *N. tabacum* essenziell sind

Die 3D-Strukturen der drei XopQ/HopQ1-Homologen enthalten konservierte Bereiche und Domänen, die für die Proteinfunktion und -aktivität wichtig sein könnten, beispielsweise die *in vitro*-Dimerisierungsdomäne und das aktive Zentrum der NH-Domäne. Zunächst wurde versucht, Domänen und As zu identifizieren, die für das Auslösen der Chlorose und HR in *N. benthamiana* bzw. *N. tabacum* essenziell sind. Da die untersuchten Vertreter dieser Effektorfamilie identische *in planta*-Reaktionen auslösten (siehe 3.3.2), wurde nur XopQ aus *Xcv* näher charakterisiert. Die Mutagenese von *xopQ* erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese und *xopQ*-Derivate wurden in den Binärvektor pGGA1 kloniert, mit dessen Hilfe die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Synthese der Derivate, fusioniert an ein C-terminales GFP-Epitop, untersucht wurde. In Kooperation mit A. Singer und A. Savchenko (Universität Toronto, Kanada) wurden insgesamt 33 verschiedene XopQ-Derivate charakterisiert, wobei die meisten der untersuchten Mutationen von A. Singer vorgeschlagen und im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. In der Abbildung 14 sind die Positionen der meisten Deletionen und Substitutionen angegeben. Die Pflanzenreaktionen nach transienter Expression in *N. benthamiana* und *N. tabacum* sind in der Abbildung 18 dargestellt und in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Zunächst wurden verschiedene saure As in der *loop*-Region hinter dem β 1-Faltblatt (XopQ_D116A,N118A und XopQ_D120A,D122A,D123A) und As in einer hoch-konservierten Oberflächenschlucht nahe dieser sauren *loop*-Region (XopQ_N280A,N281A,D284A, XopQ_D275A,R277A, XopQ_N396A,Y398F,D399A und XopQ_E308A,Y311F) substituiert. Sie wurden gewählt, weil dieser Bereich das aktive Zentrum von Nukleosid-Hydrolasen bildet und essenziell für deren Aktivität ist. Die Substitutionen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Reaktionen nach transienter Expression, sodass als nächstes XopQ-Derivate mit Deletionen mehrerer As analysiert wurden. Derivate mit Deletion der N-terminalen 69 Aminosäuren (XopQ_ Δ 2-69), was auch die bekannte 14-3-3-Bindestelle einschließt, und die Deletion der C-terminalen acht As (XopQ_ Δ 455-462) lösten noch Reaktionen in *N. benthamiana* und *N. tabacum* aus.

Als nächstes wurde der Einfluss der zentralen, nicht kristallisierten XopQ-Region auf die Pflanzenreaktionen untersucht. Laut Strukturvorhersage (PHYRE2) bildet dieser Bereich zwei Helix-Strukturen, die zunächst mit vier verschiedenen Deletionsmutanten charakterisiert wurden: XopQ_ Δ 157-217 (Deletion der gesamten Region), XopQ_ Δ 175-217 (Deletion der gesamten Region, außer der ersten Helix), XopQ_ Δ 175-205 (Deletion der As zwischen beiden Helices) und XopQ_ Δ 157-174 (Deletion der ersten Helix). Die Deletion des kompletten Bereiches (Δ 157-217) und der ersten vorhergesagten Helix (Δ 157-174) führte dazu, dass XopQ keine HR in *N. tabacum* mehr auslöste. Die Deletion des Bereiches zwischen den vorhergesagten Helices (Δ 175-205) und die zusätzliche Deletion der zweiten vorhergesagten Helix (Δ 175-217) führte im Vergleich zum Wildtyp-XopQ zu einer leicht verzögerten Zelltodreaktion nach transienter Expression in *N. tabacum*. Die

transiente Expression aller vier Derivate in *N. benthamiana* führte zu einer vergleichbar starken chlorotischen Reaktion wie nach transientscher Expression von *xopQ*. Die erste vorhergesagte Helix dieser Region ist also essenziell für die XopQ-vermittelte HR in *N. tabacum*, allerdings nicht für die XopQ-vermittelte Chlorose nach transientscher Expression in *N. benthamiana*. Um wichtige As weiter einzugrenzen, wurden zusätzlich die Derivate XopQ_Δ157-165 und XopQ_Δ166-174 getestet. Beide lösten keine sichtbare Reaktion in *N. tabacum* aus.

Des Weiteren wurde der Einfluss der *in vitro*-Dimerisierungsdomäne untersucht, die von insgesamt sechs α -Helices ($\alpha 1$, $\alpha 9$ - $\alpha 13$) gebildet wird. Derivate mit Deletionen von $\alpha 9$ - $\alpha 13$ (XopQ_Δ319-391) und Deletionen in $\alpha 10$ - $\alpha 13$ (XopQ_Δ336-386) lösten keine HR in *N. tabacum* sowie keine bzw. eine reduzierte Chlorose in *N. benthamiana* aus. Um funktionell wichtige Regionen weiter einzugrenzen, wurden kleinere Bereiche deletiert. Die Derivate XopQ_Δ369-391 und XopQ_Δ372-382 lösten eine HR in *N. tabacum* und eine Chlorose in *N. benthamiana* aus. Bei der Analyse der Derivate XopQ_Δ336-353 (Deletion des Hauptteils von $\alpha 10$) und XopQ_Δ354-369 (Deletion von $\alpha 11$) wurde festgestellt, dass beide Helices für das Auslösen einer HR in *N. tabacum* essenziell sind. Für das Auslösen einer Chlorose in *N. benthamiana* ist allerdings nur $\alpha 10$, die zentrale Helix der Dimerisierungsdomäne, essentiell.

Anschließend sollten Substitutionen innerhalb der $\alpha 10$ -Helix zur Identifizierung einzelner, essenzieller As führen. Zum einen wurden As mit großen Seitenketten zu Alanin substituiert (XopQ_Y333A, XopQ_N340A, K343A), zum anderen wurden As zu negativ geladenen oder Indol-haltigen As ausgetauscht (XopQ_A341W, XopQ_N340D, A341D, XopQ_G344E, L345E, XopQ_A341E, G344E, L345E, G348E, XopQ_A341E, G344E, L345E). Überraschenderweise lösten alle Derivate nach transientscher Expression in *N. tabacum* und *N. benthamiana* die gleichen Reaktionen wie XopQ aus. Die Kombination von fünf Punktmutationen in $\alpha 10$ und der dahinterliegenden *loop*-Region (XopQ_ΔR335, A341W, N352G, L353D, I354Q, durch einen Polymerase-Fehler generiert) führte dagegen zum Verlust der HR-induzierenden Aktivität von XopQ in *N. tabacum*. Derivate mit weniger Punktmutationen an identischen Positionen (XopQ_ΔR335, XopQ_R335A, XopQ_A341W, N352G, L353D, I354Q) lösten hingegen noch eine HR aus.

Für alle 33 GFP-Epitop-markierten XopQ-Derivate wurde nach transientscher Expression in *N. benthamiana* ein spezifisches Signal im Immunoblot detektiert (Abbildung 19A). Obwohl die Signalintensitäten variierten, bestand keine Korrelation zur Kapazität der XopQ-Derivate Pflanzenreaktionen auszulösen.

Da die HR, die durch die meisten Derivate in *N. tabacum* induziert wird, den Nachweis der Proteinsynthese *in planta* erschwerte, wurde in *N. tabacum* lediglich die Synthese von den neun Derivaten analysiert, die keine HR induzierten. Spezifische Signale für die neun untersuchten Fusionsproteine wurden detektiert (Abbildung 19B). Sowohl in *N. benthamiana* als auch in *N. tabacum* wurden neben den erwarteten Signalen (z. B. 75 kDa für XopQ) weitere spezifische Signale geringerer Größe detektiert (Abbildung 19).

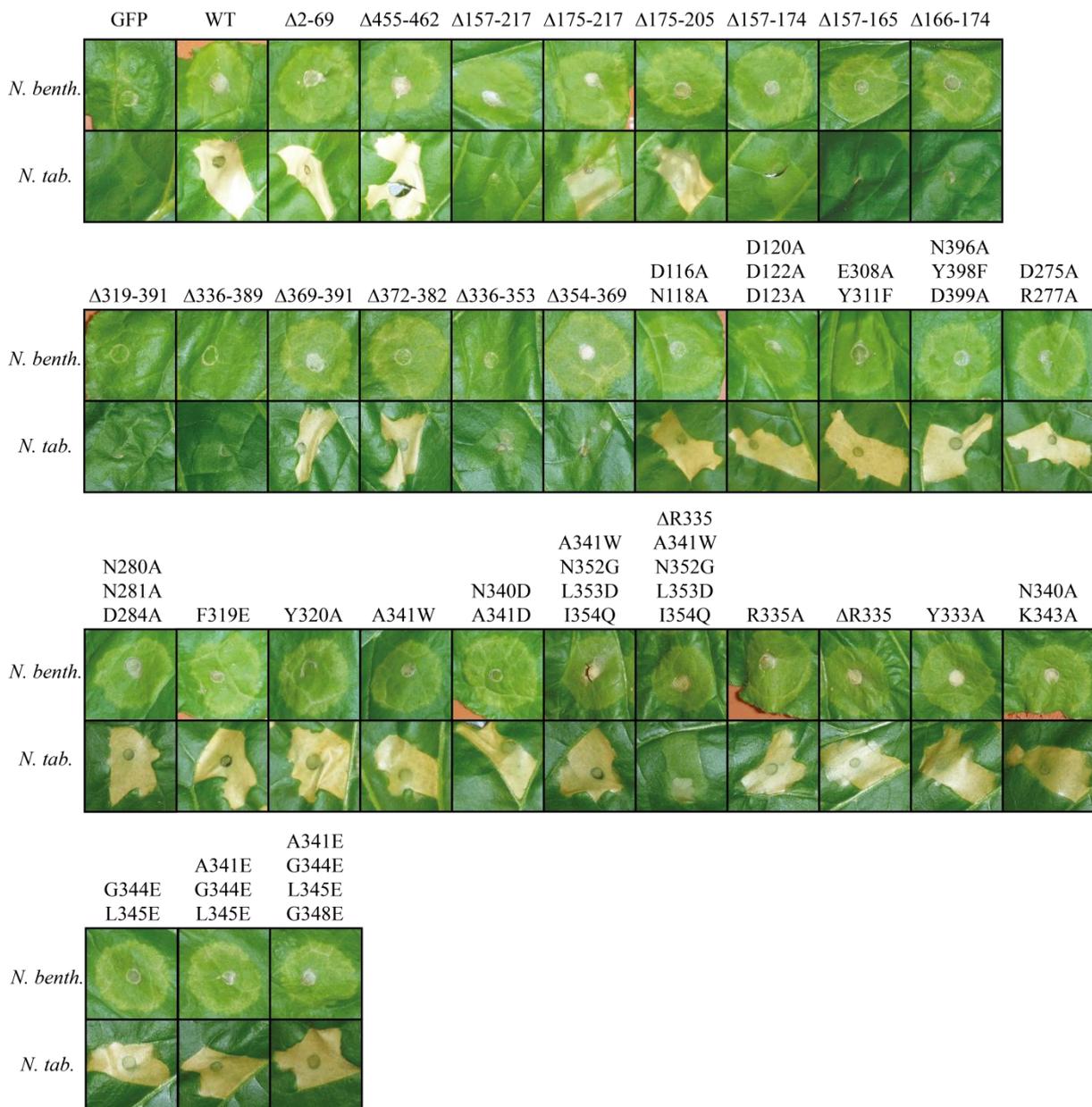


Abbildung 18. Identifizierung von Domänen und Aminosäuren von XopQ, die für Pflanzenreaktionen nach transienter Synthese essenziell sind.

Agrobacterium-vermittelte transiente Expression von *gfp::c-Myc* (GFP), *xopQ::gfp* (WT) bzw. *xopQ*-Derivaten unter Kontrolle des *35S*-Promotors in *N. tabacum* (*N. tab.*) und *N. benthamiana* (*N. benth.*). Eine Inokulations-OD₆₀₀ von 0,8 wurde verwendet. Pflanzenreaktionen wurden 3 dpi (*N. tab.*) bzw. 8 dpi (*N. benth.*) vor orange-braunem Hintergrund fotografisch dokumentiert. Das Experiment wurde mindestens zweimal mit ähnlichen Resultaten reproduziert.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Mutationen im vermuteten aktiven Zentrum und Deletionen des N-terminalen Bereichs, einschließlich der 14-3-3-Bindestelle, keinen Einfluss auf die durch XopQ induzierten Pflanzenreaktionen haben. Außerdem sind die molekularen Mechanismen zur Bildung einer XopQ-induzierten Chlorose in *N. benthamiana* bzw. HR in *N. tabacum* verschieden, da verschiedene Derivate zwar noch eine Chlorose, aber keine HR mehr induzieren. Schließlich wurde eine vorhergesagte Helix in dem zentralen, nicht-kristallisierten Bereich von XopQ als essenziell für das Auslösen einer HR in *N. tabacum* und die zentrale Helix der *in vitro*-Dimerisierungsdomäne (α 10) als essenziell für das Induzieren von Reaktionen in *N. benthamiana* und *N. tabacum* identifiziert.

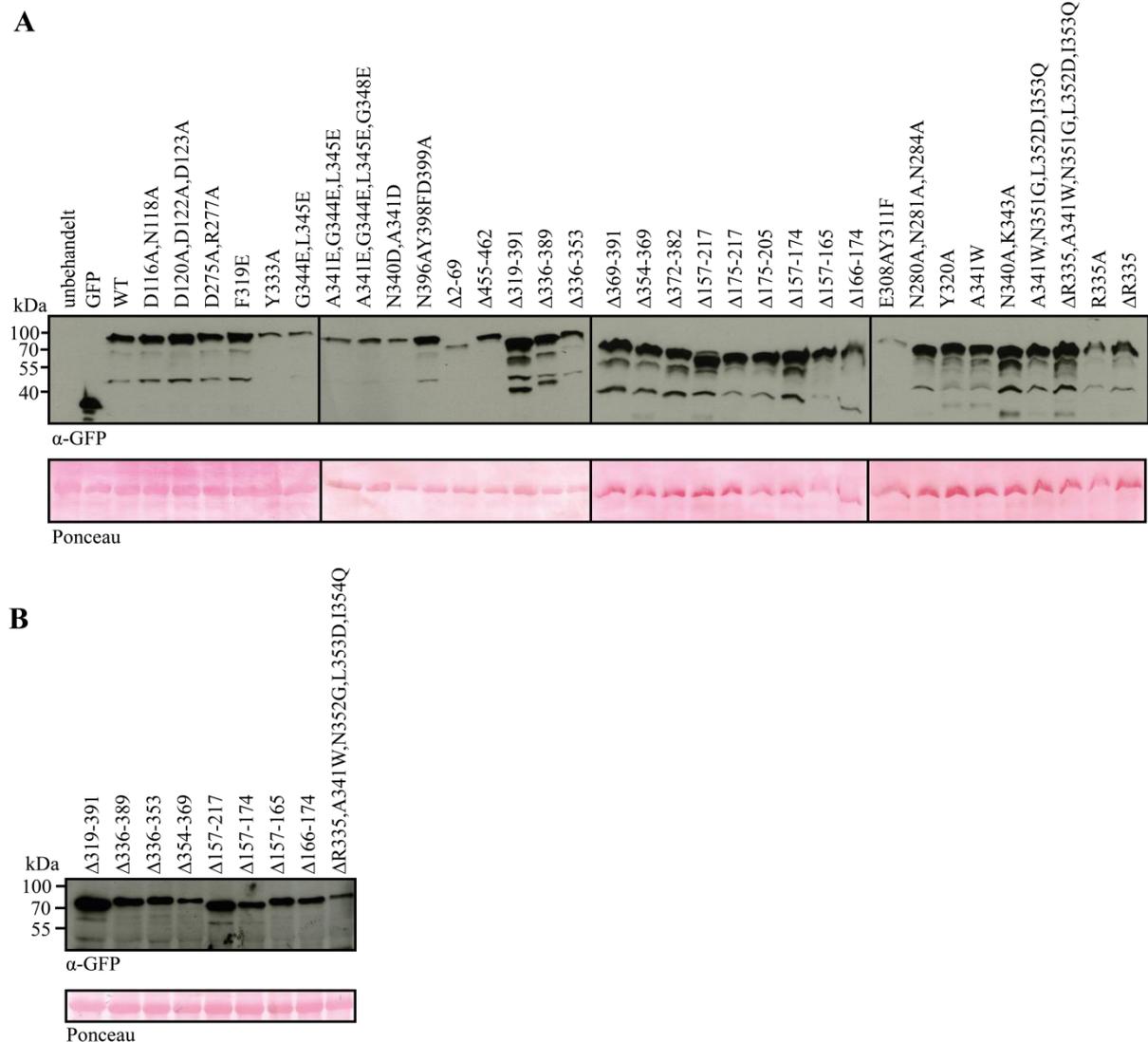


Abbildung 19. Synthese von XopQ-Derivaten in planta.

Agrobacterium-vermittelte Expression von *gfp::c-Myc* (GFP), *xopQ::gfp* (WT) oder *gfp*-fusionierten *xopQ*-Derivaten in Blättern von (A) *N. benthamiana* und (B) *N. tabacum*. Die Bakterien wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 inokuliert. Gesamtproteinextrakt des inokulierten Gewebes wurde 2 dpi geerntet und immunologisch unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers analysiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich eine Ponceau-Färbung durchgeführt.

3.3.5 Die Avirulenzaktivität von XopQ korreliert mit dessen Erkennung in *N. tabacum*

Im Folgenden sollten XopQ-Domänen und -As identifiziert werden, die für dessen Avirulenzaktivität in *N. benthamiana* wichtig sind. Dazu wurden 26 der oben beschriebenen *xopQ*-Derivate in den *Xanthomonas*-Expressionsvektor pBRM kloniert und die Plasmide in *Xcv* 85-10Δ*xopQ* konjugiert. Dies ermöglichte die Expression von *xopQ*-Derivaten unter Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors in *Xcv*.

Wie die Abbildung 20 zeigt und die Tabelle 10 zusammenfasst, wiesen 16 der untersuchten XopQ-Varianten Avirulenzaktivität auf, zehn dagegen nicht. Bis auf eine Ausnahme (XopQ_Δ2-69) wurde eine Korrelation zwischen Avirulenzaktivität in *N. benthamiana* und der Kapazität, eine HR in *N. tabacum* auszulösen festgestellt, d. h. Derivate ohne Avirulenzaktivität in *N. benthamiana* lösten keine HR in *N. tabacum* aus und umgekehrt. Das Derivat XopQ_Δ2-69 mit einer Deletion der N-terminalen

69 As, einschließlich der 14-3-3-Bindestelle, zeigte keine Avirulenzaktivität in *N. benthamiana*, induzierte nach transienter Expression jedoch eine HR in *N. tabacum*. Eine plausible Erklärung dafür ist, dass die Deletion N-terminaler As die Translokation in Pflanzenzellen verhindert. Um dennoch einen Einfluss der 14-3-3-Bindestelle auf die Avirulenzaktivität zu testen, wurde ein Serin dieses Motivs zu Alanin substituiert (XopQ_S65A). Teper *et al.* (2014) zeigten bereits, dass dieses XopQ-Derivat nicht mehr mit 14-3-3-Proteinen interagiert. XopQ_S65A vermittelte Avirulenz gegen *Xcv* in *N. benthamiana* (Abbildung 20).

Alle beschriebenen XopQ-Derivate wurden in *Xcv* als Fusionsprotein mit C-terminalem c-Myc-Epitop synthetisiert. Die Synthese aller XopQ-Varianten wurde mittels Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 21).

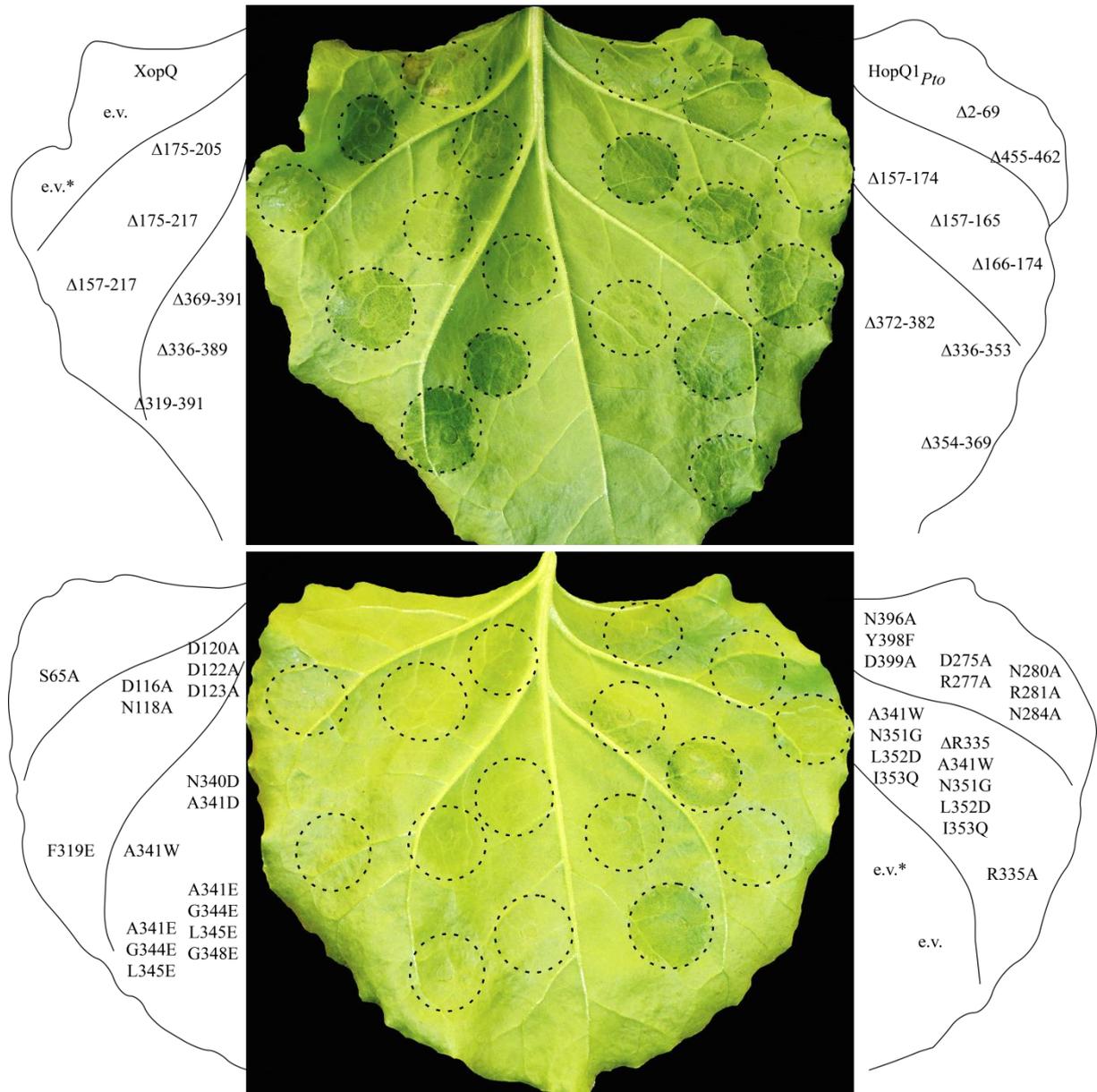


Abbildung 20. Untersuchung der Avirulenzaktivität von XopQ-Derivaten.

Xcv 85-10 (markiert mit *) und 85-10Δ*xopQ* (alle anderen Proben), die pBRM (e.v.) oder ein pBRM-Derivat zur Expression von *xopQ:c-Myc* (XopQ), *hopQ1_{Pto}:c-Myc* (HopQ1_{Pto}) oder *c-Myc*-fusionierten *xopQ*-Derivaten mit den angegebenen Deletionen bzw. Mutationen tragen, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,4 in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert. Phänotypen wurden 5 dpi dokumentiert und das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Tabelle 10. Zusammenfassung der Charakterisierung von XopQ-Derivaten und -Homologen.

	Avirulenz- aktivität in <i>N.b.</i> *	<i>A. tumefaciens</i> -vermittelte transiente Expression		
		HR in <i>N.t.</i>	Chlorose in <i>N.b.</i>	Suppression von XopL-Zelltod in <i>N.b.</i>
XopQ/HopQ1-Effektorfamilie				
XopQ _{Xcv}	+	+	+	+
XopQ _{Xcc}		+	+	
HopQ1 _{Pto}	+	+	+	+
XopQ_{Xcv}-Derivate mit großen Deletionen				
a) N- und C-terminale Regionen				
Δ2-69	-	+	+	+
Δ455-462	+	+	+	
b) Nicht-kristallisierte, zentrale Region				
Δ157-217	-	-	+	
Δ175-217	+	(+)	+	
Δ175-205	+	(+)	+	
Δ157-174	-	-	+	
Δ157-165	-	-	+	
Δ166-174	-	-	+	
c) <i>in vitro</i> -Dimerisierungsdomäne				
Δ319-391	-	-	-	
Δ336-389	-	-	(+)	
Δ369-391	+	+	+	
Δ372-382	+	+	+	
Δ336-353	-	-	-	-
Δ354-369	-	-	+	-
XopQ_{Xcv}-Derivate mit Punktmutationen				
a) 14-3-3-Bindestelle				
S65A	+			
b) Wahrscheinliches aktives Zentrum				
D116,N118A	+	+	+	
D120A,D122A,D123A	+	+	+	+
E308A,Y311F		+	+	
N396A,Y398F,D399A	+	+	+	
D275A,R277A	+	+	+	
N280A,N281A,D284A	+	+	+	
c) <i>in vitro</i> -Dimerisierungsdomäne				
F319A	+	+	+	
Y320A		+	+	
A341W	+	+	+	
N340D,A341D	+	+	+	
A341W,N352G,L353D,I354Q	+	+	+	
ΔR335,A341W,N352G,L353D,I354Q	-	-	+	
R335A		+	+	
ΔR335		+	+	
Y333A		+	+	
N340A,K343A		+	+	
G344E,L345E	+	+	+	
A341E,G344E,L345E,G348E	+	+	+	
A341E,G344E,L345E		+	+	

*, beschreibt die Fähigkeit, die 85-10ΔxopQ-Mutante hinsichtlich der in *N. benthamiana* hervorgerufenen Krankheitssymptome zu komplementieren; +, ja (wie WT-XopQ); -, nein; (+), ja, aber reduziert im Vergleich zu WT-XopQ; *N.t.*, *N. tabacum*; *N.b.*, *N. benthamiana*; grau, nicht analysiert.

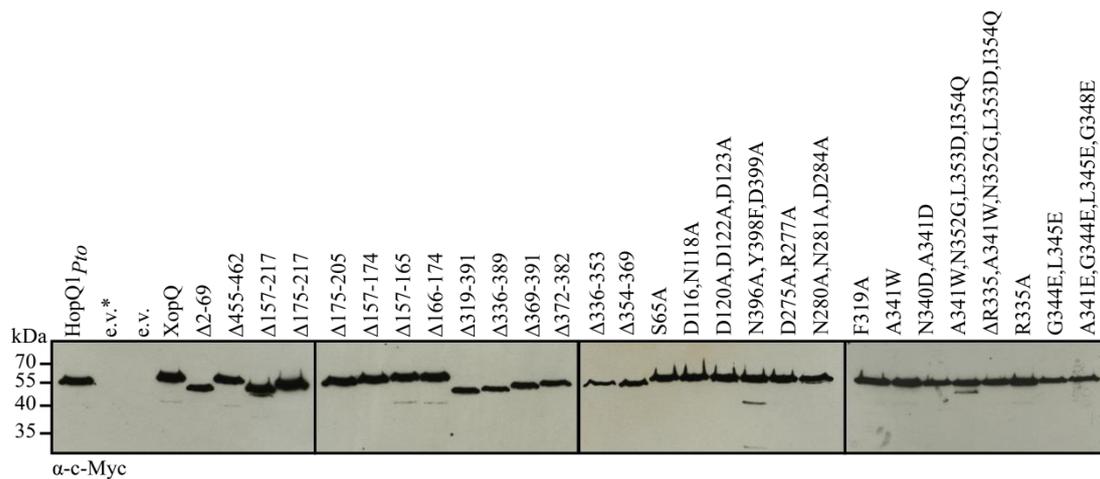


Abbildung 21. Die Synthese von XopQ, XopQ-Derivaten und HopQ1_{Pto} in *Xcv*.

Xcv 85-10 (markiert mit *) und 85-10 $\Delta xopQ$ (alle anderen Proben), die pBRM (e.v.) oder ein pBRM-Derivat zur Expression von *xopQ*:*c-Myc* (XopQ), *hopQ1*_{Pto}:*c-Myc* (HopQ1_{Pto}) oder *c-Myc*-fusionierten *xopQ*-Derivaten mit den angegebenen Deletionen bzw. Mutationen tragen, wurden verwendet. Proteinextrakte nach Wachstum auf Vollmedium wurde mittels Immunoblot und c-Myc-spezifischem Antikörper analysiert.

3.4 Der Einfluss von XopQ auf die ETI

Da kein Einfluss von XopQ auf das Wachstum von *Xcv* in suszeptiblen Wirtspflanzen festgestellt wurde (siehe Abbildung 11A, B), wurde getestet, ob XopQ PTI- oder ETI-Reaktionen zum Vorteil von *Xcv* beeinflussen könnte.

3.4.1 XopQ beeinflusst die ETI in *N. benthamiana*

Um eine mögliche ETI-supprimierende Aktivität von XopQ zu untersuchen, wurde *xopQ* und ein weiterer *Xcv*-T3E mittels *A. tumefaciens* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Dazu wurden die *A. tumefaciens*-Stämme, die deren transiente Expression vermitteln, vor der Inokulation im Verhältnis 1:2 gemischt, wobei jeweils der Stamm im Überschuss vorlag, der die Expression von *xopQ* vermittelt. Zur Kontrolle wurden Stämme, die die T3E-Expression vermitteln, mit einem Stamm zur Expression von *gfp*:*c-Myc* gemischt. Da eine gewisse Variabilität der Pflanzenreaktionen nach transienter Expression von T3E auftrat, wurden bei diesem Versuch je Probe 18 Inokulationsspotts untersucht, die auf 18 verschiedene Blätter von sechs verschiedenen Pflanzen verteilt waren. Die anschließende Unterteilung der beobachteten Reaktionen (kompletter Zelltod, partieller Zelltod, kein Zelltod) ermöglichte einen statistischen Vergleich.

Wie zuvor publiziert, lösten XopJ, XopL und XopB nach etwa fünf Tagen einen kompletten oder partiellen Zelltod in *N. benthamiana* aus. Zum gleichen Zeitpunkt induzierten diese T3E bei gleichzeitiger *xopQ*-Ko-Expression signifikant weniger bzw. reduzierte Zelltodreaktionen (Abbildung 22A). Im Gegensatz zu dem XopJ-, XopL- und XopB-vermittelten Zelltod wurde keine XopQ-vermittelte Suppression des AvrBsT-induzierten Zelltods in *N. benthamiana* festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurde untersucht, ob die XopQ-vermittelte Zelltodreaktion in *N. tabacum* durch einen anderen Effektor unterdrückt werden kann. Dazu wurden 20 verschiedene T3E-Gene (alle T3E, die neben XopQ in Abschnitt 3.1 analysiert wurden) zusammen mit *xopQ* in *N. tabacum* transient ko-exprimiert. Die 20 getesteten T3E hatten keinen Einfluss auf die XopQ-vermittelte HR in *N. tabacum* (Daten nicht gezeigt).

Schließlich wurde untersucht, ob Effektoren, die selbst keinen Zelltod in *N. benthamiana* auslösen, bei Ko-Synthese mit XopQ zu einer veränderten Pflanzenreaktion führen. Die gemeinsame Synthese von XopQ und XopS in *N. benthamiana* führt zum Zelltod, wohingegen beide Effektoren einzeln keinen Zelltod auslösen (Abbildung 22A). Die Synthese aller getesteten Effektoren wurde im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 22B).

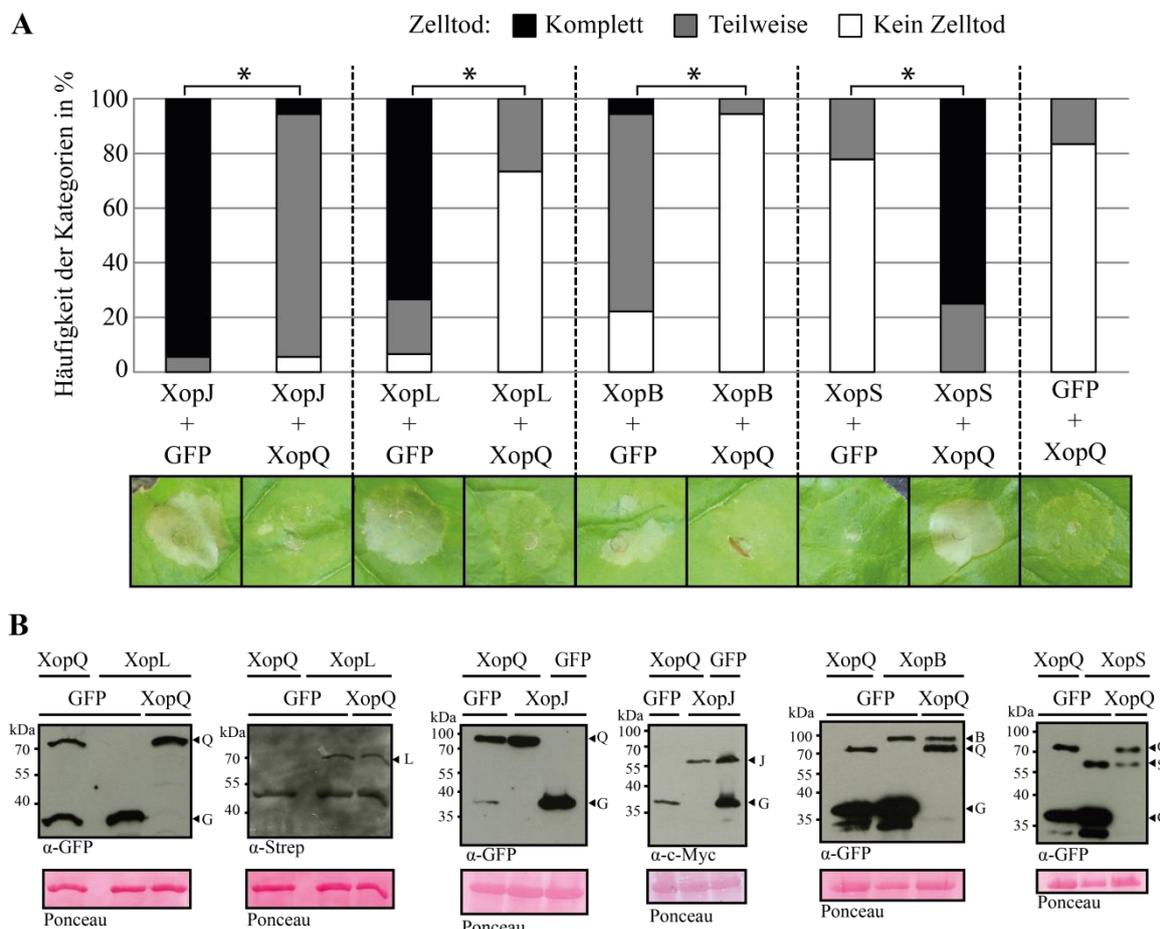


Abbildung 22. XopQ supprimiert die XopL-, XopB-, XopJ-induzierten Zelltodreaktionen in *N. benthamiana*, aber führt in Kombination mit XopS zum Zelltod.

A. tumefaciens-Stämme zur Expression von *xopQ:gfp* (XopQ), *xopJ::c-Myc* (XopJ), *xopL::strep* (XopL), *xopB::gfp* (XopB), *xopS::gfp* (XopS) oder *gfp::c-Myc* (GFP) unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 im Verhältnis 1:2 gemischt (Überschuss des *xopQ*-Expression vermittelnden Stammes) und in Blätter von *N. benthamiana* inokuliert. **A**) Pflanzenreaktionen wurden 5 dpi kategorisiert in komplett (> 90% des inokulierten Bereiches tot), teilweise (10% - 90% des inokulierten Bereiches tot) oder keinen Zelltod (< 10% des inokulierten Bereiches tot). Die Balken repräsentieren die prozentuale Häufigkeit von 18 Replikaten jeder Kategorie. Sternchen geben einen statistisch signifikanten Unterschied im „Wilcoxon signed rank test“ mit $P < 0,01$ an. Unter dem Diagramm sind Abbildungen repräsentativer Inokulationsstellen 5 dpi dargestellt. **B**) Pflanzengewebe wurde 2 dpi geerntet und mittels Immunoblot unter Verwendung von GFP-, Strep- und c-Myc-spezifischen Antikörpern analysiert. Eine Ponceau-Färbung diente zur Ladekontrolle. Die kleinen Dreiecke markieren die spezifische Signale von XopQ:GFP (Q), GFP:c-Myc (G), XopL:Strep (L), XopJ:c-Myc (J), XopB:GFP (B) und XopS:GFP (S). Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.4.2 Identifizierung von strukturellen Bereichen zur ETI-Suppression von XopQ

Der Identifizierung von XopQ als ETI-Suppressor schloss sich die Frage nach den molekularen Mechanismen dieser Aktivität an. Um zu ergründen, ob die 14-3-3-Bindestelle und die vorhergesagte Enzymaktivität essenziell für die ETI-Suppression sind, wurden die Derivate XopQ_Δ2-69 (Deletion N-terminaler As incl. 14-3-3-Bindestelle) und XopQ_D120A,D122A,D123A (Substitutionen im aktiven Zentrum) mit XopL in *N. benthamiana* ko-synthetisiert. Beide Derivate supprimierten wie XopQ den XopL-induzierten Zelltod (Abbildung 23A). Dies bedeutet, dass die enzymatische Aktivität und die Bindung an 14-3-3-Proteine nicht zur ETI-Suppression durch XopQ beitragen. Anschließend wurde untersucht, ob die Aktivität, ETI zu supprimieren, mit der HR- bzw. Chlorose-induzierenden Aktivität nach transienter Expression in *N. tabacum* bzw. *N. benthamiana* korreliert. Dazu wurden XopQ_Δ336-353 und XopQ_Δ354-369 analysiert, die keine Avirulenz von *Xcv* in *N. benthamiana* vermitteln und deren transiente Expression in *N. tabacum* keine HR mehr auslöst. Im Gegensatz zu XopQ_Δ354-369, löste die transiente Expression von XopQ_Δ336-353 in *N. benthamiana* keine Chlorose aus. Wie die Abbildung 23A zeigt, supprimierten beide XopQ-Derivate die XopL-bedingte Zelltodreaktion in *N. benthamiana* nicht.

Augenscheinlich korreliert die Zelltod-supprimierende Aktivität von XopQ mit der Avirulenzaktivität und dem Auslösen einer HR nach transienter Expression in *N. tabacum*. Gemäß dieser Annahme sollte auch HopQ1_{Pto} den XopL-vermittelten Zelltod supprimieren. Tatsächlich supprimierte auch HopQ1_{Pto} die XopL-vermittelte Zelltodreaktion ähnlich effizient wie XopQ (Abbildung 23A).

Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 10 zusammengefasst. Alle untersuchten Effektoren und Derivate waren C-terminal an ein GFP- oder Strep-Epitop fusioniert, und spezifische Signale wurden mittels Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 23B).

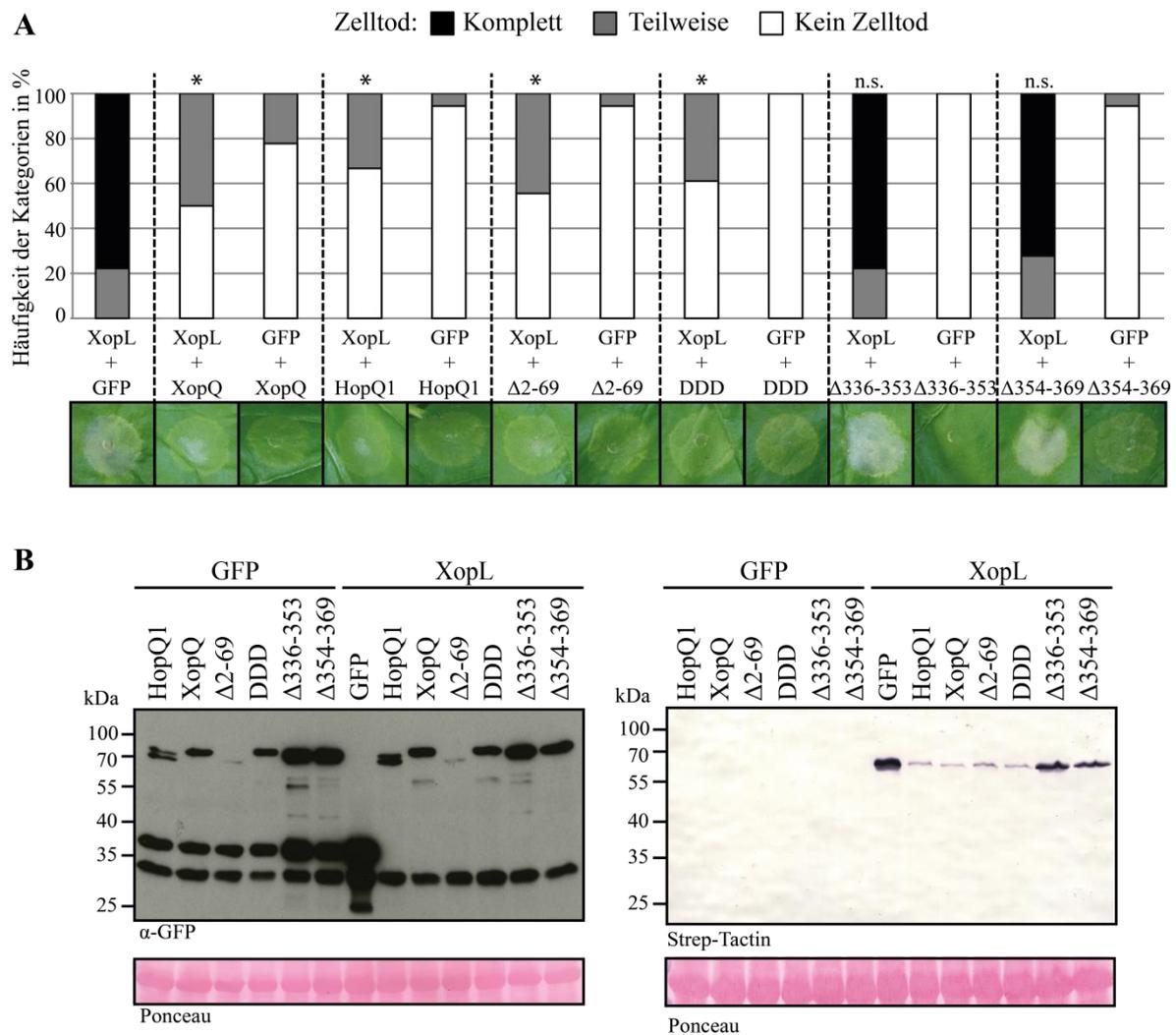


Abbildung 23. Charakterisierung der ETI-Suppression von XopQ-Derivaten und HopQ1_{Pro}.

A. tumefaciens-Stämme zur Expression von *xopL:strep* (XopL), *gfp:c-Myc* (GFP), *xopQ:gfp* (XopQ), *hopQ1_{Pro}:gfp* (HopQ1), *xopQΔ2-69:gfp* (Δ 2-69), *xopQ_{D120A,D122A,D123A}:gfp* (DDD), *xopQ_{Δ336-353}:gfp* (Δ 336-353) oder *xopQ_{Δ354-369}:gfp* (Δ 354-369) wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 im Verhältnis 1:2 gemischt (Überschuss des Stammes zur Expression von XopQ, HopQ1 bzw. XopQ-Derivaten) und in Blätter von *N. benthamiana* inokuliert. **A**) Pflanzenreaktionen wurden 6 dpi kategorisiert in komplett (> 90% des inokulierten Bereiches tot), teilweise (10% - 90% des inokulierten Bereiches tot) oder kein Zelltod (< 10% des inokulierten Bereiches tot). Die Balken repräsentieren die prozentuale Häufigkeit jeder Kategorie von 18 Replikaten. Sternchen geben einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu XopL+GFP im „Wilcoxon signed rank test“ mit $P < 0,01$ an. Unter dem Diagramm sind Abbildungen repräsentativer Inokulationsstellen 6 dpi dargestellt. **B**) Pflanzengewebe wurde 2 dpi geerntet und mittels Immunoblot unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers bzw. mittels Strep-Tactin analysiert. Eine Ponceaufärbung diente der Ladekontrolle. Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

3.4.3 XopV und XopE1 beeinflussen die Phosphorylierung von MAP-Kinasen *in planta*

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob XopQ auch PTI-supprimierende Aktivität hat. Dies wurde zunächst in Kooperation mit L. Eschen-Lippold und J. Lee (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) in *A. thaliana*-Protoplasten untersucht. Dazu wurde analysiert, ob XopQ die Aktivität des PAMP-induzierbaren *AtNHL10* („NDR1/HIN1-LIKE 10“)-Promotors hemmt, dessen Expression in *A. thaliana* durch *flg22*-Perzeption induziert wird (Zipfel *et al.*, 2004). Es wurde festgestellt, dass XopQ die *NHL10*-Promotoraktivität nicht hemmt, sondern fördert. Diese Induktion war unabhängig von der *flg22*-Präsenz und wurde auch nach Synthese von HopQ1_{Pro} und

XopQ_D120A,D122A,D123A in den Protoplasten gemessen (Daten von L. Eschen-Lippold und J. Lee; nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass eine Erkennung von XopQ und HopQ1_{pro} in *A. thaliana* PTI-assoziierte Reaktionen induziert und dass das *A. thaliana*-basierte System ungeeignet ist, um eine mögliche PTI-Suppression durch XopQ zu studieren.

Um dennoch einen möglichen Einfluss von XopQ auf PTI-Reaktionen zu untersuchen, wurde getestet, ob die Phosphorylierung bestimmter MAP-Kinasen nach flg22-Infiltration beeinflusst war. In *N. benthamiana* und *N. tabacum* spielen zwei MAP-Kinasen eine zentrale Rolle in der Pflanzenabwehr: SIPK („Salicylic acid-induced protein kinase“), das Homolog zu MPK6 von *A. thaliana*, und WIPK („wound-induced protein kinase“), das Homolog zu MPK3 von *A. thaliana* (Meng und Zhang, 2013). Die Aktivität dieser MAP-Kinasen wurde immunologisch mit einem Antikörper untersucht, der spezifisch an deren phosphorylierte Form bindet. Wie schematisch in der Abbildung 24A dargestellt ist, wurden *N. benthamiana* Blätter mit *A. tumefaciens*-Stämmen zur transienten Expression von verschiedenen Effektoren inokuliert. Zur Aktivierung, also Phosphorylierung von SIPK und WIPK, wurde zwei Tage später eine 100 nM flg22-Lösung infiltriert, Proteinproben nach 10 min geerntet und immunologisch untersucht. Ohne flg22-Behandlung wurden keine spezifischen Signale der phosphorylierten MAP-Kinasen detektiert (Abbildung 24B). Im Vergleich zu der transienten Expression von *gfp::c-Myc* waren die Signale der phosphorylierten MAP-Kinasen SIPK und WIPK in unabhängigen Experimenten nicht oder nur geringfügig reduziert, wenn *xopQ::gfp* oder *hopQ1::gfp* transient exprimiert wurden (Abbildung 24B). Demnach wurde kein deutlicher Einfluss von XopQ oder HopQ1 auf die Aktivierung von SIPK und WIPK nach PAMP-Zugabe festgestellt.

Obwohl in diesem Experiment kein Einfluss von XopQ auf die Aktivierung von MAPK festgestellt wurde, erschien der Ansatz dennoch als vielversprechend, um einen Einfluss von Effektoren auf die Aktivierung von MAP-Kinasen zu untersuchen. Deshalb wurden 17 weitere Effektoren von *Xcv* auf gleiche Weise getestet. In vier unabhängigen Experimenten wurde ein hemmender Einfluss von XopV und XopE1 auf die Phosphorylierung von SIPK und WIPK nach flg22-Behandlung festgestellt. Wie die Abbildung 24C repräsentativ zeigt, waren die Signalintensitäten der phosphorylierten SIPK und WIPK nach flg22-Behandlung deutlich reduziert, wenn XopV:GFP (60 kDa) oder XopE1:GFP (68 kDa) in *N. benthamiana* synthetisiert wurden. Die Ponceau-Färbung zeigte, dass sich annähernd gleiche Proteinmengen in allen Spuren befanden. Mittels GFP-spezifischem Antikörper wurden spezifische Signale der Epitop-markierten Effektoren detektiert. Für die Effektoren AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3, XopB, XopC, XopE2, XopG, XopH, XopI, XopK, XopL, XopM, XopO, XopP und XopS wurde kein deutlicher, reproduzierbarer Einfluss auf die Aktivierung von SIPK und WIPK festgestellt (Daten nicht gezeigt).

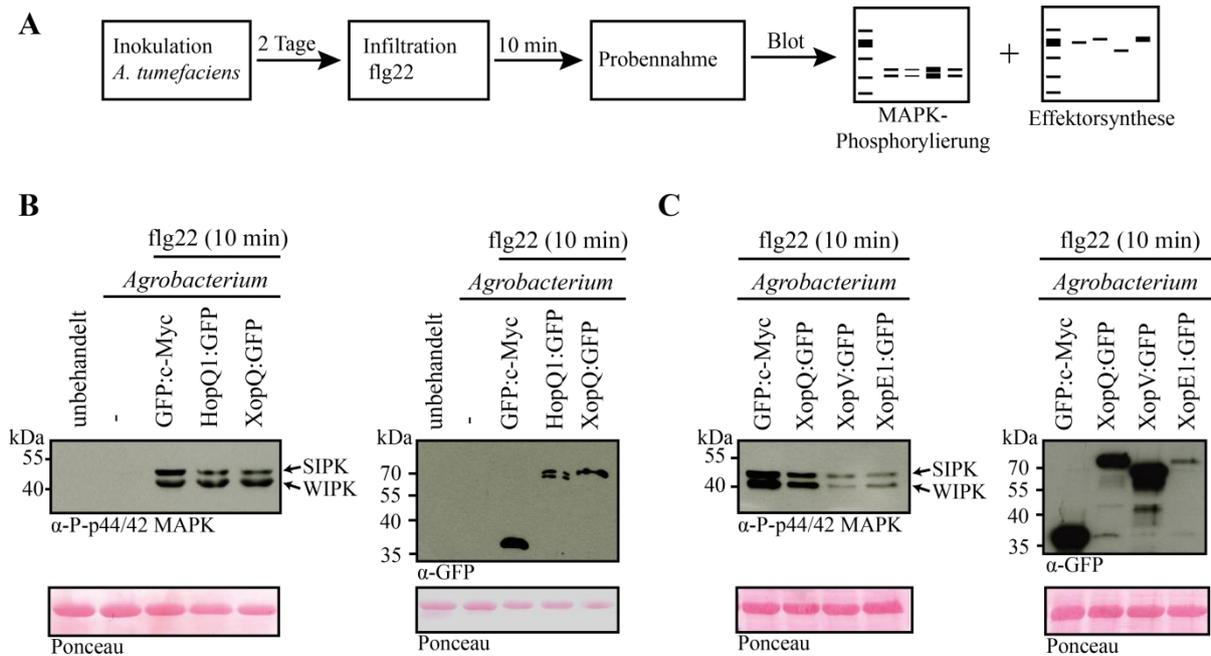


Abbildung 24. Der Einfluss von Effektoren auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen in *N. benthamiana*.

A) Schematische Darstellung des Experiments. *A. tumefaciens*-Stämme, die die *in planta*-Synthese der angegebenen GFP-T3E-Fusionsproteine, GFP:c-Myc oder von keinem Protein (-) vermitteln, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 in *N. benthamiana* Blätter inokuliert. 2 dpi wurde zusätzlich eine 100 nM flg22-Lösung infiltriert und nach 10 min wurden Proteinproben geerntet, die immunologisch charakterisiert wurden. Ein spezifischer Antikörper zur Detektion aktivierter/phosphorylierter SIPK und WIPK (α -P-p44/42 MAPK) wurde verwendet. Außerdem wurden die Nitrozellulosemembranen mit Ponceau gefärbt. Untersucht wurde der Einfluss von (B) XopQ_{Xcp} und HopQ_{Pro} sowie (C) XopV und XopE1 auf die Aktivierung der MAP-Kinasen nach flg22-Infiltration. Die Ergebnisse wurden dreimal reproduziert.

3.4.4 XopQ interagiert mit XopQ und XopS *in planta*

Eine Erkenntnis aus der Kristallstruktur von XopQ war, dass XopQ *in vitro* Dimere bildet (Abschnitt 3.3). Außerdem wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation von A. Singer (Universität Toronto, Kanada) die Di- und Oligomerisierung von XopQ *in vitro* nachgewiesen (A. Singer, persönliche Mitteilung), sodass vermutet wurde, dass XopQ-Proteine auch *in planta* interagieren. Dies wurde mittels „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC) untersucht, wobei Proteine entweder mit dem N-terminalen Teil (YFP_N) oder dem C-terminalen Teil (YFP_C) des gelbfluoreszierenden Proteins (YFP, „yellow fluorescent protein“) fusioniert werden. Bildet sich infolge einer direkten oder indirekten Interaktion beider Fusionsproteine ein Komplex aus YFP_N und YFP_C, emittiert dieser nach Anregung gelbes Licht, das fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden kann. Die proteinkodierenden Sequenzen von XopQ wurden in die binären Vektoren pGGA27 (zur C-terminalen Fusion von 3×HA:YFP_C) und pGGA29 (zur C-terminalen Fusion von 4×c-Myc:YFP_N) kloniert und Plasmide anschließend in *A. tumefaciens* elektroporiert.

Die Ko-Synthese von XopQ:GFP und XopS:GFP in *N. benthamiana* löst eine Zelltodreaktion aus, wohingegen die einzelnen Effektoren eine Chlorose bzw. keine sichtbare Reaktion auslösen (siehe Abschnitt 3.4.1). Dies führte zu der Hypothese, dass XopQ und XopS die Pflanzenzelle in ähnlicher Weise manipulieren und möglicherweise einen Komplex *in planta* bilden, eventuell auch einen Komplex mit einem pflanzlichen 14-3-3-Protein. Daher wurde zunächst bioinformatisch nach einer

14-3-3-Bindestelle in XopS gesucht. Mittels „ELM“ (Dinkel *et al.*, 2013) wurde ein 14-3-3-Bindemotiv in der XopS-Sequenz identifiziert, das die As 163 - 169 (Sequenz: RIERTLQ) umfasst. Für BiFC-Studien mit XopS wurde ein *A. tumefaciens* Stamm verwendet, der das Plasmid pGGA27_xopS (O. Müller und U. Bonas unpubliziert) trägt. Als Negativkontrolle diente die Synthese von AvrBs1:YFP_C, von diesem Protein wurde keine Komplexbildung mit XopQ:YFP_N erwartet.

Zwei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter transients Ko-Synthese der entsprechenden YFP_C- und YFP_N-Fusionen, wurde die YFP-Fluoreszenz mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) untersucht. Fluoreszenz wurde detektiert, wenn XopQ:YFP_N in Kombination mit XopQ:YFP_C bzw. XopS:YFP_C synthetisiert wurde, allerdings nicht in Kombination mit AvrBs1:YFP_C (Abbildung 25). Fluoreszenzsignale nach Ko-Synthese von XopQ:YFP_N und XopQ:YFP_C waren vornehmlich im Zytoplasma, wohingegen Fluoreszenzsignale nach Ko-Synthese von XopQ:YFP_N und XopS:YFP_C auch deutlich im Kern lokalisiert waren (Abbildung 25A). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass XopS:GFP (Schulze, 2013) und XopQ:GFP (P. John, U. Bonas, unpubliziert) nach transients Synthese in *N. benthamiana* in Zellkern und Zytoplasma lokalisieren. Spezifische Signale aller verwendeten Fusionsproteine wurden mit erwarteter Größe, aber auch Degradationsprodukte, immunologisch detektiert (Abbildung 25B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass XopQ-Proteine *in planta* miteinander und mit XopS-Proteinen interagieren. Aus zeitlichen Gründen wurden die Interaktionsstudien mit XopQ und/oder XopS bisher nicht weiter analysiert, z. B. durch andere Methoden oder die Fusion von YFP_N an XopS.

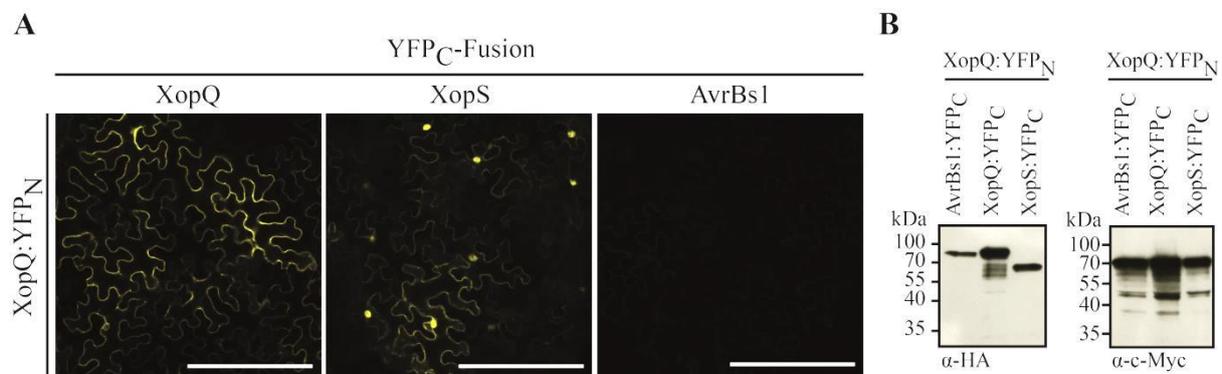


Abbildung 25. XopQ interagiert mit XopQ und XopS *in planta*.

A) BiFC-Analyse zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion in Blätter von *N. benthamiana*. *A. tumefaciens*-Stämme, die die *in planta* Synthese von XopQ:YFP_N, XopQ:YFP_C, XopS:YFP_C und AvrBs1:YFP_C vermitteln, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 1:1 gemischt und inokuliert. Die YFP-Fluoreszenz wurde 2 dpi untersucht. Maßstabsbalken: 200 µm. B) Die Synthese von XopQ:YFP_N, das zusätzlich c-Myc-Epitop-markiert war, wurde immunologisch mittels c-Myc-spezifischem Antikörper detektiert. Zur Detektion von YFP_C-Fusionsproteinen, die zusätzlich HA-Epitop-markiert waren, wurde ein HA-spezifischer Antikörper verwendet. Die Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

3.5 Phytohormone beeinflussen die Virulenz von *Xcv*

Phytohormone sind Signalmoleküle, die u. a. die pflanzliche Entwicklung, Wachstum, Reproduktion und Abwehrprozesse regulieren (Pieterse *et al.*, 2009). Neben den „klassischen Abwehrhormonen“ Ethylen, Jasmonat und Salicylsäure spielen auch Hormone wie Abscisinsäure, Gibberellinsäuren, Cytokinine und Brassinosteroide entscheidende Rollen bei pflanzlichen Resistenz- und Abwehrmechanismen (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Denancé *et al.*, 2013). Obwohl es naheliegend erscheint, dass Effektoren hormonelle Signalwege zum Vorteil des Bakteriums modifizieren, sind kaum *Xcv*-Effektoren mit dieser Funktion bekannt (siehe auch Abschnitt 1.4). In diesem Abschnitt sollte zunächst der Einfluss verschiedener Pflanzenhormone auf die Virulenz von *Xcv* untersucht werden, um mögliche Ansatzpunkte für von *Xcv*-Effektoren manipulierte Pflanzenprozesse zu identifizieren.

3.5.1 Ein veränderter Hormonhaushalt in Tomatenmutanten kann die Virulenz von *Xcv* beeinflussen

Um den möglichen Einfluss von verschiedenen Pflanzenhormonen auf die Virulenz von *Xcv* zu untersuchen, wurden Tomatenlinien verwendet, die infolge von Mutationen einen veränderten Hormonhaushalt im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Linie haben. Für diesen Versuch wurden die Pflanzenlinien „Sitiens“ (SIT, verminderte ABA-Biosynthese (Harrison *et al.*, 2011)), „Never Ripe“ (NR, gestörte ET-Perzeption (Lanahan *et al.*, 1994)) und „Procera“ (PRO, konstitutive GA-Antwort (Carrera *et al.*, 2012)) verwendet.

Die Mutationen hatten zum Teil erhebliche Folgen für die Morphologie und das Wachstum der Pflanzen. So zeichneten sich Pflanzen der Linie SIT durch eine deutlich verringerte Wuchshöhe und Blattgröße aus, wohingegen PRO-Pflanzen größere Blätter und Wuchshöhe aufwiesen als WT-Pflanzen. Abbildung 26 zeigt das Erscheinungsbild der verwendeten Pflanzen fünf Wochen nach der Aussaat.



Abbildung 26. Verwendete Tomatenlinien im Vergleich.

Abgebildet sind Pflanzen der Tomatenlinien „Sitiens“, „Never Ripe“ und „Procera“, die infolge von Mutationen einen veränderten Hormonhaushalt im Vergleich zu deren Ausgangslinien „Rheinlands Ruhm“ bzw. „Ailsa Craig“ haben. Alle Tomatenpflanzen wuchsen unter identischen Bedingungen und waren fünf Wochen alt.

In Tomatenmutanten wurden Inokulationsversuche mit verschiedenen *Xcv*-Stämmen durchgeführt. Dabei wurde *Xcv* 85-10, 85-10 Δ *hrcN* und 85-10 Δ *xopN* verwendet. 85-10 Δ *xopN* zeichnet sich durch die Deletion der proteinkodierenden Sequenz des T3E *xopN* aus, die mittels Suizidplasmid (pOGG2_*xopN*_del) eingeführt wurde. XopN trägt zum *Xcv*-Wachstum und zur Symptombildung in suszeptiblen Tomatenpflanzen bei (Kim *et al.*, 2009). Die Inokulation erfolgte mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen und die pflanzlichen Reaktionen wurden zwei Wochen lang beobachtet. Alle verwendeten Pflanzenlinien zeigten Krankheitssymptome, waren also suszeptibel gegenüber *Xcv*. Im Vergleich zu der WT-Linie „Ailsa Craig“ zeigte die Linie PRO deutlich verzögerte und schwächere Symptome nach *Xcv*-Inokulation, wohingegen kein deutlicher Unterschied bei der Linie NR festgestellt wurde (Abbildung 27A). SIT reagierte mit deutlich schwächeren und langsameren Symptomen auf die Infektion mit 85-10 und 85-10 Δ *xopN*. Während bei der korrespondierenden WT-Linie „Rheinlands Ruhm“ bereits 9 dpi deutliche Symptome nach *Xcv*-Infektion zu sehen waren, war dies bei SIT erst etwa 12 Tage nach 85-10-Inokulation der Fall (Abbildung 27B). Dabei ist zu beachten, dass die Infiltration der Bakterien suspension in SIT schwierig war und sich die Suspension hauptsächlich innerhalb des Spritzenaufsatzpunktes ausbreitete. Die verminderte ABA-Biosynthese von SIT hatte also einen beachtlichen positiven Einfluss auf die Pflanzenabwehr bzw. einen negativen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv*. Gleichzeitig erwies sich SIT als ungeeignet für weiterführende Experimente, sodass im Folgenden ABA auf Blätter durch Sprühen appliziert wurde, um die ABA-Konzentration *in planta* zu erhöhen (Abschnitt 3.5.2).

Wie erwartet führte die Inokulation der *xopN*- und *hrcN*-defizienten Stämme zu reduzierten bzw. keinen Symptomen. Bei abnehmenden Bakterienkonzentrationen waren Symptome schwächer bzw. verzögert (Abbildung 27).

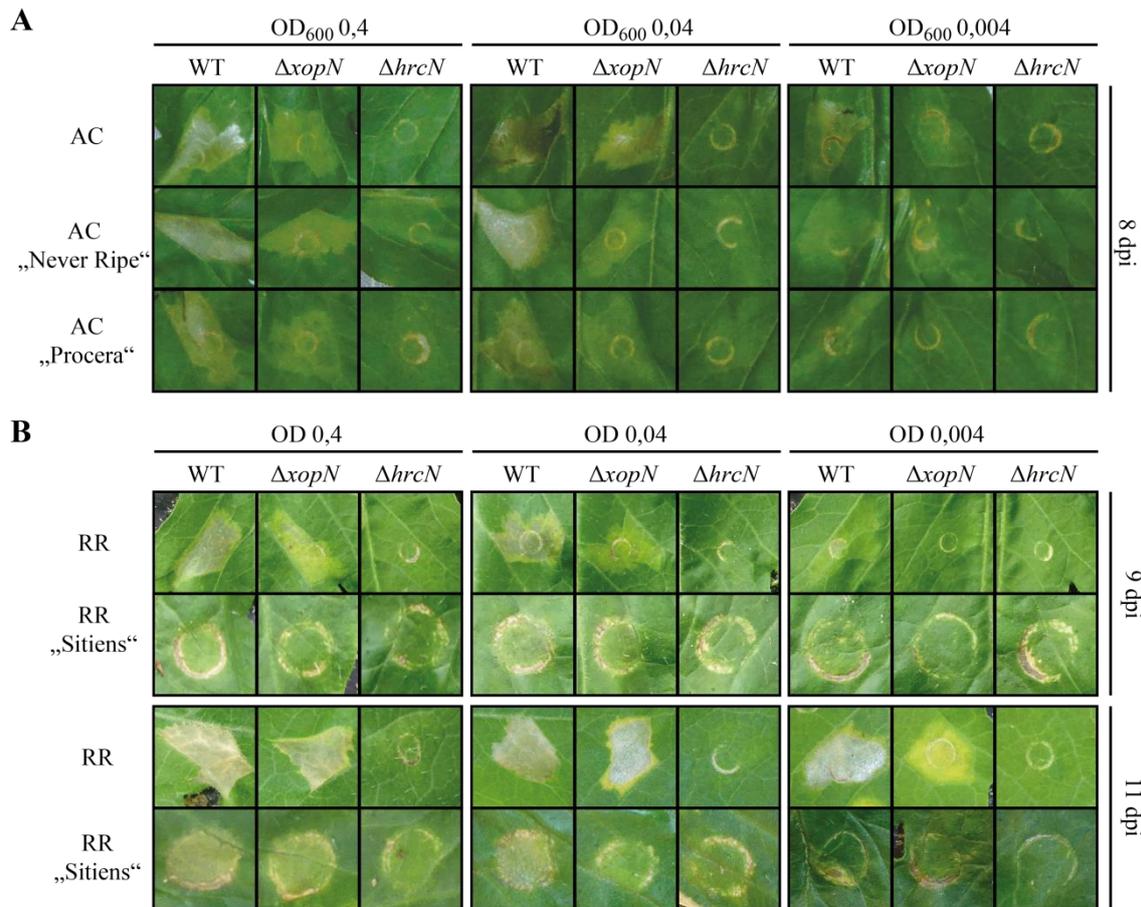


Abbildung 27. Phytohormone beeinflussen die Virulenz von *Xcv* in Tomate.

Xcv 85-10 (WT), 85-10 $\Delta xopN$ ($\Delta xopN$) und 85-10 $\Delta hrcN$ ($\Delta hrcN$) wurden mit unterschiedlichen Zelldichten (OD₆₀₀ 0,004 [5×10^6 KBE ml⁻¹] bis OD₆₀₀ 0,4 [5×10^8 KBE ml⁻¹]) in die Blattunterseiten von Tomatenpflanzen inokuliert. Pflanzenreaktionen der Linien (A) „Procera“, „Never Ripe“ und „Ailsa Craig“ (AC) 8 dpi und (B) „Sitiens“ sowie „Rheinlands Ruhm“ (RR) 9 und 11 dpi sind dargestellt. Die gezeigten Blattbereiche (Blattoberseite) der „Sitiens“-Linien ist größer als bei den anderen Linien, da der *Xcv*-Infizierte Bereich dieser Linie kleiner war. Die Experimente wurden mindestens zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.5.2 Abscisinsäure fördert die Virulenz von *Xcv* in Tomate

Bei der Infektion der nahezu ABA-defizienten Tomatenlinie SIT waren die von *Xcv*-verursachten Symptome deutlich reduziert (Abschnitt 3.5.1). Dies führte zu der Hypothese, dass ein erhöhter pflanzlicher ABA-Gehalt einen positiven Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* in Tomate hat. Dies wurde experimentell überprüft, indem Blätter von Versuchspflanzen der suszeptiblen WT-Linie Moneymaker vor *Xcv*-Inokulation dreimal mit einer 100 μ M ABA-Suspension (gelöst in 0,2% EtOH) besprüht wurden. Zur Kontrolle wurden Blätter von Vergleichspflanzen mit einer Mock-Lösung (0,2% Ethanol) 48, 24 und 4 Stunden vor der *Xcv*-Inokulation besprüht (Abbildung 28A).

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 $\Delta avrBs2$ und 85-10 $\Delta hrcN$ wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen inokuliert. 85-10 $\Delta avrBs2$ ist weniger virulent als 85-10 (Mudgett *et al.*, 2000) und wurde verwendet, um auch geringe Einflüsse auf die Virulenz zu identifizieren. Die Applikation der Mock-Lösung hatte keinen Einfluss auf die beobachteten Symptome: die Inokulation des WT löste deutliche stärkere Krankheitssymptome aus als die Inokulation von 85-10 $\Delta avrBs2$, während

Weiterhin wurde untersucht, ob der positive Einfluss von ABA auf die Symptome in Tomate mit einem erhöhten *in planta*-Wachstum von *Xcv* einhergeht. Dazu wurden Pflanzen, wie oben beschrieben, mit einer ABA- oder Mock-Lösung behandelt, eine niedrigkonzentrierte Bakteriensuspension inokuliert und die bakterielle Zellzahl nach null, drei und sechs Tagen ermittelt. Die Sprühapplikation von ABA erhöhte das Wachstum von *Xcv* in Tomate signifikant, hatte aber keinen Einfluss auf das *in planta*-Wachstum von *Xcv* in suszeptiblen Paprikapflanzen (Abbildung 28C).

3.6 Könnte XopL ABA-assoziierte Pflanzenprozesse beeinflussen?

Da ABA die Virulenz von *Xcv* in Tomatenpflanzen positiv beeinflusst (s. Abschnitt 3.5.2), wurde vermutet, dass T3E von *Xcv* den ABA-Stoffwechsel oder ABA-assoziierte Prozesse modulieren. Um T3E-Kandidaten zu identifizieren, die diese Prozesse beeinflussen könnten, wurde zunächst nach Parallelen in anderen Modellorganismen gesucht. Es ist bekannt, dass *Pto* DC3000 den pflanzlichen ABA-Signalweg durch den Effektor AvrPtoB positiv beeinflusst, was zur Virulenz von *Pto* beiträgt (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). AvrPtoB, eine E3-Ubiquitin-Ligase (Janjusevic *et al.*, 2006), ist zwar nicht in *Xanthomonas* spp. konserviert, diese besitzen jedoch einen anderen T3E mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, XopL (Singer *et al.*, 2013). O. Müller analysierte mittels Microarray die Abundanz pflanzlicher Transkripte nach transienter Expression von *xopL* in Tomatenpflanzen und stellte eine Transkriptakkumulation für Gene fest, deren Genprodukte dem ABA-Stoffwechselweg bzw. dem ABA-Signalweg zuzuordnen sind (O. Müller, U. Bonas, unpubliziert). Im Gegensatz dazu führte die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Expression von *xopQ*, *xopS*, *xopI*, *xopB* und *xopG* nicht zur Akkumulation von Transkripten, die ABA-assoziierte Proteine kodieren (O. Müller, U. Bonas, unpubliziert).

Aufgrund dieser Beobachtungen erschien XopL ein geeigneter T3E-Kandidat für die Modulation von ABA-assoziierten Prozessen zu sein. XopL besteht aus einer N-terminalen LRR-Domäne, die vermutlich zur Interaktion mit anderen Proteinen dient und einer C-terminalen Domäne mit E3-Ligase-Aktivität (Singer *et al.*, 2013). Um mögliche pflanzliche Zielproteine von XopL zu identifizieren, wurde eine Paprika-cDNA-Bibliothek mittels Hefe-Di-Hybrid-System („yeast-2-hybrid“, Y2H) gesichtet.

3.6.1 Die Identifizierung zahlreicher möglicher XopL-Interaktoren mittels Hefe-Di-Hybrid-System

Die E3-Ligase-Aktivität von XopL lässt vermuten, dass XopL nur kurzzeitig einen Komplex mit Substraten bildet, der nach Ubiquitinierung des Zielproteins zerfällt. Für die Suche nach pflanzlichen Interaktoren könnte sich daher ein XopL-Derivat mit mutierter E3-Ligase-Domäne als geeigneter erweisen, sodass neben XopL auch das XopL-Derivat XopL_H584A,L585A,G586E (im Folgenden XopLm genannt) als Köderprotein verwendet wurde (Singer *et al.*, 2013). Zunächst wurde die Synthese und eine mögliche Reporter-gen-Autoaktivierungsaktivität der Beuteproteine (XopL oder XopLm, fusioniert an die Gal4-DNA-Bindedomäne, BD) in den Hefestämmen PJ69-4a und MAV103 untersucht. Spezifische Signale beider Beuteproteine wurden immunologisch in Hefe-Proteinextrakten detektiert, und beide zeigten keine Autoaktivierung der Reportergene (exemplarisch gezeigt für PJ69-4a, Abbildung 29).

Um die Anzahl der getesteten Hefetransformanten zu erhöhen, wurden je Köderprotein zwei verschiedene cDNA-Sichtungen durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Hefestämme mit unterschiedlichen Reportergenen verwendet. Insgesamt wurden also vier Sichtungen einer Paprika-cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System durchgeführt, bei denen insgesamt $2,2 \times 10^7$ Hefetransformanten getestet wurden (Tabelle 11). Damit wurde die cDNA-Bibliothek, die ca. $7,5 \times 10^6$ verschiedene cDNAs enthält (Invitrogen, Deutschland), mehrfach abgedeckt.

246 Hefekolonien wuchsen unter selektiven Bedingungen. Die Plasmide dieser Hefezellen wurden isoliert und erneut auf Vermittlung spezifischer Interaktion mit XopL bzw. XopLm in Hefezellen untersucht. 49 der 246 getesteten Beuteplasmide vermittelten eine spezifische Reporter-genaktivierung in Anwesenheit der Köderplasmide zur Synthese von BD+XopL und/oder BD+XopLm. Die cDNA-„Inserts“ der 49 spezifisch mit XopL und/oder XopLm interagierenden Kandidaten wurden sequenziert. Sequenzvergleiche mittels NCBI-BLAST (Altschul *et al.*, 1990) zeigten Homologien zu bekannten Sequenzen aus verschiedenen Pflanzen, zusammengefasst in Tabelle 12. Es ist zu bemerken, dass etwa 100 der isolierten 246 Hefekolonien im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Gruber hinsichtlich Spezifität und inserierter cDNA-Sequenz charakterisiert wurden.

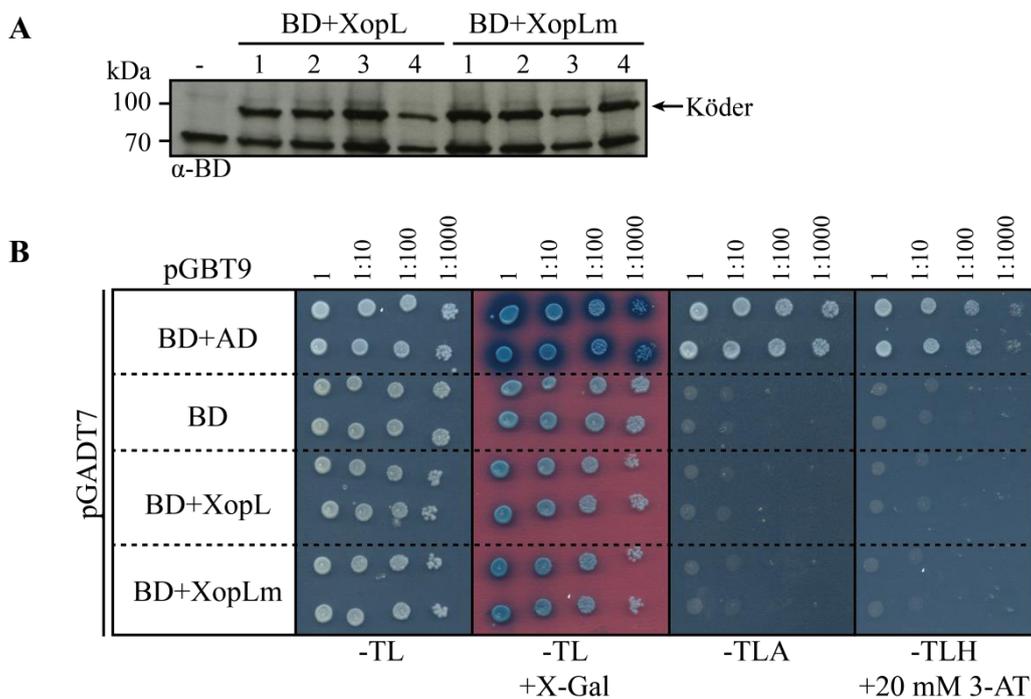


Abbildung 29. Test auf Köderproteinsynthese und Autoaktivierung der Reportergene in Hefezellen.

Die verwendeten Hefezellen (PJ69-4a) trugen kein Plasmid (-) oder pGADT7 sowie Köderplasmide pGBT9:*BDAD* (BD+AD), pGBT9:*BD* (BD), pGBT9:*xopL* (BD+XopL) bzw. pGBT9:*xopLm* (BD+XopLm) zur Synthese der Gal4-DNA-Bindedomäne (BD), fusioniert an die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD), der AD allein und der BD, fusioniert an XopL bzw. XopLm. **A**) Testen der Synthese der Köderproteine in Gesamtproteinextrakten von je vier Transformanten (1 - 4) mittels Immunoblot und einem Gal4-DNA-BD-spezifischen Antikörpers (α -BD). **B**) Test der Reportergen-Autoaktivierung. Jeweils zwei verschiedene Transformanten wurden in vier verschiedenen Konzentrationen auf Selektivmedien -TL (ohne Tryptophan und Leucin), -TLA (ohne Tryptophan, Leucin und Adenin) oder -TLH (ohne Tryptophan, Leucin und Histidin) getropft, die ggf. X-Gal oder 3-AT enthielten.

Tabelle 11. Übersicht der in dieser Arbeit durchgeführten Sichtungen einer cDNA-Bibliothek mittels Y2H.

Sichtung	Hefestamm	Köder	Beute	Transformanten	Reportergene
1	MAV103	XopL	<i>C. annuum</i> cDNA-Bibliothek	7×10^6	<i>URA3, HIS3</i>
2	MAV103	XopLm	<i>C. annuum</i> cDNA-Bibliothek	3×10^6	<i>URA3, HIS3</i>
3	PJ69-4a	XopL	<i>C. annuum</i> cDNA-Bibliothek	6×10^6	<i>ADE2, HIS3</i>
4	PJ69-4a	XopLm	<i>C. annuum</i> cDNA-Bibliothek	6×10^6	<i>ADE2, HIS3</i>

Insgesamt wurden Homologien zu 21 verschiedenen Proteinen als mögliche **p**pflanzliche Interaktoren von **XopL** (PixL) ermittelt (Tabelle 12). Die cDNA-Sequenzen hatten eine variable Länge und umfassten für fünf Gene auch den kompletten proteinkodierenden Bereich. Häufig wurden mehrere cDNAs für dasselbe Gen isoliert, was auf eine starke Interaktion hinweisen könnte. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das Protein ARIA („ARM repeat protein interacting with ABF2“), für das 15 mal cDNA-Klone isoliert wurden. ARIA aus *A. thaliana* wurde als ABA-Signalweg-Komponente und Interaktor des Transkriptionsfaktors ABF2 („abscisic acid responsive

elements-binding factor 2“) beschrieben (Kim *et al.*, 2004a). Die Identifizierung von ARIA als möglicher XopL-Interaktor bekräftigt die eingangs formulierte Hypothese, dass XopL den pflanzlichen ABA-Stoffwechsel oder ABA-assoziierte Prozesse manipulieren könnte (Abschnitt 3.6). Es wurden weitere mögliche pflanzliche Zielproteine von XopL identifiziert, beispielsweise ITSNI („intersectin-1“), HMGR2 („3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase“) und CHUP1 („chloroplast unusual positioning 1“), deren cDNAs in mindestens drei isolierten Beuteplasmiden kodiert waren (Tabelle 12).

Tabelle 12. Ergebnis der Sichtung der cDNA-Bibliothek mittels Y2H.

Interaktor	#	Homologie	Organismus, NCBI-Akzession	cDNA- „Insert“ [Bp]	DNA- Homolo- gie [%]
ARIA ³	15	„ARM repeat protein interacting with ABF2-like“	<i>St</i> ^P , XM_006349617	500 - 2127*	80 - 85
ITSNI ³	5	„intersectin-1“/LOC101244533	<i>St</i> ^P , XP_004230879	500 - 800	80 - 94
PixL3 ³	4	„threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic-like“	<i>St</i> ^P , XM_006339038	600	85
HMGR2 ³	3	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Koenzym A Reduktase	<i>Ca</i> , AF110383	1400 - 1500	100
CHUP1 ³	3	„chloroplast unusual positioning 1, chloroplastic-like“	<i>St</i> ^P , XM_006362376	800 - 1926*	88
PixL6 ²	2	„CDPK-related kinase 5-like“	<i>St</i> ^P , XM_006346383	900	91
PixL7 ³	2	„CDPK-related kinase 1-like“	<i>St</i> ^P , XM_006362210	1725*	92
PixL8 ²	2	„plectin-like“	<i>St</i> ^P , XM_006364745	800 - 1350	90
FBox ³	1	„F-box only protein 6“	<i>St</i> ^P , XM_004239170	600	80
ARC6 ²	1	„accumulation and replication of chloroplasts 6“	<i>St</i> ^P , XM_006341948	2457*	89
PixL11 ²	1	„golgin candidate 1-like“	<i>St</i> ^P , XM_006353424	750	92
PixL12 ²	1	„sorting nexin 2B-like“	<i>St</i> ^P , XM_006344542	1040	82
PixL13 ¹	1	„stress-induced protein 16“	<i>Ca</i> , KC795271	543*	94
PixL14 ¹	1	„centromere-associated protein E-like“	<i>St</i> ^P , XM_006345844	1200	86
PixL15 ²	1	„transcription factor bHLH130-like“	<i>St</i> ^P , XM_004229558	700	89
PixL16 ¹	1	„ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit“	<i>Sl</i> , NM_001247048	900	92
PixL17 ²	1	BEL29 Protein	<i>St</i> , EU686385	1300	89
PixL18 ²	1	„serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B“	<i>St</i> ^P , XM_004236732	1300	92
PixL19 ²	1	Uncharakterisiert LOC102582603	<i>St</i> ^P , XM_006344410	900	87
PixL20 ³	1	Uncharakterisiert LOC101265728	<i>St</i> ^P , XM_004237984	600	82
PixL21 ³	1	Uncharakterisiert LOC102606344	<i>St</i> ^P , XM_006338200	1060	90

¹, ausschließlich Interaktion mit XopL; ², ausschließlich Interaktion mit XopLm; ³, Interaktion mit XopL und XopLm; Die Ergebnisse von Sequenzvergleichen der sequenzierten Beuteplasmide mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990) incl. DNA-Homologie sind zusammengefasst. ^P, Vorhergesagtes Protein; *Ca*, *Capsicum annuum*; *Sl*, *Solanum lycopersicum*; *St*, *Solanum tuberosum*; #, Anzahl der isolierten Beuteplasmide mit homologer Sequenz; *, cDNA mit kompletter proteinkodierender cDNA-Sequenz in Beuteplasmid sequenziert.

3.6.2 Klonierung möglicher XopL-Interaktionspartner

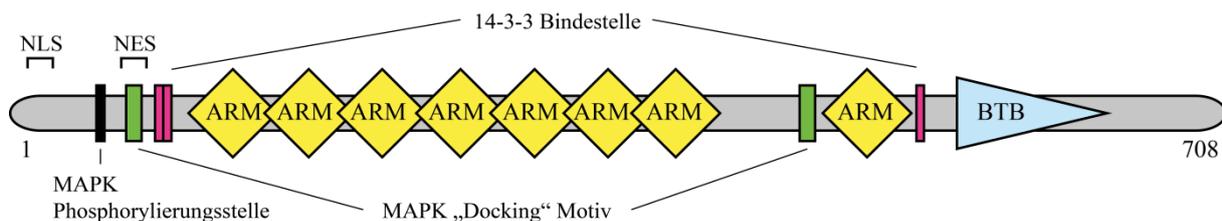
Zur näheren Charakterisierung möglicher XopL-Interaktoren wurden einige proteinkodierende cDNA-Sequenzen mit 5'- und 3'-Überhängen kloniert, die ein Klonieren in verschiedene Zielvektoren mittels Golden-Gate-Klonierung ermöglichen. Entsprechende Konstrukte für ARIA und ITSNI aus *C. annuum*-cDNA wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt, die Klonierung von HMGR2, FBox und ARIA aus *S. lycopersicum* (*Sl*)-cDNA erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Gruber (Tabelle 13).

Tabelle 13. Klonierte mögliche XopL-Interaktoren.

	Stop-Codon	Länge [Bp]	Länge [As]	mRNA-ID	Protein-ID
<i>SlARIA</i> ^a	- / +	2127	708	XM_004247119.2	XP_004247167.1
<i>CaARIA</i>	-	2148	715	n.a.	n.a.
<i>CaITSN1</i>	-	1113	370	n.a.	n.a.
<i>SlHMGR2</i> ^a	-	1806	601	NM_001309190.1	NP_001296119.1
<i>SlFBox</i> ^a	-	1401	466	XM_004239170.2	XP_004239218.1

^a, Kloniert im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Gruber (C. Gruber, U. Bonas, unpubliziert); n.a., nicht annotiert, As- und Nukleotidsequenzen im Anhang (Abschnitt 6.5); +, mit Stop-Codon; -, ohne Stop-Codon.

Unter den 21 verschiedenen möglichen XopL-Interaktoren war ARIA von besonderem Interesse, da nahezu jedes dritte Beutep lasmid eine ARIA-homologe Sequenz kodierte, und weil ARIA eine Rolle im ABA-Signalweg in *A. thaliana* spielt. Zunächst wurde bioinformatisch nach Proteindomänen und -motiven von *SlARIA* gesucht, die für dessen Funktion, möglicherweise auch während Pflanzenabwehr-assoziiierter Prozesse, notwendig sein könnten. ARIA enthält acht „Armadillo repeat“- und eine BTB-Domäne, die beide als Plattformen für Protein-Protein-Interaktionen beschrieben wurden (Abbildung 30) (Kim *et al.*, 2004a). Weiterhin wurden mehrere mögliche 14-3-3-Bindestellen sowie Binde- bzw. Phosphorylierungsstellen für MAPK, eine Kernimportsignal und -exportsignal identifiziert (Abbildung 30).

**Abbildung 30. Schematischer Aufbau von ARIA aus Tomate.**

Proteindomänen und -motive wurden mittels „ELM“ (Dinkel *et al.*, 2013) und „NLS MAPPER“ (Kosugi *et al.*, 2009) ermittelt. NLS, „nuclear localization signal“; NES, „nuclear export signal“; ARM, „Armadillo/beta-catenin-like repeat“; BTB, „Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac“.

3.6.3 *In planta* Lokalisierungsstudien mit XopL und möglichen Interaktoren

3.6.3.1 Verschiedene mögliche XopL-Interaktoren sind vornehmlich im Zellkern lokalisiert

Im Rahmen der Masterarbeit von P. John (P. John, U. Bonas, unpubliziert) wurde bereits mittels *Agrobacterium*-vermittelter transientscher Expression gezeigt, dass XopL:mOrange2 in *N. benthamiana* im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist. Zunächst wurde bioinformatisch nach vorhergesagten Kernlokalisierungssignalen (NLS, „nuclear localization signal“) gesucht. Dabei werden Motive identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer exklusiven Kernlokalisierung („starke“ NLS) oder mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit zur Kernlokalisierung bzw. zu partieller Kernlokalisierung („schwache“ NLS) führen (Dinkel *et al.*, 2013). „Starke“ NLS wurden in *CaARIA*, *SlARIA* und *SlFBox* ermittelt, „schwächere“ hingegen in *SlHMGR2*, *CaITSN1* und XopL (Tabelle 16 im Anhang).

Um die Lokalisierung der möglichen XopL-Zielproteine zu untersuchen, wurden die proteinkodierenden Sequenzen von *SlARIA*, *CaARIA*, *SlHMGR2*, *CaITSN1* und *SlFBox* in pGGA1 kloniert, der die *Agrobacterium*-vermittelte Synthese von C-terminal GFP-Epitop-markierten Proteinen *in planta* ermöglicht. Die Analyse der GFP-Fluoreszenz in *N. benthamiana* 2 dpi ergab, dass *CaARIA*:GFP, *SlARIA*:GFP, *SlHMGR2*:GFP, *CaITSN1*:GFP und *SlFBox*:GFP deutlich im Zellkern und in geringerem Maße auch im Zytoplasma lokalisieren (Abbildung 31A). Eine DAPI-Färbung diente zur Visualisierung der Zellkerne. Die immunologische Analyse des Blattmaterials zeigte spezifische Signale für *SlARIA*:GFP, *SlHMGR2*:GFP und *CaITSN1*:GFP, wohingegen kein *SlFBox*:GFP-spezifisches Signal detektiert wurde (Abbildung 31B). Damit lokalisieren die möglichen XopL-Interaktoren in den gleichen Kompartimenten wie XopL.

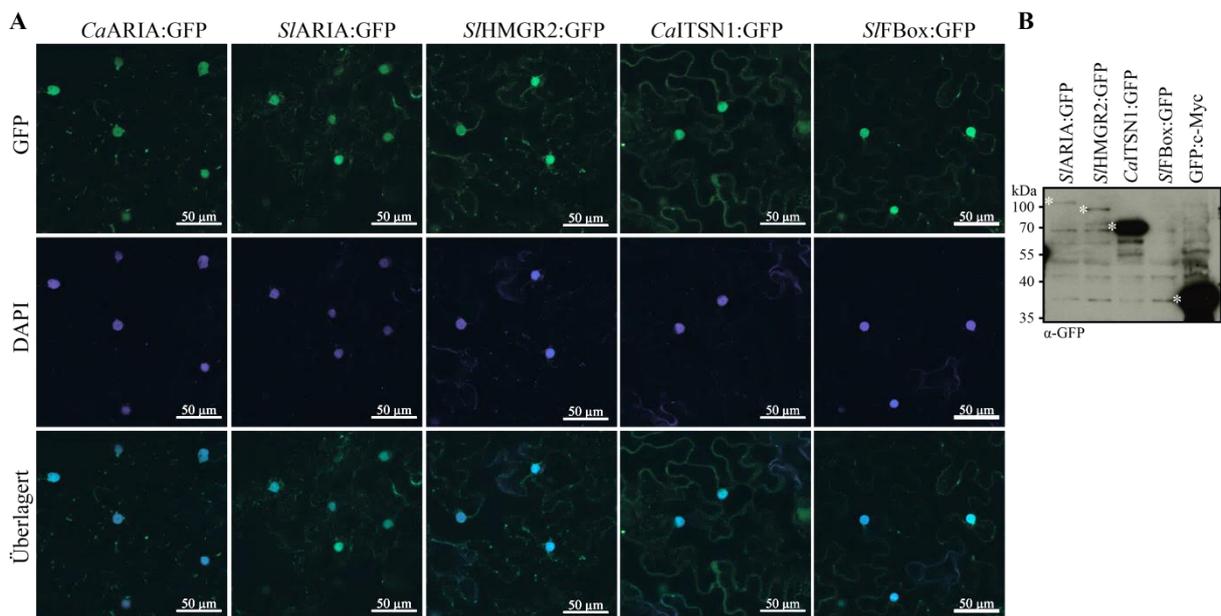


Abbildung 31. Lokalisierung möglicher XopL-Interaktoren *in planta*.

A. tumefaciens-Stämme, die die transiente Expression von *CaARIA:gfp*, *SlARIA:gfp*, *SlHMGR2:gfp*, *CaITSN1:gfp* und *SlFBox:gfp* *in planta* unter der Kontrolle des 35S-Promotors vermitteln, wurden in Blätter von *N. benthamiana* inokuliert ($OD_{600} = 0,8$). **A**) 2 dpi wurde zusätzlich eine DAPI-Lösung infiltriert und die GFP- und DAPI-Fluoreszenz untersucht. **B**) Immunologische Analyse der angegebenen Fusionsproteine 2 dpi in *N. benthamiana* mittels GFP-spezifischem Antikörper. Spezifische Signale der erwarteten Größe sind durch Sternchen markiert. Das Experiment wurde mindestens zweimal mit ähnlichen Resultaten reproduziert.

Anschließend wurde untersucht, ob die Anwesenheit von XopL einen Einfluss auf die Lokalisierung der möglichen Interaktoren hat. Dies wurde durch *A. tumefaciens*-vermittelte Ko-Synthese in *N. benthamiana* untersucht. Dazu wurde die GFP- und die mOrange2-Fluoreszenz nach gleichzeitiger Synthese von XopL:mOrange2 und *SlHMGR2*:GFP, *SlARIA*:GFP bzw. *CaITSN1*:GFP untersucht. Wie die Abbildung 41 im Anhang zeigt, wurde mOrange2- und GFP-Fluoreszenz im Zellkern und/oder Zytoplasma detektiert. Damit wurde kein Einfluss von XopL auf die Lokalisierung von *SlHMGR2*, *SlARIA* und *CaITSN1* festgestellt.

3.6.3.2 XopL beeinflusst die subzelluläre Chloroplastenposition in *N. benthamiana*

Bei der Sichtung der cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System wurde dreimal CHUP1 („chloroplast unusual positioning 1“) als möglicher XopL-Interaktor identifiziert (Tabelle 12). CHUP1 lokalisiert an der Chloroplastenoberfläche und ist in der äußeren Chloroplastenmembran verankert (Oikawa *et al.*, 2008), sodass eine Interaktion zwischen CHUP1 und XopL in der *Xcv*-infizierten Pflanzenzelle möglich erscheint. CHUP1 ist am Aufbau von sog. Chloroplasten-Aktinfilamenten beteiligt, über die Chloroplasten an der Zytoplasmamembran verankert sind und entlang derer sich Chloroplasten bewegen (Morita und Nakamura, 2012). Die Deletion von *CHUP1* in *A. thaliana* hat zur Folge, dass Chloroplasten nicht an der Plasmamembran verankert sind und eine unnormale Position innerhalb der Zelle einnehmen (Kasahara *et al.*, 2002). Daher wurde spekuliert, dass eine Interaktion zwischen XopL und CHUP1 die subzelluläre Chloroplastenposition verändern könnte. Dies wurde mittels *A. tumefaciens*-vermittelter transienter Expression von *xopL:gfp* in *N. benthamiana* und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Detektion von Chlorophyll A untersucht. Als Vergleichsprobe diente die Position von Chloroplasten nach transienter Expression von *gfp:c-Myc*. Wie erwartet waren Chloroplasten nach der Synthese von GFP:c-Myc deutlich an der Zellperipherie lokalisiert (Abbildung 32A). Interessanterweise lokalisierten Chloroplasten nach Synthese von XopL:GFP verstärkt um den Zellkern und nicht an der Zellperipherie (Abbildung 32A). Um diese Beobachtung auch statistisch beurteilen zu können, wurde der sogenannte „plastid nuclear association index“ (PNAI) von einer Vielzahl transformierter Zellen ermittelt. Der PNAI beschreibt die Anzahl von kernassoziierten Plastiden (Erickson *et al.*, 2014). Wie der Box Plot in Abbildung 32C zeigt, wurde nach GFP:c-Myc-Synthese ein PNAI zwischen 0 und 9 (Median 3) ermittelt, wohingegen nach XopL:GFP-Synthese ein PNAI zwischen 2 und 29 (Median 12) ermittelt wurde. Damit führte XopL zu einem signifikanten Anstieg an kernassoziierten Chloroplasten. Um auszuschließen, dass dieser Unterschied durch das GFP-Epitop in Kombination mit XopL hervorgerufen wird, wurde der PNAI auch nach Synthese von XopL:mOrange2 ermittelt. Auch XopL:mOrange2 führte zu einem signifikanten PNAI-Anstieg im Vergleich zur mOrange2- oder GFP:c-Myc-Synthese (Abbildung 32C). Für die zuvor beschriebenen Lokalisierungsstudien wurde der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 verwendet. Um zu untersuchen, ob der verwendete *A. tumefaciens*-Stamm für die veränderte Chloroplastenposition mitverantwortlich ist, wurde als zweiter Stamm GV2260 verwendet. Die transiente Synthese von XopL:GFP mittels GV2260 führte ebenfalls zu einem signifikanten PNAI-Anstieg im Vergleich zur GFP:c-Myc-Synthese (Abbildung 32C). Um auszuschließen, dass die transiente Synthese von *Xcv*-Effektoren generell die Chloroplastenposition beeinflusst, wurde dies auch nach XopQ:GFP-Synthese untersucht. XopQ:GFP führte zu keinem signifikantem Anstieg des PNAI im Vergleich zur GFP:c-Myc-Synthese (Abbildung 32C).

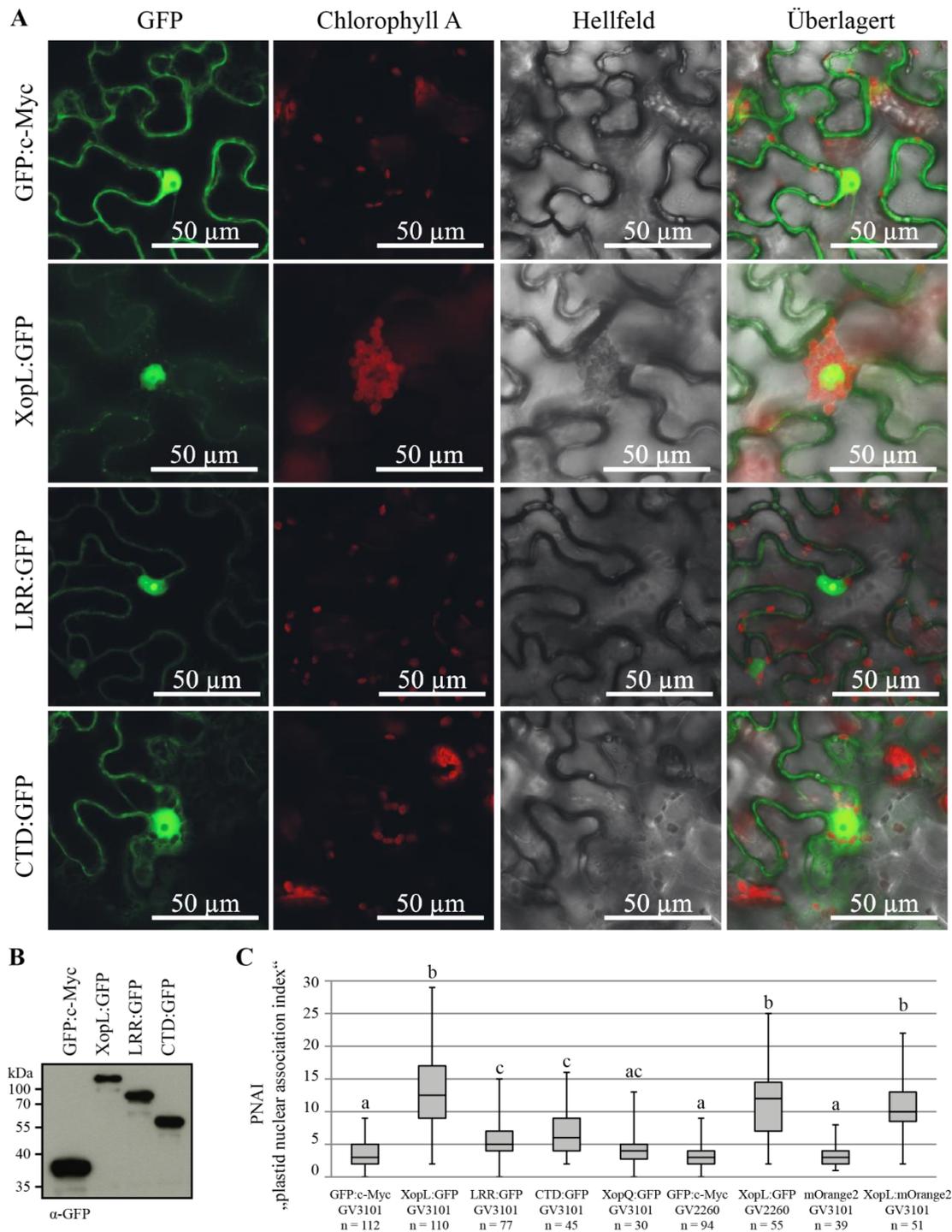


Abbildung 32. XopL, LRR und CTD lokalisieren im Zytoplasma und Zellkern und beeinflussen die Position von Chloroplasten.

A) *A. tumefaciens* GV3101-Stämme, die die Plasmide pGGA1_xopL (XopL:GFP), pGGA1_LRR (LRR:GFP), pGGA1_CTD (CTD:GFP) oder pGGA7_gfp (GFP:c-Myc) trugen, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert. 2 dpi wurden die GFP-Fluoreszenz, die Chloroplasten-Autofluoreszenz (Chlorophyll A) sowie das Hellfeld mikroskopisch untersucht. **B)** Immunologische Analyse der Pflanzenproteinextrakte (2 dpi) mittels GFP-spezifischen Antikörpers. Die gleichen Stämme wie in (A) wurden verwendet. **C)** Die Box Plots stellen die Verteilung von kernassoziierten Chloroplasten nach transienter Synthese der angegebenen Proteine dar, die durch die *A. tumefaciens*-Stämme GV3101 oder GV2260 vermittelt wurde. Der Stichprobenumfang [n] ist angegeben und beschreibt die Anzahl der Zellkerne, von denen die Anzahl der assoziierten Chloroplasten (PNAI) ermittelt wurde. Jeder Box Plot gibt den maximalen und minimalen PNAI (obere und untere Grenze) an, die Box umfasst die PNAI-Werte, die für 50% der Stichprobe ermittelt wurde und wird durch den Median geteilt. Buchstaben über den Box Plots beschreiben statistisch signifikante Gruppen, ermittelt mittels „Wilcoxon signed rank sum test“ mit P < 0,001. **A+B)** Das Experiment wurden mind. zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. **C)** Die Stichproben wurden in mind. drei unabhängigen Experimenten erhoben.

Da XopL eine E3-Ubiquitin-Ligase ist, schloss sich die Frage an, ob die enzymatische Aktivität der CTD oder dessen LRR für den PNAI-Anstieg verantwortlich ist. Sowohl die Anwesenheit von CTD:GFP als auch LRR:GFP führte zu einem leicht, aber dennoch signifikant erhöhten PNAI im Vergleich zur GFP-c-Myc-Synthese (Abbildung 32C). Dieser Anstieg war allerdings deutlich geringer als der XopL:GFP-bedingte Anstieg kernassoziierter Chloroplasten (Abbildung 32C). Sowohl die CTD als auch die LRR erhöhen also die Kernassoziierung von Chloroplasten, wobei das WT-XopL einen wesentlich stärkeren Einfluss darauf hatte. Das Ergebnis lässt vermuten, dass sowohl die Bindung der LRR an bestimmte Zielproteine als auch deren Ubiquitinierung durch die CTD für den drastischen Einfluss von XopL auf die subzelluläre Chloroplastenposition verantwortlich sind.

Eine weitere Erkenntnis dieses Versuchs war, dass sowohl LRR:GFP als auch CTD:GFP im Zytoplasma und Zellkern lokalisieren (Abbildung 32A). Außerdem akkumulierte LRR:GFP deutlich im Nukleolus, XopL:GFP und CTD:GFP hingegen nicht (Abbildung 32A). Die bioinformatische Charakterisierung von XopL identifizierte zwei mögliche Kernlokalisierungssignale (Tabelle 16 im Anhang), eines an Position 374 - 406, das zwei LRR- β -Faltblätter umfasst und ein weiteres an Position 517 - 546, innerhalb der CTD. Um die Kernlokalisierung von CTD:GFP, LRR:GFP und XopL:GFP zu verdeutlichen, wurden Zellkerne mittels DAPI gefärbt (Abbildung 40 im Anhang). Die Synthese der verwendeten Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. Es wurden spezifische Signale für XopL:GFP (100,6 kDa), LRR:GFP (77,8 kDa), CTD:GFP (51,1 kDa) und GFP:c-Myc detektiert (Abbildung 32B).

Eine verstärkte Kernassoziierung von Chloroplasten wurde außerdem bei den im Abschnitt 3.6.3.1 erwähnten Ko-Lokalisierungsstudien mit XopL und einigen möglichen Interaktoren beobachtet (Abbildung 41 im Anhang).

3.6.4 *In planta*-Interaktionsstudien mit XopL und möglichen Interaktoren

Um zu testen ob mögliche XopL-Interaktoren, die mittels Y2H-System identifiziert wurden, Zielproteine von XopL sind, sollte deren *in planta*-Interaktion mit XopL getestet werden. Dazu wurden BiFC- und Ko-Immunopräzipitationsstudien durchgeführt.

Für die BiFC-Versuche wurden sowohl *xopL* als auch die möglichen Interaktoren *SIARIA*, *SIHMGR2*, *CaITSN1* und *SIFBox* in die BiFC-Vektoren pGGA27 (N-terminale Fusion an 3 \times HA:YFP_C) und pGGA29 (N-terminale Fusion an 4 \times c-Myc:YFP_N) kloniert. Leider konnte weder die Synthese von XopL:YFP_C, noch von XopL:YFP_N nach *N. benthamiana*-Infektion mit den entsprechenden *A. tumefaciens*-Stämmen mittels Immunoblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Erwartungsgemäß wurde unter Verwendung von pGGA27_*xopL* und pGGA29_*xopL* keine Interaktion mit anderen Proteinen (*SIARIA*, *SIHMGR2*, *CaITSN1* und *SIFBox*) mittels BiFC nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die mögliche Interaktion zwischen XopL und *SIARIA* wurde weiterhin mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Dazu wurde *xopL* in pGGA7 kloniert, der die Synthese von C-

terminal c-Myc-Epitop-markierten Proteinen nach *A. tumefaciens*-vermittelter transientser Synthese *in planta* ermöglicht. Eine Ko-Immunopräzipitation von XopL:c-Myc und *SlARIA*:GFP konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings war das *SlARIA*:GFP-spezifische Signal der Proteinextrakte im Immunoblot äußerst gering, sodass keine Rückschlüsse auf eine mögliche Interaktion mit XopL gezogen werden sollten. Eine Optimierung der BiFC- und Ko-Immunopräzipitationsversuche wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

3.6.5 Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL beeinflusst die Proteinakkumulation möglicher Zielproteine

Die Ubiquitinierung von Proteinen führt häufig zum Proteasom-vermittelten Abbau, kann aber auch andere Auswirkungen haben (Husnjak und Dikic, 2012; Varshavsky, 2012). Um den möglichen Einfluss der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL auf die Proteinabundanz möglicher Interaktoren näher zu untersuchen, wurde die Akkumulation von *SlARIA*:GFP, *CaARIA*:GFP, *SlHMGR2* und *CaITSN1*:GFP bei gleichzeitiger Synthese von XopL:Strep bzw. dessen enzymatisch inaktivem Derivat XopLm:Strep in *N. benthamiana* immunologisch untersucht.

In Vergleich zu XopLm:Strep waren spezifische Signale von *SlARIA*:GFP, *CaARIA*:GFP und *CaITSN1*:GFP bei Ko-Synthese mit XopL:Strep deutlich reduziert (Abbildung 33). Im Gegensatz dazu war das *SlHMGR2*:GFP-spezifische Signal in Anwesenheit von XopL:Strep stärker als bei XopLm:Strep-Anwesenheit (Abbildung 33). Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL hat also einen positiven Einfluss auf die Proteinakkumulation von *SlHMGR2*:GFP und einen negativen Einfluss auf die Proteinakkumulation von *SlARIA*:GFP, *CaARIA*:GFP und *CaITSN1*:GFP.

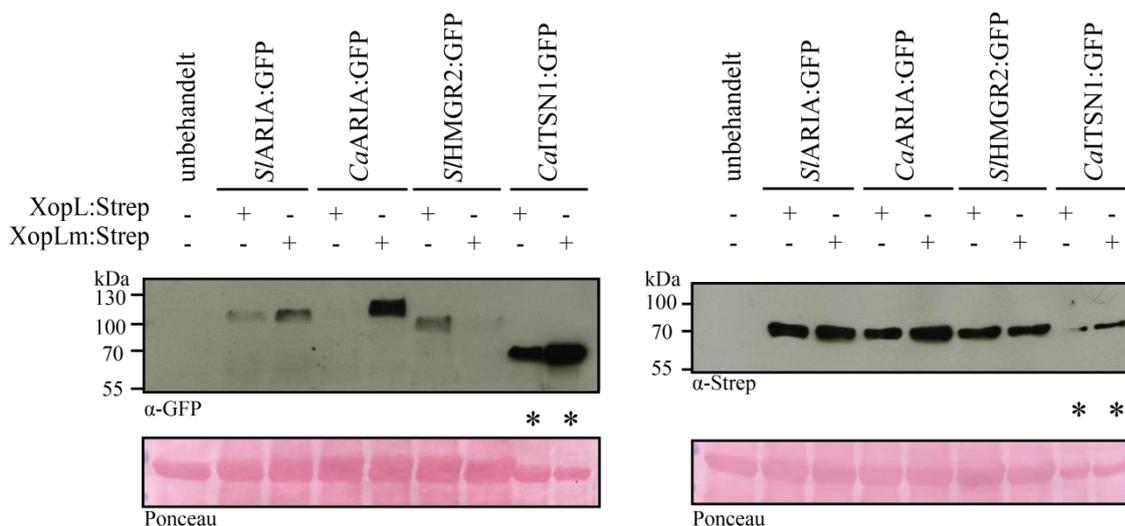


Abbildung 33. Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL beeinflusst die Akkumulation möglicher Zielproteine *in planta*.

A. tumefaciens-Stämme, die die transiente Synthese von *SlARIA*:GFP, *CaARIA*:GFP, *SlHMGR2*, *CaITSN1*:GFP, XopL:Strep und XopLm:Strep vermitteln, wurden mit einer OD_{600} von 0,8 im Verhältnis 1:1 gemischt und in *N. benthamiana* ko-inokuliert. 2 dpi wurden Proteinextrakte immunologisch mit GFP- und Strep-spezifischem Antikörper untersucht. *, von *CaITSN1*:GFP-haltigen Proteinextrakten wurden nur 25% im Vergleich zu den übrigen Proben auf das SDS-Gel geladen. Das Experiment wurde mindestens zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

3.6.6 Silencing von *ARIA* in *N. benthamiana*

Um die biologische Relevanz von *ARIA* bei der *Xcv*-Pflanzen-Interaktion zu untersuchen, wurde Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) von *ARIA* mittels „tobacco rattle virus“ (TRV) in *N. benthamiana* durchgeführt. Dabei ist das Virusgenom, bestehend aus TRV-RNA1 und TRV-RNA2, auf zwei Binärvektoren (pTRV1, pTRV2) zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation verteilt (Liu *et al.*, 2002).

Zur Erstellung eines geeigneten *Silencing*-Konstruktes wurde zunächst nach *ARIA*-Homologen in *N. benthamiana* gesucht. Mittels tBlastN wurden in der „*N. benthamiana* Genome v1.0.1 predicted cDNA“-Datenbank (www.solgenomics.net) vier verschiedene Homologe zu *SlARIA* identifiziert. Ein Sequenzvergleich zwischen cDNA-Sequenzen von *SlARIA* und den vier *N. benthamiana*-Homologen zeigte, dass der proteinkodierende Bereich zum großen Teil identisch ist (Sequenzvergleich im Anhang, Abschnitt 6.9). Da das *Silencing* nach Möglichkeit die Transkripte aller vier *NbARIA*-Homologe betreffen sollte, wurde ein konservierter Bereich der mRNA für das *Silencing*-Konstrukt gewählt. Das 347 Basenpaare lange *Silencing*-Konstrukt wurde in den Vektor pTRV2a (Derivat von pTRV2 (Szczesny *et al.*, 2010a)) kloniert. *A. tumefaciens*-Stämme, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a_*NbARIA* trugen, wurden in Keimblätter von *N. benthamiana*-Keimlingen ko-inokuliert. Als Vergleichspflanzen wurden Pflanzen mit *A. tumefaciens*-Stämmen behandelt, die die Plasmide pTRV1 und pTRV2a_*gfp* tragen, sodass die GFP-kodierende Sequenz durch das TRV verbreitet wurde (im Folgenden als „Kontrollpflanzen“ bezeichnet). Nach ca. drei Wochen wurde die *NbARIA*-Transkriptmenge der *Silencing*- und Kontrollpflanzen mittels quantitativer „real time“ PCR (qRT-PCR) ermittelt. Das dafür verwendeten Oligonukleotidpaar wurden so gewählt, dass Transkripte aller vier *NbARIA*-Homologe gleichzeitig amplifiziert werden, wohingegen das *Silencing*-Konstrukt nicht amplifiziert wird. Die ermittelte *NbARIA*-Transkriptmenge der GFP-Kontrollpflanzen wurde als 1 definiert und die *NbARIA*-Transkriptmenge der *Silencing*-Pflanzen relativ dazu berechnet. In *Silencing*-Pflanzen dreier unabhängiger Experimente wurde eine *NbARIA*-Transkriptmenge von etwa 20% bis 30% im Vergleich zu den GFP-Kontrollpflanzen ermittelt (Abbildung 34A).

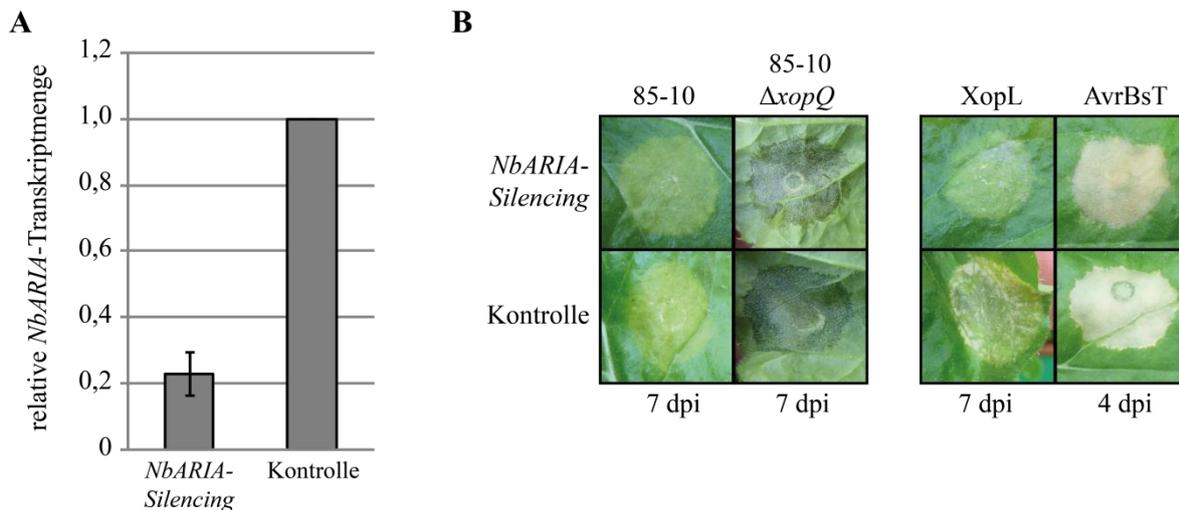


Abbildung 34. Silencing von NbARIA in *N. benthamiana*.

A) Quantifizierung der Transkriptmenge von NbARIA in Silencing-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen. NbARIA-Transkriptmengen von 5 Silencing-Pflanzen wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Transkripte von Kontrollpflanzen wurden als 1 definiert und die Transkripte von Silencing-Pflanzen relativ dazu berechnet. **B)** Einfluss des NbARIA-Silencing auf Pflanzenreaktionen. *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 $\Delta xopQ$ (OD_{600} 0,4) sowie *A. tumefaciens*-Stämme zur transienten Expression von *xopL:strep* (XopL) und *avrBsT:gfp* (AvrBsT) wurden in Versuchspflanzen inokuliert (OD_{600} 0,8). Repräsentative Pflanzenreaktionen von Silencing- und Kontrollpflanzen dreier unabhängiger Silencing-Versuche sind 4 oder 7 dpi angegeben.

Neben der Transkriptanalyse wurden Versuchspflanzen mit 85-10, dem *N. benthamiana*-pathogenen Stamm 85-10 $\Delta xopQ$ und *A. tumefaciens*-Stämmen zur transienten *in planta*-Synthese von XopL:Strep sowie AvrBsT:GFP infiziert. Dies sollte einen möglichen Einfluss des verringerten NbARIA-Transkriptlevels auf die von 85-10 $\Delta xopQ$ verursachten Krankheitssymptome, die 85-10-bedingte NWR-Reaktion sowie die XopL- und AvrBsT-vermittelten Zelltodreaktionen in *N. benthamiana* zeigen. Die beobachteten wässrigen Läsionen nach Inokulation von 85-10 $\Delta xopQ$ und die NWR-Reaktion nach Inokulation von 85-10 waren in Silencing- und Kontrollpflanzen vergleichbar stark ausgeprägt (Abbildung 34B). Die *A. tumefaciens*-vermittelte transienten Expression von *avrBsT:gfp in planta* führte zu einer schnellen Zelltodreaktion (etwa 3 dpi), wohingegen *xopL:strep* zu wesentlich langsameren Zelltodreaktionen oder lediglich chlorotischen Reaktionen führte (Abbildung 34B). Im direkten Vergleich zwischen Silencing- und Kontrollpflanzen waren die AvrBsT-induzierten Zelltodreaktionen nicht durch das NbARIA-Silencing beeinflusst, während die XopL-induzierten Reaktionen in Silencing-Pflanzen in etwa einem Drittel der Experimente schwächer erschien als in den Kontrollpflanzen. Der mögliche Einfluss des NbARIA-Silencing auf die XopL-vermittelte Zelltodreaktion war also nicht in allen untersuchten Pflanzen sichtbar und nicht zuverlässig reproduzierbar.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Die phylogenetische Verbreitung von Pflanzenreaktionen nach T3E-Expression in der Familie *Solanaceae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Variation der Pflanzenreaktionen von 86 Vertretern der *Solanaceae* nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression von 21 verschiedenen *Xcv*-T3E untersucht. Als Kontrolle diente GFP:c-Myc, dessen Synthese in keiner Pflanzenlinie sichtbare Reaktionen hervorrief. *A. tumefaciens* hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Pflanzenreaktionen, sodass die dokumentierten Phänotypen vermutlich T3E-vermittelt sind. Es ist zu beachten, dass die Transkription aller untersuchten Effektoren durch den konstitutiven 35S-Promotor gesteuert wurde, sodass deren Transkript- und Proteinlevel vermutlich höher sind, als *in planta*-Proteinlevel während einer *Xcv*-Infektion. Obwohl sich die *Agrobacterium*-vermittelte Expression damit von den Bedingungen einer natürlichen Infektion unterscheidet, ist diese Methode dennoch ein etabliertes und nützliches Mittel zur Charakterisierung von Effektoren und wurde beispielsweise in Verbindung mit XopL (Singer *et al.*, 2013), XopB (Schulze *et al.*, 2012) und XopX (Stork *et al.*, 2015) verwendet.

Die makroskopischen Reaktionen der Blätter variierten stark und reichten von symptomlosen Reaktionen über Chlorosen, bis hin zu langsamen und schnellen, HR-ähnlichen, Zelltodreaktionen (Abbildung 5). Ob diese Reaktionen auf die Virulenzfunktion eines Effektors oder auf ETI-Erkennungsmechanismen zurückzuführen sind, muss in zukünftigen Experimenten für jeden T3E einzeln untersucht werden. Ähnlich wie für XopQ beschrieben, könnten dazu verschiedene T3E-Derivate, idealerweise ohne Virulenzfunktion, untersucht werden. Häufig wird die Beobachtung einer schnellen, HR-ähnlichen Zelltodreaktion nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression in Nicht-Wirtspflanzen dahingehend interpretiert, dass eine Erkennung des T3E stattfindet. Dies wurde beispielsweise für XopE1 und XopJ in verschiedenen Pflanzen der Gattung *Nicotiana* (Thieme *et al.*, 2007), XopG in *N. tabacum* (Schulze *et al.*, 2012) und HopZ von *P. syringae* in *N. benthamiana* (Ma *et al.*, 2006) beschrieben. Die Charakterisierung von XopQ-Derivaten lässt vermuten, dass XopQ in *N. benthamiana* R-Gen-abhängig erkannt wird, diese Erkennung aber nicht zu einer HR führt, sondern zu einer Chlorose (Abbildung 36). Dies impliziert, dass auch „schwächere“ Pflanzenreaktionen (Chlorosen) Resultat einer R-Gen-vermittelter Erkennung sein können. Selbiges wurden auch für den *P. syringae*-T3E AvrB beschrieben, dessen Erkennung durch das als „schwach“ bezeichnete NB-LRR-R-Protein TAO1 in *A. thaliana* eine Chlorose und keine HR auslöst (Eitas *et al.*, 2008).

Unter der Prämisse, dass die beobachteten Pflanzenreaktionen auf R-Gen-vermittelten T3E-Erkennungsmechanismen beruhen, können Rückschlüsse auf deren phylogenetische Verteilung in der Familie *Solanaceae* und insbesondere innerhalb der Gattung *Nicotiana* gezogen werden. Besonders auffällig war, dass hypothetische R-Gene innerhalb der 46 untersuchten Linien der Sektion *Nicotiana* konserviert waren. So lösten AvrBsT, AvrRxy, XopE1, XopG, XopL, XopM und XopQ in allen bzw. fast allen untersuchten Linien dieser Sektion Pflanzenreaktionen aus, wohingegen Linien anderer

Sektionen oder Gattungen sehr verschieden auf die Synthese dieser T3E reagierten (Tabelle 8 und Tabelle 9). In ähnlicher Weise könnten AvrBs3-, XopK- und XopV-Erkennungsmechanismen innerhalb der Gattung *Solanum* und *Nicandra* konserviert sein, denn diese T3E lösten ausschließlich in diesen Pflanzen sichtbare Reaktionen aus. Aus phylogenetischer Sicht führten einige T3E aber auch zu einer deutlich divers verteilten Pflanzenreaktionen. Innerhalb der 46 untersuchten, eng verwandten Linien der Art *N. tabacum*, löste beispielsweise AvrBs1 in der Hälfte der Linien eine Reaktion aus, wohingegen XopJ lediglich in 3 Linien konsistente Reaktionen auslöste. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass Pflanzen *R*-Gene zur Erkennung einzelner Effektoren dynamisch erwerben, beispielsweise durch horizontalen Gentransfer, oder verlieren, beispielsweise infolge von fehlendem Selektionsdruck. Mittels horizontalem Gentransfer könnten auch *N. velutiana* und *N. nudicaulis* *R*-Gene gegen XopH bzw. XopV erworben haben, denn diese Effektoren lösten ausschließlich in diesen Linien sichtbare Reaktionen aus. Eine diverse, also nicht phylogenetisch konservierte Verteilung von *R*-Genen, und eine überdurchschnittlich hohe Evolutionsrate von *R*-Genen wurde bereits in verschiedenen Studien diskutiert (Ellis *et al.*, 2000; Bergelson *et al.*, 2001; Leister, 2004; Yue *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; González *et al.*, 2015). Obwohl die Anzahl sequenzierter Pflanzengenome stetig steigt (Monaco *et al.*, 2014) und Genome häufig mehrere hundert vorhergesagte R-Proteine kodieren, ist die Anzahl klonierter, charakterisierter *R*-Gene relativ gering (González *et al.*, 2015; Sekhwal *et al.*, 2015). Die Identifizierung von Pflanzen mit hypothetischen *R*-Genen gegen einzelne Effektoren könnte Ausgangspunkt zur Identifizierung neuer *R*-Gene sein, was jedoch häufig überaus zeit- und arbeitsintensiv ist. Zur Identifizierung von *R*-Genen könnten sowohl „forward genetics“-Strategien als auch „reverse genetics“-Strategien verwendet werden. Bei „forward genetics“-Strategien wird das Pflanzengenom zufällig verändert, beispielsweise durch chemische bzw. physikalische Mutagenese oder durch die zufällige Insertion von T-DNA oder Transposons, woraufhin homozygote Nachkommen phänotypisch untersucht werden (Shen *et al.*, 2015). Als weitere Methode könnte eine Pflanzenlinie mit hypothetischem *R*-Gen zunächst mit einer eng verwandten Linie ohne *R*-Gen gekreuzt werden. Segregationsanalysen würden zeigen, ob die Erkennung durch einen einzelnen genetischen Locus vermittelt wird, und langfristig könnte dieser Locus durch „map-based cloning“ eingegrenzt werden. Hierfür könnte beispielsweise die beiden diploiden Linien *N. sylvestris* (keine XopQ-Erkennung) und *N. alata* (XopQ-Erkennung) gekreuzt werden. Im Gegensatz dazu könnten mögliche *R*-Gene durch „forward genetics“-Strategien unter Verwendung von sequenzspezifischen Endonukleasen (Zinkfinger-Endonukleasen, TAL-Endonukleasen oder das CRISPR/Cas9-System) gezielt mutiert werden (Lee *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015), was dann sinnvoll erscheint, wenn bereits eine begrenzte Anzahl von *R*-Gen-Kandidaten eingegrenzt werden kann.

4.2 Die Verteilung und Ausprägung von NWR-Reaktionen gegen *Xcv*

4.2.1 Die NWR-Reaktion von *N. benthamiana* gegen *Xcv*

Die pflanzliche NWR vermittelt Abwehr gegen ein breites Spektrum von Pathogenen. Die genetischen und molekularen Grundlagen von NWR-Mechanismen können damit die Basis zur Erzeugung resistenter Nutzpflanzen bilden und stehen im Fokus der Forschung (Fan und Doerner, 2012). NWR gegen Gram-negative Bakterien kann sowohl durch PTI als auch ETI vermittelt werden und zu einer HR des infizierten Bereiches führen (Typ-II-NWR) oder ohne HR verlaufen (Typ-I-NWR) (Senthil-Kumar und Mysore, 2013).

Die Infektionsexperimente dieser Arbeit zeigten, dass *Xcv* 85-10 in *N. benthamiana* eine Typ-I-NWR auslöst, wohingegen die Inokulation von *Xcv* 85* verstärkt eine Typ-II-NWR zur Folge hat (Abbildung 13 und Abbildung 38). Der deutliche Einfluss der konstitutiven Expression von T3SS-Komponenten in 85* auf die NWR-Reaktion von *N. benthamiana* suggeriert, dass diese Reaktion nicht ausschließlich auf die pflanzliche PTI zurückzuführen ist, sondern auch die T3E-Erkennung nach Translokation in *N. benthamiana*-Zellen (ETI) eine Rolle spielt. Der Nachweis der T3SS-abhängigen Translokation von AvrBs3 durch *Xcv* in *N. benthamiana* (Abbildung 12) und die Tatsache, dass der T3SS-defiziente Stamm 85-10 Δ *hrcN* keine sichtbaren Reaktionen in *N. benthamiana* und 18 weiteren Nicht-Wirtspflanzen auslöst, bekräftigten die Theorie, dass ETI zur NWR gegenüber *Xcv* beiträgt. Weiterhin wurde festgestellt, dass 85-10 Δ *xopQ* in *N. benthamiana* nicht zu einer NWR-Reaktion führt, sondern zu Krankheitssymptomen, d. h. wässrigen Läsionen (Abbildung 7 und Abbildung 11). Damit wurde XopQ als T3E identifiziert, der die Avirulenz von *N. benthamiana* gegen *Xcv* vermittelt. Dass auch andere T3E von *Xcv* die NWR beeinflussen können wurde beispielsweise für XopE1 und XopE2 bei der *Xcv*-*S. pseudocapsicum*-Interaktion beschrieben, denn während 85-10 in diesen Pflanzen eine HR auslöst, ruft 85-10 Δ *xopE1* Δ *xopE2* keinen Zelltod hervor (Thieme *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde weiterhin festgestellt, dass auch der Standort (Gewächshaus oder Percival) die Intensität der von *N. benthamiana* ausgeprägten NWR-Reaktion signifikant beeinflusst (Abbildung 13). Dies macht deutlich, dass beide NWR-Typen nicht strikt voneinander getrennt werden können und ein dynamischer Übergang stattfindet. Generell scheinen Typ-I- und Typ-II-NWR auf ähnlichen molekularen Mechanismen zu beruhen, denn in *N. tabacum* werden beispielsweise verschiedene Pflanzenabwehr-assoziierte Gene (u. a. *PR-1* bis *PR-5*, *PAL*, *HMGR*) gleichermaßen bei beiden Typen der NWR induziert (Oh *et al.*, 2006). Vermutlich findet bei einer Typ-I-NWR hauptsächlich eine Nährstofflimitierung im Apoplasten statt, wohingegen beispielsweise die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei einer Typ-II-NWR zu einer HR führt (Senthil-Kumar und Mysore, 2013). Ausgehend von den beschriebenen Pflanzenreaktionen sowie den Ergebnissen der *in planta*-Wachstumskurven in *N. benthamiana*, wurde ein Modell der Immunitäts- und Suszeptibilitätsmechanismen bei der *Xcv*-*N. benthamiana*-Interaktion erstellt (Abbildung 35). Vermutlich wird nach Inokulation des WT-Stammes neben PTI in Folge der XopQ-Translokation zusätzlich ETI ausgelöst. Beide Immunitätsmechanismen können durch andere T3E nicht effizient supprimiert werden, sodass

nur ein geringes *Xcv*-Wachstum stattfindet. Dieses Wachstum ist signifikant erhöht, wenn *Xcv* keine T3E transloziert (85-10 Δ *hrcN*) und infolgedessen weder ETI noch ETS ausgelöst werden. Offensichtlich hemmt die PTI alleine das *Xcv*-Wachstum weniger stark, als eine Kombination aus PTI und ETI. Ohne den Avirulenzfaktor XopQ wird keine XopQ-abhängige ETI ausgelöst und andere T3E können effizient PTI und ggf. weitere ETI-Reaktionen supprimieren, was sich in einem stark erhöhtem *Xcv*-Wachstum und typischen Krankheitssymptomen widerspiegelt.

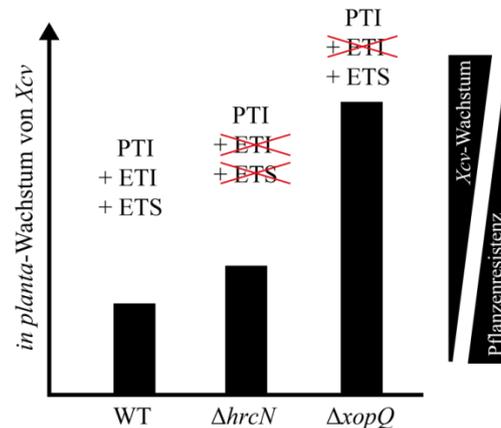


Abbildung 35. Modell der Immunitäts- und Suszeptibilitätsmechanismen bei der *Xcv-N. benthamiana*-Interaktion. PTI, PAMP-vermittelte Immunität („PAMP-triggered immunity“); ETI, Effektor-vermittelte Immunität („Effector-triggered immunity“); ETS, Effektor-vermittelte Suszeptibilität („Effector-triggered susceptibility“); WT, Wildtyp (*Xcv* 85-10); Δ *xopQ*, 85-10 Δ *xopQ*; Δ *hrcN*, 85-10 Δ *hrcN*.

Die beschriebene Avirulenzaktivität von XopQ steht im Einklang mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie, die die Effektoren AvrBsT und XopQ als Avirulenzfaktoren bei der Interaktion zwischen *N. benthamiana* und verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen (darunter auch *Xcv* 85-10) identifizierte (Schwartz *et al.*, 2015). T3E, die NWR-Reaktionen auslösen oder dazu beitragen, wurden in verschiedenen Pflanzenpathogenen identifiziert. So ist der T3E Rip36 von *R. solanacearum* für die HR der Nicht-Wirtspflanze *Solanum torvum* verantwortlich (Nahar *et al.*, 2014). In *A. thaliana* vermitteln die *Pto*-T3E AvrRpt2 und HopAS1 NWR-Reaktion (Sohn *et al.*, 2012) und schließlich vermittelt auch HopQ1 die Avirulenz bei der Interaktion zwischen *Pto* DC3000 und *N. benthamiana* (Wei *et al.*, 2007; Ferrante *et al.*, 2009). Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung von Erkenntnissen aus der Erforschung von NWR-Mechanismen sind transgene Reispflanzen, die das Mais-R-Gen *Rxo1* kodieren. Das Reispathogen *Xoc* kodiert den T3E AvrRxo1, der eine NWR-Reaktion von Maispflanzen hervorruft, wenn diese das R-Protein Rxo1 synthetisieren (Zhao *et al.*, 2004). Transgene *Rxo1*-Reispflanzen erkennen AvrRxo1 von *Xoc*, was eine HR zur Folge hat und schließlich zu pflanzlicher Resistenz führt (Zhao *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2009).

Die Identifizierung von *xopQ* als Avirulenz-determinierender Faktor bei der *Xcv-N. benthamiana*-Interaktion lässt vermuten, dass *N. benthamiana* ein korrespondierendes R-Gen (*R-xopQ*) kodiert, das für die *in planta*-Erkennung von XopQ verantwortlich ist. Die Präsenz dieses R-Gens in *N. benthamiana* könnte ebenfalls für das Auslösen der Chlorose nach *A. tumefaciens*-vermittelter transienter Expression von *xopQ* verantwortlich sein. Die in Abschnitt 4.1 erwähnten Strategien

könnten verwendet werden, um *R-xopQ* in *N. benthamiana* oder anderen *Nicotiana*-Linien zu identifizieren.

4.2.2 Die phylogenetische Verteilung von NWR-Reaktionen und XopQ-Erkennungsmechanismen in der Familie Solanaceae

Neben *N. benthamiana* wurden NWR-Reaktionen von 85 weiteren Nicht-Wirtspflanzen der *Solanaceae* und deren *xopQ*-Abhängigkeit untersucht, um Rückschlüsse auf die phylogenetische Verteilung von NWR-Mechanismen sowie XopQ-Erkennungsmechanismen zu ziehen. Interessanterweise löste die Inokulation von *Xcv* in nur vier Pflanzenlinien eine Typ-II-NWR-Reaktion aus (Abbildung 7): *S. tuberosum* (*Stub*), *N. clevelandii* (*Ncle*) sowie zwei *N. tabacum*-Linien (*Ntab* 4 und *Ntab* 10). Da diese Linien verschiedenen Gattungen bzw. *Nicotiana*-Sektionen angehören, ist der Mechanismus, der zur Bildung einer Typ-II-NWR-Reaktion nach *Xcv*-Inokulation führt, offensichtlich nicht phylogenetisch konserviert.

Die sichtbaren NWR-Reaktionen der 81 anderen untersuchten Linien waren sehr divers, verliefen jedoch alle ohne HR-ähnlichen Zelltod (Typ-I-NWR). Innerhalb taxonomischer Einheiten reagierten Pflanzenlinien häufig unterschiedlich auf die *Xcv*-Inokulation. Die acht Vertreter der Gattung *Solanum* zeigten beispielsweise schnellen Zelltod, langsamen Zelltod, Chlorosen oder keine sichtbaren Reaktionen. Selbst innerhalb einer Art kam es zu deutlichen Unterschieden der sichtbaren NWR-Reaktionen. So reagierten die 46 verschiedenen Vertreter der Art *N. tabacum* unterschiedlich auf die *Xcv*-Inokulation, v. a. weil *Ntab* 4 und *Ntab* 10 mit einer schnellen Zelltodreaktion reagierten, wohingegen die meisten anderen Linien dieser Art mit einer Chlorose reagierten. Eine deutliche Korrelation zwischen *Xcv*-verursachten NWR-Reaktion und der *Solanaceae*-Phylogenie wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet.

Eine *xopQ*-Abhängigkeit der NWR-Reaktionen wurde ausschließlich in Pflanzenlinien der Gattung *Nicotiana*, nicht aber in den Vertretern der anderen vier untersuchten Gattungen (*Solanum*, *Nicandra*, *Petunia*, *Physalis*) festgestellt (Abbildung 7). Dies deutet darauf hin, dass ein mögliches XopQ-korrespondierendes *R*-Gen (*R-xopQ*) lediglich in der Gattung *Nicotiana* konserviert ist. Allerdings wurden auch einige Linien der Gattung *Nicotiana* identifiziert, deren NWR-Reaktion *xopQ*-unabhängig war und in denen die transiente *xopQ*-Expression keine Pflanzenreaktionen auslöste, beispielsweise *N. sylvestris* (*Nsyl*) und *N. sanderae* (*Nsan*). Möglicherweise haben diese Linien *R-xopQ* im Laufe der Evolution verloren.

Wurde eine *xopQ*-Abhängigkeit der NWR-Reaktion festgestellt, dann wurden meist schwächere oder verzögerte NWR-Reaktionen im Vergleich zur Inokulation von 85-10 beobachtet. Offenbar ist *Xcv* nicht in der Lage, in diesen Linien Krankheitssymptome hervorzurufen. Möglicherweise wird die pflanzliche PTI nicht effizient supprimiert oder T3E können Suszeptibilitätsgene bzw. -mechanismen nicht effizient manipulieren. Außerdem könnten weitere T3E ETI-Reaktionen aktivieren.

In allen Linien, in denen NWR-Reaktionen *xopQ*-abhängig waren, führte auch die *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression von *xopQ* zu Pflanzenreaktionen. Diese waren meist HR-ähnliche Zelltodreaktionen und in der Regel „stärker“ als die von 85-10 ausgelösten NWR-Reaktionen. Unter der Annahme, dass die transiente *xopQ*-Expression die gleichen Erkennungsmechanismen auslöst, wie die XopQ-Translokation durch *Xcv*, könnten die „stärkeren“ Reaktionen nach transienter *xopQ*-Expression verschiedene Gründe haben: (i) die Intensität der Pflanzenreaktion könnte mit der XopQ-Proteinmenge in der Pflanzenzelle korrelieren und (ii) *Xcv* könnte neben XopQ weitere Zelltod-Suppressoren translozieren, beispielsweise XopB (Schulze *et al.*, 2012) und XopX (Stork *et al.*, 2015). In Ko-Expressionsexperimenten, bei denen *xopQ* und je ein anderer T3E gemeinsam transient in *N. tabacum* exprimiert wurden, suppressierte jedoch kein T3E die XopQ-vermittelte HR (Abschnitt 3.4.1). (iii) Dass die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente XopQ-Synthese meist „stärkere“ Reaktionen auslöste als die *Xcv*-Inokulation, könnte auch mit einem hemmenden Einfluss von PTI-Reaktionen auf NWR-Reaktionen erklärt werden. Dies wurde beispielsweise in einer Studie zur NWR-Reaktion von *N. tabacum* und *N. benthamiana* nach Inokulation verschiedener *P. s. pv. averrhoi*-Stämme (*Pav*, Verursacher der bakteriellen Fleckenkrankheit auf *Averrhoa carambola* [Sternfrucht]) sowie *Pto* festgestellt (Wei *et al.*, 2012). Stämme ohne Flagellum ($\Delta fliC$) lösen in den Nicht-Wirten *N. tabacum* und *N. benthamiana* eine HR aus, wohingegen WT-Stämme kaum sichtbare NWR-Reaktionen auslösen. Die Deletion der Flagellum-Komponente *fliC* hatte dabei keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen. Die simultane oder vorzeitige Infiltration von Flagellin hatte zur Folge, dass ein *fliC*-Deletionsstamm keine HR mehr in *N. tabacum* auslöst (Wei *et al.*, 2012). Interessanterweise führte die Infiltration von *A. tumefaciens*-Flagellin nicht zur Komplementation der $\Delta fliC$ -Mutante (Wei *et al.*, 2012). In Folgestudien könnte untersucht werden, ob *Xcv*-verursachte PTI-Reaktionen in Nicht-Wirten (z. B. durch Flagellin-Erkennung) einen hemmenden Einfluss auf die (XopQ-abhängigen) NWR-Reaktionen haben.

4.3 Vermutlich werden konservierte Strukturen von XopQ in *Nicotiana* erkannt

4.3.1 Die konservierte Struktur der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie

Die von A. Singer und A. Savchenko (Universität Toronto, Kanada) erhaltenen partiellen Kristallstrukturen von XopQ_{*Xcv*}, XopQ_{*Xcc*} und HopQ1_{*Psp*} ähneln einander stark und bestehen aus einer *in vitro*-Dimerisierungsdomäne und einer Nukleosid-Hydrolase (NH)-Domäne (Abschnitt 3.3.1). Kürzlich wurde die Kristallstruktur von einem weiteren Vertreter der XopQ-Familie publiziert, XopQ_{*Xoo*} von *X. oryzae* pv. *oryzae* (Yu *et al.*, 2013). XopQ_{*Xoo*} enthält ebenfalls eine typische NH-Domäne, allerdings wurde keine Dimerisierung beschrieben. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die XopQ_{*Xoo*}-Kristallstruktur erst mit der 86. As beginnt, wohingegen die Kristallstrukturen von XopQ_{*Xcv*}, XopQ_{*Xcc*} und HopQ1_{*Psp*} bereits etwa 15 As eher beginnen und infolgedessen eine zusätzliche α -Helix ($\alpha 1$) enthalten. Da diese zusätzliche Helix gemeinsam mit $\alpha 9$ - $\alpha 13$ die Dimerisierungsdomäne bildet,

könnte deren Fehlen im XopQ_{Xoo}-Kristall dessen Monomerisierung bedingen (A. Singer, persönliche Mitteilung).

Vor der Kristallisierung von XopQ_{Xcv}, XopQ_{Xcc} und HopQ1_{Psp} wurde ein limitierter, proteolytischer Verdau durchgeführt, infolgedessen fehlten interne Bereiche von 65 - 75 As. Um auszuschließen, dass diese Deletionen aufgrund von Fehlfaltungen zu einer artifiziellen Dimerisierung führten, wurden weitere *in vitro*- und *in planta*-Studien durchgeführt. Di- und Oligomerisierung wurde *in vitro* mittels analytischer Ultrazentrifugation und Gelfiltration (A. Singer, persönliche Mitteilung) bestätigt und *in planta* wurde XopQ_{Xcv}-XopQ_{Xcv}-Interaktion mittels BiFC bestätigt (Abschnitt 3.4.4). Dabei wurde kein limitierter Verdau durchgeführt, sodass die artifizielle Dimerisierung unwahrscheinlich erscheint. Während *in vitro*-Studien mit gereinigten Proteinen die direkte Proteininteraktion nachweisen, könnten BiFC-Studien auch bei indirekter Interaktion, beispielsweise durch Komplexbildung mit pflanzlichen Proteinen, positive Signale liefern. XopQ_{Xcv}, HopQ1_{Pto} und HopQ1_{Psp} interagieren *in planta* mit 14-3-3-Proteinen (Giska *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013b; Teper *et al.*, 2014), sodass weiterführende Experimente untersuchen könnten, ob XopQ-Proteine *in planta* direkt oder indirekt über 14-3-3-Proteine miteinander interagieren. Dazu könnte zunächst das Derivat XopQ_S65A mittels BiFC untersucht werden, welches nicht mit 14-3-3-Proteinen interagiert (Teper *et al.*, 2014).

4.3.2 *N. benthamiana* besitzt vermutlich zwei verschiedene XopQ-Erkennungsmechanismen

Um einen näheren Einblick in pflanzliche XopQ-Erkennungs- und -Resistenzmechanismen zu erhalten, wurden Derivate transient in *N. benthamiana* und *N. tabacum* exprimiert und für Komplementationsstudien in 85-10 Δ xopQ exprimiert.

Das Derivat XopQ Δ 2-69 komplementierte 85-10 Δ xopQ nicht, löste aber nach *Agrobacterium*-vermittelter Synthese in *N. benthamiana* eine Chlorose und in *N. tabacum* eine HR aus. Vermutlich ist dessen T3SS-Translokationssignal nicht funktional. Roden *et al.* (2004) zeigten, dass die N-terminalen 81 As von XopQ dessen Translokationssignal enthalten, grenzten dieses aber nicht weiter ein. Weiterhin beinhaltet der N-terminale Bereich von XopQ eine 14-3-3-Bindestelle. Da das Derivat XopQ_S65A nicht mehr mit 14-3-3-Proteinen interagiert (Teper *et al.*, 2014), aber die 85-10 Δ xopQ-Mutante komplementiert, ist die 14-3-3-Bindung offensichtlich nicht zur XopQ-Erkennung in *N. benthamiana* nötig. Die vorhergesagte enzymatische NH-Aktivität von XopQ erwies sich ebenfalls als entbehrlich für dessen Erkennung in *N. benthamiana*. So komplementierten die Derivate XopQ_D116A,D118A, XopQ_D120A,D122A,D123A, XopQ_N396A,Y398F,D399A, XopQ_N280A,N281A,D284A und XopQ_E308A,Y311F die xopQ-Deletionsmutante und lösten in *N. benthamiana* und *N. tabacum* eine Chlorose bzw. HR aus. Die genaue Betrachtung der Kristallstruktur von XopQ_{Xoo}, gebunden an das mögliche Substrat Adenosindiphosphat-Ribose, zeigt, dass zahlreiche der mutierten Aminosäuren Wasserstoffbrücken zu dem Substrat (D120, D122, N280, Y311, D399) und zu einem Ca²⁺-Ion im aktiven Zentrum (D116, D123, D399) bilden (Yu *et al.*, 2014). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die verwendeten Substitutionen zum Verlust der

enzymatischen Aktivität von XopQ_{Xcv} führten. Einige dieser As wurden weiterhin als essenziell für die Virulenzfunktion von HopQ1_{Pto} beschrieben (Hann *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013a), wohingegen sie nicht zur Erkennung von HopQ1_{Pto} nach transientser Synthese in *N. tabacum* beitragen (Li *et al.*, 2013a).

Verschiedene Derivate mit Deletionen in der Dimerisierungsdomäne und der nicht-kristallisierten, zentralen Region komplementierten den Stamm 85-10ΔxopQ nicht (Tabelle 10). Überraschenderweise korrelierte die Fähigkeit, Resistenzreaktionen gegen *Xcv* in *N. benthamiana* auszulösen, nicht mit der Chlorose-induzierenden Aktivität nach transientser Expression in *N. benthamiana*, sondern mit der HR-induzierenden Aktivität nach transientser Expression in *N. tabacum*. Dies könnte bedeuten, dass *N. benthamiana* zwei verschiedene Mechanismen zur Erkennung von XopQ besitzt, was in dem Modell in Abbildung 36 zusammengefasst ist. Der Erkennungsmechanismus 1 scheint sowohl in *N. benthamiana* als auch in *N. tabacum* konserviert zu sein und löst in *N. tabacum*, allerdings nicht in *N. benthamiana*, nach xopQ-Expression eine HR aus. Weiterhin induziert Mechanismus 1 die NWR bei der *Xcv*-*N. benthamiana*-Interaktion. Mechanismus 2 erkennt auch XopQ-Derivate, die von Mechanismus 1 nicht erkannt werden. Letzterer scheint nicht in *N. tabacum* konserviert zu sein, sondern führt spezifisch in *N. benthamiana* zur Bildung einer Chlorose nach transientser xopQ-Expression, vermittelt aber keine Resistenz bei der *Xcv*-*N. benthamiana*-Interaktion. Die Präsenz von zwei verschiedenen R-Gen-vermittelten Erkennungsprozessen in einer Pflanze ist kein Novum. So wird auch der T3E AvrB aus *P. syringae* in *A. thaliana* von dem CC-NB-LRR-R-Protein RPM1 erkannt, wodurch eine RIN4-abhängige HR ausgelöst wird (Mackey *et al.*, 2002). In *rpm1*-Pflanzen wird eine RIN4-unabhängige Chlorose sichtbar, da AvrB durch das TIR-NB-LRR-R-Protein TAO1 erkannt wird (Belkhadir *et al.*, 2004; Eitas *et al.*, 2008).

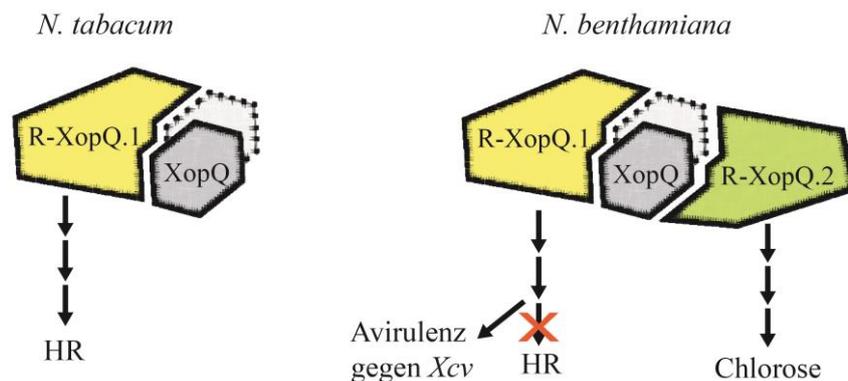


Abbildung 36. Modell der XopQ-Erkennungsmechanismen in *N. tabacum* und *N. benthamiana*.

Vermutlich erkennen pflanzliche R-Proteine (R-XopQ) strukturelle Bereiche von XopQ (evtl. auch von XopQ-Dimeren). Die Erkennung via R-XopQ.1 führt in *N. tabacum* nach transientser XopQ-Synthese zu einer HR, in *N. benthamiana* hingegen nicht. In *N. benthamiana* vermittelt die Erkennung via R-XopQ.1 stattdessen die Avirulenz gegen *Xcv*. Ein zweiter XopQ-Erkennungsmechanismus (R-XopQ.2) in *N. benthamiana* erkennt teils unterschiedliche strukturelle Bereiche und führt zu einer Chlorose.

Die untersuchten Deletionen in der nicht-kristallisierten, zentralen Region von XopQ hatten einen negativen Einfluss auf die Erkennung via Mechanismus 1, nicht aber auf die Erkennung via Mechanismus 2. Deletionen in der Dimerisierungsdomäne beeinflussten beide möglichen

Erkennungsmechanismen negativ. Folglich kann spekuliert werden, dass strukturelle Bereiche und möglicherweise XopQ-Dimere *in planta* direkt erkannt werden. Allerdings hatten Substitutionen von bis zu vier Aminosäureresten in der zentralen Helix der Dimerisierungsdomäne ($\alpha 10$) von XopQ keinen Einfluss auf die Pflanzenreaktionen, obwohl bei diesen Substitutionen Aminosäurereste, die in der Kristallstruktur direkten Kontakt zum zweiten XopQ-Molekül hatten, u. a. zu polaren, sauren Aminosäuren verändert wurden. Ob die Substitutionen in der XopQ-XopQ-Interaktionsplattform die *in planta*-Dimerisierung tatsächlich beeinflussen, sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, um eine mögliche Korrelation zwischen Dimerisierung und XopQ-Erkennung zu eruieren. Dazu könnten verschiedene XopQ-Derivate in BiFC-Studien untersucht werden. Interessanterweise wurde bei der BiFC-Studie mit XopQ:YFP_N und XopQ:YFP_C Fluoreszenz vornehmlich im Zytoplasma detektiert (Abbildung 25), wohingegen XopQ:GFP im pflanzlichen Zytoplasma und Zellkern lokalisiert (Masterarbeit P. John, 2012). Möglicherweise findet eine XopQ-XopQ-Interaktion lediglich im Zytoplasma statt. Gleichzeitig ist bekannt, dass die XopQ-Kernlokalisierung nicht wichtig für das Auslösen der HR nach transientser Synthese in *N. tabacum* ist (Masterarbeit P. John, 2012), sodass die mögliche R-XopQ-vermittelte Erkennung vermutlich im Zytoplasma stattfindet.

Verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass die Erkenntnisse zur pflanzlichen Erkennung von XopQ aus *Xcv* wahrscheinlich auch auf pflanzliche Erkennungsmechanismen gegen XopQ-Homologe aus anderen *Xanthomonas*- und *Pseudomonas*-Stämmen übertragen werden können. So rufen XopQ_{*Xcv*}, XopQ_{*Xcc*} und HopQ1_{*Pto*} identische Reaktionen in verschiedenen *Solanaceae* hervor (Abbildung 16), *hopQ1_{Pto}* komplementiert die 85-10 Δ *xopQ*-Mutante und schließlich sind die Kristallstrukturen von XopQ_{*Xcv*}, XopQ_{*Xcc*} und HopQ1_{*Pst*} nahezu identisch (A. Singer und Abschnitt 3.1.1). Die Nutzbarmachung von pflanzlichen Resistenzmechanismen gegen XopQ_{*Xcv*} als Vertreter einer konservierten und bei Pflanzenpathogenen weit verbreiteten T3E-Familie könnte damit zur Erzeugung verschiedenster Nutzpflanzen mit Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen dienen.

4.4 Die Virulenzfunktion von XopQ

Die Determinierung der Wirtsspezifität ist höchstwahrscheinlich nicht die biologische Funktion von XopQ. T3E mit Avirulenzaktivität sind meist in zahlreichen Vertretern einer Pathogengattung konserviert und tragen zur bakteriellen Virulenz bei. In *Xcv* ist beispielsweise der T3E AvrBs2 ein wichtiger Virulenzfaktor für das Pathogen, er vermittelt aber auch Avirulenzreaktionen in resistenten Paprikapflanzen, die das R-Gen *Bs2* kodieren (Kearney und Staskawicz, 1990). Häufig tragen Avirulenzfaktoren zur Virulenz bei, indem sie konservierte pflanzliche Abwehrmechanismen zum Vorteil des Bakteriums beeinflussen, wie beispielsweise AvrRpt2 (Mackey *et al.*, 2003), AvrPphB (Shao *et al.*, 2003), AvrPto (Xiang *et al.*, 2008), AvrPtoB (Göhre *et al.*, 2008; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009) und AvrB (Shang *et al.*, 2006) von *P. syringae*.

Da die Deletion von *xopQ* keinen Einfluss auf die *Xcv*-Virulenz in suszeptiblen Tomaten- und Paprikapflanzen hat, wurde getestet, ob XopQ PTI- oder ETI-Reaktionen beeinflusst. Während die *xopQ*-Expression in *N. benthamiana* keinen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung von SIPK und WIPK nach Applikation des PAMPs flg22 hatte (Abbildung 24), wurde die XopJ-, XopL- und XopB-induzierte Zelltodreaktion in *N. benthamiana* supprimiert (Abbildung 22). Die Virulenzfunktion von XopQ könnte daher das Supprimieren von ETI-Reaktionen sein.

Eine Zelltod-supprimierende Aktivität von XopQ identifizierten ebenfalls Teper *et al.*, 2014. Sie zeigten, dass XopQ zum Wachstum von *Xcv* in resistenten Wirtspflanzen beiträgt, allerdings nicht in suszeptiblen Pflanzen. Dies wurde auf eine ETI-supprimierende Aktivität von XopQ zurückgeführt, für die die Interaktion mit pflanzlichen 14-3-3-Proteinen essenziell ist. Interessanterweise wurde weiterhin gezeigt, dass XopQ in *N. benthamiana* spezifisch die MAPK-Kaskade MAPKKK α /MEK2/SIPK beeinflusst. Dabei supprimiert XopQ Zelltodreaktionen vermutlich erst nach der Aktivierung der Kaskade bis zu SIPK, was im Einklang mit der Beobachtung steht, dass XopQ die Phosphorylierung von SIPK nach flg22-Applikation nicht beeinflusst (Abbildung 24). Während für XopQ in *Xcv* bisher lediglich eine Virulenzfunktion bei der Interaktion mit resistenten Wirtspflanzen beschrieben wurde, hat die *xopQ*-Deletion in *Xoo* BXO43 eine drastische Reduktion der Virulenz in suszeptiblen Reispflanzen zur Folge (Sinha *et al.*, 2013) und Substitutionen im aktiven Zentrum von XopQ führten zum Verlust der Virulenzaktivität (Gupta *et al.*, 2015).

Die Charakterisierung von *hopQ1_{Pto}*-exprimierenden *A. thaliana*-Pflanzen zeigte einen hemmenden Einfluss von HopQ1 auf pflanzliche Abwehrprozesse (Hann *et al.*, 2013). Es wurde ein Modell formuliert und z. T. bestätigt, in dem die enzymatische Aktivität von HopQ1_{Pto} *in planta* die hydrolytische Spaltung der Cytokinin-Vorstufe iPRMP (N6-(2-Isopentenyl)-Adenin-9-Ribosid-5'-Monophosphat) ist, was zur Freisetzung von dem Cytokinin iP (N6-(2-Isopentenyl)-Adenin) führt. Die Cytokininfreisetzung führt zur Aktivierung des Cytokinin-Signalwegs, was die Transkription des Flagellin-Rezeptorgens *FLS2* in *A. thaliana* supprimiert. Diese Suppression hat schließlich zur Folge, dass flg22-Applikation nicht zur Aktivierung von MAP-Kinasen und folglich auch nicht zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Während katalytisch aktive Asparaginsäure-Reste im aktiven Zentrum von HopQ1_{Pto} essenziell für dessen beschriebene Virulenzfunktion in *A. thaliana* sind (Hann *et al.*, 2013), waren diese nicht notwendig für die ETI-Suppression durch XopQ in *N. benthamiana* (Abbildung 23). Für die ETI-Suppression durch XopQ_{Xcv} war außerdem die 14-3-3-Bindestelle entbehrlich, wohingegen Deletionen in der Dimerisierungsdomäne, die zum Verlust der XopQ-Erkennung in *N. benthamiana* via Mechanismus 1 führten, auch keine ETI-supprimierende Aktivität hatten.

Während die Erkenntnisse zur Avirulenzaktivität von XopQ möglicherweise auch auf weitere Vertreter der XopQ/HopQ1-T3E-Familie übertragen werden können, ist der Beitrag des Effektors zur Virulenz des jeweiligen Pathogens offensichtlich unterschiedlich und sollte daher individuell untersucht werden.

4.5 Phytohormon-assoziierte Prozesse könnten Ziele von *Xcv*-Effektoren sein

Im Gegensatz zu T3E von *P. syringae* sind kaum Effektoren von *Xcv* 85-10 bekannt, die Phytohormon-assoziierte Prozesse manipulieren (s. Abschnitt 1.4). Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung hormoneller Signalwege, die von *Xcv* 85-10-T3E manipuliert werden könnten. Durch Analyse der Symptome verschiedener Tomaten-Mutanten nach *Xcv*-Infektion sollte ein möglicher Einfluss von ET, GA und ABA auf die *Xcv*-Tomate-Interaktion identifiziert werden (s. Abschnitt 3.5).

4.5.1 Eine konstitutive GA-Antwort reduziert die Symptombildung bei der *Xcv*-Infektion

S. lycopersicum kodiert ein einziges *DELLA*-Gen, welches *PROCERA* (*PRO*) genannt wird. „*procera*“-Tomatenpflanzen zeichnen sich durch eine Punktmutation dieses Gens aus, infolgedessen eine konstitutive GA-Antwort stattfindet (Jones, 1987; Bassel *et al.*, 2008; Livne *et al.*, 2015). In Abwesenheit von GA supprimieren *DELLA*-Proteine die Transkription von GA-induzierten Genen (Locascio *et al.*, 2013). Die GA-Präsenz wird von dem GA-Rezeptor *GID1* erkannt, woraufhin dieser den *DELLA*-Suppressor bindet, was schließlich zum *DELLA*-Abbau und der Transkription GA-induzierter Gene führt (Locascio *et al.*, 2013).

Infektionsversuche dieser Arbeit zeigten einen negativen Einfluss der konstitutiven GA-Antwort auf die Symptombildung nach *Xcv*-Infektion. Das bakterielle *in planta*-Wachstum wurde aus zeitlichen Gründen bisher nicht analysiert. Die GA-Homöostase als Angriffspunkt bakterieller Effektoren ist kaum beschrieben, aber *A. thaliana*-Mutanten ohne funktionelle *DELLA*-Proteine zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pto*, wohingegen *A. thaliana*-Pflanzen mit stabilisierter *DELLA*-Variante anfälliger gegenüber *Pto* sind (Navarro *et al.*, 2008). Ein Kandidat für einen T3E, der GA-Homöostase beeinflussen könnte, ist *XopD* aus *Xcc* 8004, der mit einem *A. thaliana*-*DELLA*-Protein interagiert und dessen Abbau verzögert (Tan *et al.*, 2014). *XopD*_{*Xcc*8004} verzögert die Bildung nekrotischer Symptome bei der Interaktion von Rettich (*Raphanus sativus* L.) und *A. thaliana* mit *Xcc* 8004, beeinflusst dabei aber nicht das bakterielle Wachstum (Tan *et al.*, 2014). Für *XopD* aus *Xcv* 85-10 wurde allerdings ein anderer Mechanismus beschrieben: mittels SUMO-Protease-Aktivität destabilisiert dieser T3E *ERF4*, einen Transkriptionsfaktor des ET-Signalwegs was zur Suppression der ET-Antwort während der *Xcv*-Infektion führt (Kim *et al.*, 2013).

4.5.2 Abscisinsäure fördert die Suszeptibilität von Tomate gegenüber *Xcv*

In dieser Arbeit wurde durch die Sprühapplikation von ABA vor Inokulation von *Xcv* gezeigt, dass ABA die Suszeptibilität von Tomatenpflanzen gegenüber *Xcv* positiv bzw. die Pflanzenabwehr negativ beeinflusst. Die Inokulation von *Xcv* in „*sitiens*“-Tomatenpflanzen löste deutlich schwächere Symptome aus, als in korrespondierenden WT-Pflanzen. „*sitiens*“-Pflanzen sind nahezu ABA-defizient, da sie nicht in der Lage sind, ABA-Aldehyd zu ABA zu oxidieren (Taylor *et al.*, 1988).

In ähnlicher Weise wurde ein negativer Einfluss von ABA auf die Pflanzenabwehr bei der Interaktion zwischen Reis und *Xoo* (Xu *et al.*, 2013), *A. thaliana* und *Xcc* (Ho *et al.*, 2013), *A. thaliana* und *Pto*

(Mohr und Cahill, 2003), Tomate und *Erwinia chrysanthemi* (Asselbergh *et al.*, 2007; Asselbergh *et al.*, 2008), *N. tabacum* und *P. syringae* pv. *tabaci* (Grosskinsky *et al.*, 2014) sowie Tomate und *Botrytis cinerea* (Audenaert *et al.*, 2002) beschrieben. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass bakterielle T3E ABA-Signalwege oder -Konzentrationen manipulieren. Dies ist am besten beschrieben für AvrPtoB von *Pto* und AvrXccC von *Xcc* 8004. Während der suszeptiblen Interaktion zwischen *A. thaliana* und *Pto* führt die E3-Ubiquitin-Ligase AvrPtoB durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Bildung von ABA, was u. a. zu einer verminderten Expression von Genen der basalen Pflanzenabwehr führt (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass der T3E-bedingte Anstieg der ABA-Konzentration bei der *Pto-A. thaliana*-Interaktion zu einer reduzierten Photosystem-II-Aktivität, einem wichtigen Faktor der PTI, führt (de Torres-Zabala *et al.*, 2015). Bei der *A. thaliana-Xcc*-Interaktion induziert der T3E AvrXccC die Expression eines Schlüsseligens der ABA-Biosynthese (*NCED5*), infolgedessen das ABA-Level ansteigt und die Pflanzenabwehr supprimiert wird (Ho *et al.*, 2013).

Interessanterweise hatte die ABA-Sprühapplikation auf Tomatenpflanzen auch einen signifikant positiven Einfluss auf das *in planta*-Wachstum der T3SS-Mutante 85-10 Δ *hrcN*. Dies wurde auch für einen T3SS-defizienten *Pto*-Stamm nach ABA-Applikation bei *A. thaliana* festgestellt (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Die ABA-Sprühapplikation auf suszeptible Paprikapflanzen hatte dagegen keinen Einfluss auf die Suszeptibilität gegenüber *Xcv*. Möglicherweise beeinflusst ABA die Pflanzenabwehr verschiedener Pflanzen unterschiedlich oder Sprühintervall und ABA-Konzentration waren ungeeignet, um die ABA-Konzentration in Paprika-Blättern signifikant zu erhöhen.

In weiterführenden Experimenten könnte quantitativ ermittelt werden, ob T3E von *Xcv* zur Erhöhung der ABA-Konzentration in infiziertem Blattgewebe führen. Dazu könnte die ABA-Konzentration in Blattgewebe nach Inokulation des WT-Stammes im Vergleich zu einem T3SS-defizienten Stamm untersucht werden.

4.6 XopL könnte die Virulenz von *Xcv* auf verschiedene Weise begünstigen

4.6.1 ARIA ist ein mögliches Zielprotein von XopL

Verschiedene Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass der „core“-T3E XopL mittels E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zur Virulenz von *Xcv* beiträgt, indem er ABA-assoziierte Pflanzenprozesse beeinflusst. So wurde mittels Microarray festgestellt, dass die transiente Expression von *xopL* in Tomatenpflanzen zu einer signifikant veränderten Transkriptakkumulation von Genen führt, deren Genprodukte dem ABA-Signalweg zugeordnet werden können (O. Müller, U. Bonas, unpubliziert). Im Gegensatz dazu führten XopQ, XopS, XopI, XopB und XopG nicht zu veränderter Transkriptakkumulation ABA-assoziiierter Gene (O. Müller, U. Bonas, unpubliziert). Weiterhin führt bei der *A. thaliana-Pto*-Interaktion AvrPtoB mittels E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zum Anstieg der ABA-Konzentration (de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

Bei der Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System wurde ARIA („ARM repeat protein interacting with ABF2“) überdurchschnittlich häufig als möglicher Interaktor von XopL und/oder XopLm identifiziert. In *A. thaliana* wurde ARIA als Interaktor und Regulator von ABF2 („abscisic acid responsive elements-binding factor 2“) identifiziert (Kim *et al.*, 2004a). ABF2 bindet an das ABRE-Promotorelement („ABA-responsive element“) und ist involviert in der ABA- und Stressantwort (Kim *et al.*, 2004b). In *A. thaliana* hat ABF2 sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf ABA-assoziierte Prozesse, z. B. den inhibitorischen Einfluss von ABA auf Keimung, Wurzel- und Keimblattwachstum oder erhöhte Wasserstress- und Salzstress-Toleranz und ist eine essenzielle Komponente der Glukose-Antwort (Kim *et al.*, 2004b). Ein direkter Einfluss von ARIA auf die Pflanzenabwehr ist nicht bekannt, aber die bioinformatische Analyse der *SlARIA*-Primärstruktur identifizierte u. a. eine mögliche MAPK-Phosphorylierungsstelle und MAPK-Interaktionsmotive (Abbildung 30). Dies könnte bedeuten, dass ARIA durch eine aktive MAPK modifiziert wird und infolgedessen die Aktivität weiterer Proteine, z. B. ABF2, moduliert (Abbildung 37).

Obwohl die Interaktion von ARIA mit XopL *in planta* bislang nicht bestätigt werden konnte, deutet die reduzierte *CaARIA*- und *SlARIA*-Akkumulation in Abhängigkeit der enzymatischen XopL-Aktivität darauf hin, dass *CaARIA* und *SlARIA* pflanzliche Zielproteine von XopL sind. Möglicherweise bindet und ubiquitiniert XopL *SlARIA* und *CaARIA*, was häufig zum Proteinabbau durch das Proteasom führt (Weissman *et al.*, 2011; Varshavsky, 2012). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in *in planta*-Interaktionsstudien mit XopL und ARIA bisher keine Interaktion nachgewiesen wurde. In zukünftigen Interaktionsstudien sollte XopLm verwendet werden, da dieses das ARIA-Level im Vergleich zu XopL weniger negativ beeinflusst und infolgedessen möglicherweise stärker oder dauerhafter mit ARIA interagiert. Zudem könnten *in vitro*-Experimente zeigen, ob ARIA ein Substrat von XopL ist. Ähnlich wie von Singer *et al.* (2013) beschrieben, könnte ein *in vitro*-Ubiquitinierungsexperiment mit rekombinantem XopL und ARIA durchgeführt werden. Außerdem könnte untersucht werden, ob die XopL-E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zum proteasomalen *in planta*-Abbau von ARIA führt. Dazu könnte überprüft werden, ob XopL auch bei Anwesenheit eines Proteasom-Inhibitors (z. B. MG132) einen negativen Einfluss auf die ARIA-Akkumulation hat. Obwohl die *NbARIA*-Transkriptmengen in *N. benthamiana* durch VIGS auf etwa 20% gesenkt wurden, waren die Zelltodreaktionen nach transienter Synthese von XopL oder AvrBsT, die NWR-Reaktionen nach *Xcv*-Inokulation und die wässrigen Läsionen nach 85-10 Δ *xopQ*-Inokulation unverändert. Möglicherweise war die Akkumulation von *NbARIA* in *Silencing*-Pflanzen immer noch ausreichend, um dessen biologische Funktion zu erfüllen oder andere Proteine mit ähnlicher Funktion kompensieren die Reduktion von *NbARIA*-Transkripten. Schließlich könnten die verwendeten Experimente nicht sensitiv genug gewesen sein, um einen Einfluss des *Silencing* festzustellen. Zukünftig könnte ein möglicher Einfluss des *ARIA-Silencing* auf die Transkriptmengen von Abwehrrelevanten Genen und das *in planta*-Wachstum von 85-10 Δ *xopQ* analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ABA-Applikation bei Tomaten die Pflanzenabwehr negativ, bzw. die *Xcv*-Virulenz positiv beeinflusst. Deshalb erscheint es naheliegend, dass der negative Einfluss von XopL auf die ARIA-Abundanz eher einen positiven Einfluss auf ABA-Akkumulation oder ABA-Antwort hat (Modell Abbildung 37). Dieser Theorie steht entgegen, dass ARIA in *A. thaliana* eher einen positiven Einfluss auf die Expression verschiedener Gene der ABA-Antwort hatte (Kim *et al.*, 2004b). Weiterführende Studien könnten klären, ob und in welcher Weise XopL die pflanzliche ABA-Konzentration beeinflusst und ob die postulierte Rolle von ARIA als Zielprotein von MAPK zutrifft. Seit der Identifizierung von *AtARIA* als Interaktor und Regulator von ABF2 wurden keine weiteren Erkenntnisse zu ARIA-Proteinen erlangt. Ein ungerichteter experimenteller Ansatz, z. B. die Sichtung einer cDNA-Bibliothek mittels Y2H-System, könnte zeigen, ob ARIA neben ABF2 noch weitere Proteine bindet und Teil eines größeren regulatorischen Netzwerkes ist.

4.6.2 XopL beeinflusst die Chloroplastenposition

Neben ARIA wurden 20 weitere mögliche XopL-Interaktoren identifiziert (Tabelle 12). Darunter waren auch ARC6 („accumulation and replication of chloroplasts 6“) und CHUP1 („chloroplast unusual positioning 1“). Während ARC6 in der inneren Chloroplastenmembran lokalisiert und an der Teilung von Chloroplasten beteiligt ist (Osteryoung und Pyke, 2014), lokalisiert CHUP1 an der zytoplasmatischen Chloroplastenoberfläche (Oikawa *et al.*, 2008). CHUP1 polymerisiert sogenannte Chloroplasten-Aktin-Filamente, wodurch sich Chloroplasten innerhalb der Zelle, insbesondere entlang der Plasmamembran, bewegen (Wada, 2013). Außerdem ist CHUP1 für das Verankern von Chloroplasten an der Plasmamembran verantwortlich (Kong und Wada, 2014). In *A. thaliana chup1*-Mutanten sind Chloroplasten nicht mehr mit der Plasmamembran verankert und akkumulieren an der Zellunterseite, rund um dem Zellkern (Kong und Wada, 2014). Eine Interaktion von XopL mit CHUP1 könnte deshalb eine ungewöhnliche Chloroplastenposition innerhalb der Zelle zur Folge haben, was experimentell untersucht wurde. Tatsächlich hatte die transiente Synthese von XopL in *N. tabacum* einen starken, signifikanten Anstieg Kern-assoziiierter Chloroplasten zur Folge (Abbildung 32). Im Vergleich zu XopL führt die transiente Synthese von CTD oder LRR nur zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg Kern-assoziiierter Chloroplasten (Abbildung 32). Dies lässt vermuten, dass die spezifische Ubiquitinierung eines Pflanzenproteins für die starke Chloroplasten-Akkumulation um den Kern verantwortlich ist. In weiteren Studien könnte untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen XopL und CHUP1 zur CHUP1-Degradation führt, was dann wiederum zur Chloroplasten-Akkumulation am Kern führt.

Eine vermehrte Anlagerung von Chloroplasten an den Zellkern wird in *N. benthamiana* ebenfalls durch eine erhöhte Cytokinin-Konzentration hervorgerufen (Erickson *et al.*, 2014), sodass die Anwesenheit von XopL möglicherweise auch zu einem Anstieg des pflanzlichen Cytokinin-Gehaltes führt. Zahlreiche *A. tumefaciens*-Stämme kodieren ein trans-Zeatin Synthese-Gen (*tzs*) und synthetisieren Cytokinin, welches im Pflanzengewebe akkumuliert (Erickson *et al.*, 2014). Für die

transiente Synthese von XopL wurden die *A. tumefaciens*-Stämme GV3101 und GV2260 verwendet, die beide *tzs* kodieren. Für die Infiltration von GV3101 in *N. benthamiana* ist bekannt, dass ein Anstieg Kern-assoziiierter Chloroplasten von durchschnittlich 1 - 2 (in nicht behandeltem Blattgewebe) auf 4 - 6 stattfindet (Erickson et al., 2014). Dies entspricht den in dieser Arbeit ermittelten Werten der Negativkontrollen (Abbildung 32C).

Es ist zu beachten, dass XopL in *N. benthamiana* eine langsame Zelltodreaktion auslöst (Singer et al., 2013) und die vermehrte Anlagerung von Chloroplasten an den Zellkern mit dieser Zelltodreaktion einhergehen könnte. Obwohl dieser Phänotyp bisher nicht als Charakteristikum von Abwehrreaktionen beschrieben wurde, ist bekannt, dass eine Interaktion zwischen Chloroplasten und Zellkern während Abwehrreaktionen stattfindet (Caplan et al., 2015). Insbesondere während ETI-Reaktionen bilden Chloroplasten tubuläre Verbindungen (sog. Stromuli) zum Zellkern, durch die vermutlich Chloroplasten-lokalisierte Proteine und Signalmoleküle wie H₂O₂ in den Kern gelangen, um dort eine Zelltodreaktion auszulösen (Caplan et al., 2015). Interessanterweise führte *chup1*-Silencing in *N. benthamiana* oder -Knockout in *A. thaliana* zur konstitutiven Stromuli-Induktion und zu stärkeren Zelltodreaktionen (Caplan et al., 2015). So führte die R-Gen-vermittelte Erkennung von p50 aus TMV („Tobacco Mosaic Virus“) in *N. benthamiana* zu einer chlorotischen Reaktion, wohingegen sie in *chup1*-Silencing-Pflanzen zu einer HR-ähnlichen Zelltodreaktion führte (Caplan et al., 2015). Die Interaktion zwischen Chloroplasten und Zellkern hat also auch maßgeblichen Einfluss darauf, ob ETI-Reaktionen zu einer Chlorose oder zu Zelltodreaktionen führen. Möglicherweise manipuliert XopL Pflanzenabwehrreaktionen indem es die Lokalisierung der Chloroplasten beeinflusst.

4.6.3 Weitere mögliche Zielproteine von XopL sind divers und könnten die Pflanzen-Pathogen-Interaktion beeinflussen

Die Sichtung der cDNA-Bibliothek lieferte weitere Kandidaten für XopL-Zielproteine; mit deren Charakterisierung bereits begonnen wurde. Auch bisher nicht näher untersuchte mögliche XopL-Interaktoren könnten einen Hinweis zur biologischen Relevanz von XopL liefern, z. B. das CDPK5-ähnliche Protein, das zweimal bei der Sichtung der cDNA-Bibliothek identifiziert wurde (PixL6, Tabelle 12). CDPK5 ist eine Kalzium-abhängige Protein-Kinase mit wichtiger Funktion bei der PTI. In *A. thaliana* und *S. tuberosum* phosphoryliert und aktiviert CDPK5 *AtRbohD* bzw. *StRbohB* („Respiratory burst oxidase homologue“) (Kobayashi et al., 2007; Dubiella et al., 2013). Aktives Rboh katalysiert die Synthese von Superoxid-Anionen (O₂⁻), woraufhin Wasserstoffperoxid H₂O₂ gebildet und ein ROS-„burst“ induziert wird (siehe auch Abbildung 2) (Dubiella et al., 2013).

Ein weiteres mögliches Zielprotein von XopL ist *CaITSN1*, dessen Proteinakkumulation in Abhängigkeit der enzymatischen XopL-Aktivität deutlich abnimmt (Abbildung 33). Dies könnte bedeuten, dass XopL *CaITSN1* binden und ubiquitiniert, woraufhin es proteasomal abgebaut wird. Da Intersectin-1 (ITSN1) hauptsächlich in Vertebraten charakterisiert ist, ist eine mögliche biologische

Relevanz eines XopL-vermittelten ITSN1-Abbaus sehr spekulativ. In Vertebraten fungiert ITSN1 häufig als Adaptorprotein bei der Endozytose, der Exozytose, der Signaltransduktion und bei der Umlagerung des Aktin-Skeletts (Gubar *et al.*, 2013).

Überraschenderweise hatte die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL einen positiven Einfluss auf die Proteinakkumulation eines weiteren möglichen XopL-Interaktors, *SIHMGR2* (Abbildung 33). HMGR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase) ist ein Schlüsselenzym des Mevalonatwegs, in dem aus Acetyl-CoA Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet wird (Abbildung 37), das beispielsweise Ausgangspunkt für die Synthese von Cytokinen, Brassinosteroiden und Phytoalexinen ist (Antolin-Llovera *et al.*, 2011). In *C. annuum* steigt das *HMGR2*-Transkriptlevel nach *Phytophthora capsici*-Infektion stark an, wodurch vermutlich verstärkt antimikrobiell wirkende Phytoalexine gebildet werden (Ha *et al.*, 2003). Phytoalexine werden beispielsweise auch von *A. thaliana* während einer HR nach *P. s. pv. syringae*-Infektion gebildet (Tsuji *et al.*, 1992). In *N. tabacum* induzieren Cytokine, die Bildung von Phytoalexinen als Abwehrmechanismus gegen *P. s. pv. tabaci* (Grosskinsky *et al.*, 2014). Interessanterweise wurde dabei ein Cytokinin-ABA-Antagonismus festgestellt, denn die ABA-Applikation vor der Infektion hatte einen negativen Einfluss auf die Pflanzenabwehr, was mit einer reduzierten Cytokinin- und Phytoalexinbildung einhergeht (Grosskinsky *et al.*, 2014).

Damit wurde sowohl ein positiver als auch negativer Einfluss der XopL-E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität auf mögliche Zielproteine nachgewiesen (s. auch Abbildung 37). Die post-translationelle Ubiquitinierung zeichnet sich durch große Variationsmöglichkeiten aus. So können Proteine mono-ubiquitiniert oder poly-ubiquitiniert werden, wobei Poly-Ubiquitin-Ketten über 7 verschiedene Ubiquitin-Lysine (K) oder dessen N-terminus miteinander verknüpft werden können (Kulathu und Komander, 2012). Die Art der Ubiquitinierung ist entscheidend für das Schicksal des Substrates, beispielsweise werden Proteine mit K11- oder K48-Ubiquitin-Ketten meist proteasomal abgebaut, Ubiquitinierung kann aber auch Protein-Aktivität und -Lokalisierung beeinflussen (Husnjak und Dikic, 2012; Sadowski *et al.*, 2012). Singer *et al.* (2013) zeigten, dass XopL *in vitro* und *in planta* Ubiquitin-Ketten bildet, bei denen Ubiquitine hauptsächlich über das Ubiquitin-Lysin K11 und in geringem Maße auch über K33, K48 und K63 verknüpft werden. In weiteren Studien könnte analysiert werden, ob der differenzielle Einfluss der XopL-Aktivität auf mögliche XopL-Substrate darin begründet liegt, dass Substrate mit unterschiedlichen Ubiquitin-Markierungen versehen werden. Besonderer Fokus könnte auf die XopL-E3-Ligase-Aktivität-abhängige *SIHMGR2*-Akkumulation gelegt werden, da eine Akkumulation ubiquitiniertes Proteine sehr ungewöhnlich ist.

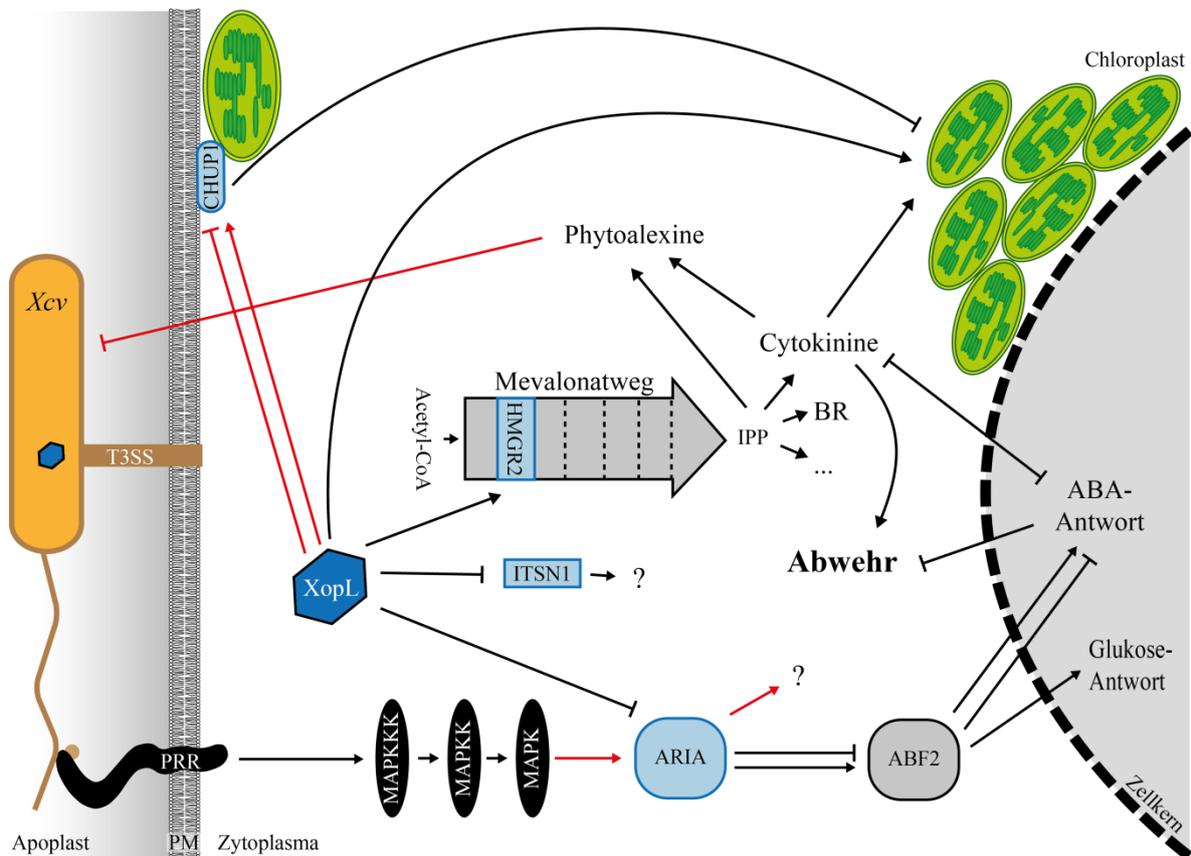


Abbildung 37. Modell der XopL-abhängigen Manipulation von Pflanzenzellen.

In dieser Arbeit wurden u. a. ARIA, ITSN1, HMGR2 und CHUP1 als mögliche XopL-Zielproteine identifiziert (hellblau). Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von XopL beeinflusst die Proteinlevel von CHUP1, ITSN1 und ARIA negativ und von HMGR2 positiv. Die möglichen Zielproteine sind involviert in verschiedene pflanzliche Stoffwechselwege. Rote Pfeile kennzeichnen spekulative Verbindungen, wohingegen schwarze Pfeile experimentell validierte Verknüpfungen darstellen, wobei diese Experimente u. U. in verschiedenen Pflanzen durchgeführt wurden. IPP, Isopentenylpyrophosphat; BR, Brassinosteroide; T3SS, Typ III-Sekretionssystem; PM, periplasmatische Membran; PRR, „pattern recognition receptor“.

4.7 Ansatzpunkte für die Charakterisierung weiterer Effektoren

Verschiedene Ergebnisse dieser Arbeit könnten Ansatzpunkte für die Analyse weiterer Effektoren darstellen. Bei der Charakterisierung der Reaktionen von 86 Linien der *Solanaceae* auf T3E-Synthese reagierten verschiedene Linien makroskopisch auf die Effektoren XopC, XopO, XopK und XopV. Von diesen Effektoren war zuvor nicht bekannt, dass sie sichtbare Pflanzenreaktionen auslösen, sodass nun Proteinbereiche oder Aminosäuren der T3E identifiziert werden könnten, die für diese Reaktionen essenziell sind. Dies wurde bereits erfolgreich für den Effektor XopC begonnen, indem verschiedene XopC-Derivate in *S. americanum*-Linien untersucht wurden. Dabei wurden As identifiziert deren Substitution zu stärkeren, aber auch zu schwächeren Pflanzenreaktionen führen (A. Banik, U. Bonas, unpubliziert).

Außerdem wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch die phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen SIPK und WIPK von *N. benthamiana* bindet, ein hemmender Einfluss von XopE1 und XopV auf die Aktivierung dieser MAP-Kinasen nach PAMP-Infiltration nachgewiesen (Abbildung 24). Damit interferieren XopE1 und XopV mit einem hoch konservierten Signalweg der Pflanzenabwehr. Auf welche Komponente der MAPK-Kaskade die Effektoren genau wirken und ob die Regulation auf

transkriptioneller, translationeller oder post-translationeller Ebene stattfindet, könnte in weiteren Studien thematisiert werden. Schließlich könnte beispielsweise untersucht werden, ob das von XopE1 bekannte N-Myristoylierungsmotiv oder dessen vermutete enzymatische Transglutaminase-Aktivität für die verminderte MAPK-Aktivierung von Bedeutung ist.

Schließlich wurde in dieser Arbeit eine *in planta*-Interaktion zwischen XopQ und XopS beobachtet und festgestellt, dass deren gemeinsame Synthese in *N. benthamiana* eine stärkere Pflanzenreaktion auslöst, als deren einzelne Synthese. Zukünftig könnte untersucht werden, ob die Interaktion direkt oder indirekt, beispielsweise über 14-3-3-Proteine, stattfindet, ob die Doppeldeletion von *xopQ* und *xopS* die Virulenz von *Xcv* beeinflusst, und ob die Ko-Synthese mit XopS auch in Kombination mit anderen T3E zu verstärkten Pflanzenreaktionen führt. Die Interaktion zwischen XopQ und XopS ist besonders, denn auch nach intensiver Literaturrecherche wurde kein weiteres T3E-Paar von pflanzenpathogenen Bakterien ermittelt, dass *in planta* miteinander interagiert. Vermutlich ist die Ursache dafür, dass T3E meist einzeln charakterisiert werden, obwohl bei einer Infektion zahlreiche verschiedene T3E in die Pflanzenzelle transloziert werden. Zukünftige Studien könnten sich verstärkt zum Ziel nehmen, ein Wechselspiel zwischen verschiedenen T3E *in planta* zu identifizieren und damit eine neue Ebene der T3E-Charakterisierung eröffnen.

5 Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Antolin-Llovera, M., Leivar, P., Arro, M., Ferrer, A., Boronat, A. und Campos, N. (2011). Modulation of plant HMG-CoA reductase by protein phosphatase 2A: positive and negative control at a key node of metabolism. *Plant Signal Behav* **6**, 1127-1131.
- Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. und Yang, B. (2010). Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* **22**, 3864-3876.
- Asselbergh, B., Achuo, A.E., Höfte, M. und Van Gijsegem, F. (2008). Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Pathol* **9**, 11-24.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. und Höfte, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol* **144**, 1863-1877.
- Audenaert, K., De Meyer, G.B. und Höfte, M.M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol* **128**, 491-501.
- Backman, K., Ptashne, M. und Gilbert, W. (1976). Construction of plasmids carrying the cI gene of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 4174-4178.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D. und Dangl, J.L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7**, e1002132.
- Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U.Z. und Börnke, F. (2009). The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 655-664.
- Bassel, G.W., Mullen, R.T. und Bewley, J.D. (2008). *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *J Exp Bot* **59**, 585-593.
- Becker, A. und Vorhölter, F.-J. (2009). Xanthan biosynthesis by *Xanthomonas* bacteria: an overview of the current biochemical and genomic data. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*, 1-12.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D. und Dangl, J.L. (2004). Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* **16**, 2822-2835.
- Bergelson, J., Kreitman, M., Stahl, E.A. und Tian, D. (2001). Evolutionary dynamics of plant *R*-genes. *Science* **292**, 2281-2285.
- Bigeard, J., Colcombet, J. und Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* **8**, 521-539.
- Boch, J. und Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 419-436.
- Boch, J., Bonas, U. und Lahaye, T. (2014). TAL effectors—pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytol* **204**, 823-832.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V., Staskawicz, B.J. und Stall, R.E. (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **4**, 88.
- Bonas, U., Stall, R.E. und Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* **218**, 127-136.

- Brunner, F. und Nürnberger, T. (2012). Identification of immunogenic microbial patterns takes the fast lane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4029-4030.
- Buscaill, P. und Rivas, S. (2014). Transcriptional control of plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **20**, 35-46.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 262-310.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2002). Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* **10**, 186-192.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 107-133.
- Büttner, D. und He, S.Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150**, 1656-1664.
- Büttner, D., Noël, L., Stuttmann, J. und Bonas, U. (2007). Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1063-1074.
- Caplan, J.L., Kumar, A.S., Park, E., Padmanabhan, M.S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K. und Dinesh-Kumar, S.P. (2015). Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Dev cell* **34**, 45-57.
- Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Peres, L.E.P., Atares, A. und Garcia-Martinez, J.L. (2012). Characterization of the *procera* tomato mutant shows novel functions of the SIDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiol* **160**, 1581-1596.
- Carter, P. (1986). Site-directed mutagenesis. *Biochem J* **237**, 1.
- Cernadas, R.A., Doyle, E.L., Niño-Liu, D.O., Wilkins, K.E., Bancroft, T., Wang, L., Schmidt, C.L., Caldo, R., Yang, B., White, F.F., Nettleton, D., Wise, R.P. und Bogdanove, A.J. (2014). Code-assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene. *PLoS Pathog* **10**, e1003972.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R. und Frommer, W.B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207-211.
- Cheong, M.S., Kirik, A., Kim, J.-G., Frame, K., Kirik, V. und Mudgett, M.B. (2014). AvrBsT acetylates *Arabidopsis* ACIP1, a protein that associates with microtubules and is required for immunity. *PLoS Pathog* **10**, e1003952.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. und Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803-814.
- Christie, P.J., Whitaker, N. und González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1578-1591.
- Clarkson, J.J., Kelly, L.J., Leitch, A.R., Knapp, S. und Chase, M.W. (2010). Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. *Mol Phylogenet Evol* **55**, 99-112.
- Clarkson, J.J., Knapp, S., Garcia, V.F., Olmstead, R.G., Leitch, A.R. und Chase, M.W. (2004). Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* **33**, 75-90.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H. und Thomma, B.P. (2015). Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu Rev Phytopathol* **53**, 541-563.
- Cui, H., Tsuda, K. und Parker, J.E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 487-511.
- Dangl, J.L., Horvath, D.M. und Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**, 746-751.
- Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyc, M.K., Byrde, R.J. und 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 Torres-Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bölter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnov, N. und Grant, M.

- (2015). Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nat Plants* **1**, 15074.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bögre, L. und Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* **26**, 1434-1443.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. und Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777-4788.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D. und Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci* **4**, 1-12.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Davey, N.E., Weatheritt, R.J., Born, D., Speck, T., Krüger, D., Grebnev, G., Kubań, M., Strumillo, M., Uyar, B., Budd, A., Altenberg, B., Seiler, M., Chemes, L.B., Glavina, J., Sánchez, I.E., Diella, F. und Gibson, T.J. (2013). The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res*, gkt1047.
- Dodds, P.N. und Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**, 539-548.
- Dou, D. und Zhou, J.-M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* **12**, 484-495.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.-P., Schulze, W.X. und Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 8744-8749.
- Eitas, T.K., Nimchuk, Z.L. und Dangl, J.L. (2008). *Arabidopsis* TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6475-6480.
- Ellis, J., Dodds, P. und Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 278-284.
- Engler, C., Kandzia, R. und Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**, e3647.
- Erickson, J.L., Ziegler, J., Guevara, D., Abel, S., Klösgen, R.B., Mathur, J., Rothstein, S.J. und Schattat, M.H. (2014). Agrobacterium-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays. *BMC Plant Biology* **14**, 127.
- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L.D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. und Gagnevin, L. (2013). Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Mol Plant Pathol* **14**, 483-496.
- Escolar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. und Bonas, U. (2001). Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol* **2**, 287-296.
- Fan, J. und Doerner, P. (2012). Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: complex, yes; silver bullet, no. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 400-406.
- Ferrante, P., Clarke, C.R., Cavanaugh, K.A., Micheltore, R.W., Buonauro, R. und Vinatzer, B.A. (2009). Contributions of the effector gene *hopQ1-1* to differences in host range between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *P. syringae* pv. *tabaci*. *Mol Plant Pathol* **10**, 837-842.
- Figurski, D.H. und Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 1648-1652.
- Gerlach, R.G. und Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401-415.
- Gietz, R.D. und Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat protoc* **2**, 31-34.

- Jimenez-Ibanez, S., Boter, M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J.P. und Solano, R. (2014). The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **12**, e1001792.
- Jimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. und Rathjen, J.P. (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* **19**, 423-429.
- Giska, F., Lichocka, M., Piechocki, M., Dadlez, M., Schmelzer, E., Hennig, J. und Krzymowska, M. (2013). Phosphorylation of HopQ1, a type III effector from *Pseudomonas syringae*, creates a binding site for host 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* **161**, 2049-2061.
- Goel, A.K., Lundberg, D., Torres, M.A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J.L. und Grant, S.R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 361-370.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W. und Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**, 1824-1832.
- González, V.M., Müller, S., Baulcombe, D. und Puigdomènech, P. (2015). Evolution of NBS-LRR gene copies among Dicot plants and its regulation by members of the miR482/2118 superfamily of miRNAs. *Mol Plant* **8**, 329-331.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H. und Schubert, T.S. (2002). Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Prog* **10**.
- Grosskinsky, D.K., van der Graaff, E. und Roitsch, T. (2014). Abscisic Acid-Cytokinin Antagonism Modulates Resistance Against *Pseudomonas syringae* in Tobacco. *Phytopathology* **104**, 1283-1288.
- Gubar, O., Morderer, D., Tsyba, L., Croisé, P., Houy, S., Ory, S., Gasman, S. und Rynditch, A. (2013). Intersectin: the crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis. *Front Endocrinol* **4**.
- Gupta, M.K., Nathawat, R., Sinha, D., Haque, A.S., Sankaranarayanan, R. und Sonti, R.V. (2015). Mutations in the Predicted Active Site of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XopQ Differentially Affect Virulence, Suppression of Host Innate Immunity, and Induction of the HR in a Nonhost Plant. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 195-206.
- Gürlebeck, D. (2007). Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gürlebeck, D., Jahn, S., Gürlebeck, N., Szczesny, R., Szurek, B., Hahn, S., Hause, G. und Bonas, U. (2009). Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4. *Mol Plant Pathol* **10**, 175-188.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. und Park, S.W. (2012). Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiol Mol Plant Pathol* **78**, 51-65.
- Ha, S.-H., Kim, J.-B., Hwang, Y.-S. und Lee, S.-W. (2003). Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochim Biophys Acta* **1625**, 253-260.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T. und Poussier, S. (2009). A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* **4**, e6632.
- Hann, D.R., Dominguez-Ferreras, A., Motyka, V., Dobrev, P.I., Schornack, S., Jehle, A., Felix, G., Chinchilla, D., Rathjen, J.P. und Boller, T. (2013). The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytol* **201**, 585-598.
- Harrison, E., Burbidge, A., Okyere, J., Thompson, A.J. und Taylor, I.B. (2011). Identification of the tomato ABA-deficient mutant sitiens as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis. *Plant Growth Regul* **64**, 301-309.
- Hayward, A. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Springer, pp. 1-119.
- Heath, M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 315-319.

- Ho, Y.-P., Tan, C.M., Li, M.-Y., Lin, H., Deng, W.-L. und Yang, J.-Y. (2013). The AvrB_AvrC domain of AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required to elicit plant defense responses and manipulate ABA homeostasis. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 419-430.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R., Van Montagu, M. und Schell, J. (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**, 212-230.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. und Mudgett, M.B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol* **50**, 377-389.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. und Bonas, U. (1998). *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* **29**, 1379-1390.
- Husnjak, K. und Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* **81**, 291-322.
- Inada, N. und Ueda, T. (2014). Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol* **55**, 672-686.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B. und Stebbins, C.E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* **311**, 222-226.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L. und Greenberg, J.T. (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol* **17**, 499-508.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E. und Schaad, N.W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**, 755-762.
- Jones, J.D. und Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jones, M.G. (1987). Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. *Planta* **172**, 280-284.
- Kadota, Y., Shirasu, K. und Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiol* **56**, 1472-1480.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M. und Wada, M. (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829-832.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648-651.
- Kearney, B. und Staskawicz, B.J. (1990). Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature* **346**, 385-386.
- Kim, J.-G., Stork, W. und Mudgett, M.B. (2013). *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SIERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host Microbe* **13**, 143-154.
- Kim, J.G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., McLane, H., Martin, G.B. und Mudgett, M.B. (2009). *Xanthomonas* T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. *Plant Cell* **21**, 1305-1323.
- Kim, N.H., Choi, H.W. und Hwang, B.K. (2010). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector AvrBsT induces cell death in pepper, but suppresses defense responses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1069-1082.
- Kim, S., Choi, H.-i., Ryu, H.-J., Park, J.H., Kim, M.D. und Kim, S.Y. (2004a). ARIA, an *Arabidopsis* arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant Physiol* **136**, 3639-3648.
- Kim, S., Kang, J.Y., Cho, D.I., Park, J.H. und Kim, S.Y. (2004b). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* **40**, 75-87.
- Knoop, V., Staskawicz, B. und Bonas, U. (1991). Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol* **173**, 7142-7150.

- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. und Yoshioka, H. (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**, 1065-1080.
- Koebnik, R., Krüger, A., Thieme, F., Urban, A. und Bonas, U. (2006). Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol* **188**, 7652-7660.
- Kong, S.G. und Wada, M. (2014). Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 522-530.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. und Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 10171-10176.
- Kulathu, Y. und Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 508-523.
- Lanahan, M.B., Yen, H.-C., Giovannoni, J.J. und Klee, H.J. (1994). The *never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell Online* **6**, 521-530.
- Lee, J., Chung, J.H., Kim, H.M., Kim, D.W. und Kim, H. (2015). Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnol J*, doi: 10.1111/pbi.12465.
- Leister, D. (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. *Trends Genet* **20**, 116-122.
- Li, W., Chiang, Y.H. und Coaker, G. (2013a). The HopQ1 effector's nucleoside hydrolase-like domain is required for bacterial virulence in arabidopsis and tomato, but not host recognition in tobacco. *PLoS One* **8**, e59684.
- Li, W., Yadeta, K.A., Elmore, J.M. und Coaker, G. (2013b). The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant Physiol* **161**, 2062-2074.
- Li, X., Kapos, P. und Zhang, Y. (2015). NLRs in plants. *Curr Opin Immunol* **32**, 114-121.
- Lindeberg, M., Cunnac, S. und Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol* **20**, 199-208.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D. und Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One* **7**, e46451.
- Liu, Q., Yuan, M., Zhou, Y., Li, X., Xiao, J. und Wang, S. (2011). A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant Cell And Environ* **34**, 1958-1969.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. und Dinesh-Kumar, S. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**, 415-429.
- Livne, S., Lor, V.S., Nir, I., Eliaz, N., Aharoni, A., Olszewski, N.E., Eshed, Y. und Weiss, D. (2015). Uncovering DELLA-Independent Gibberellin Responses by Characterizing New Tomato *procera* Mutants. *Plant Cell* **27**, 1579-1594.
- Locascio, A., Blázquez, M.A. und Alabádf, D. (2013). Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol* **54**, 1229-1237.
- Lorenz, C. und Büttner, D. (2009). Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **191**, 1414-1428.
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. und Büttner, D. (2008). HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* **69**, 344-360.
- Ma, W., Dong, F.F., Stavrinides, J. und Guttman, D.S. (2006). Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet* **2**, (12): e209.
- Macho, A.P., Guevara, C.M., Tornero, P., Ruiz-Albert, J. und Beuzon, C.R. (2010). The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytol* **187**, 1018-1033.
- Macho, A.P., Schwessinger, B., Ntoukakis, V., Brutus, A., Segonzac, C., Roy, S., Kadota, Y., Oh, M.-H., Sklenar, J., Derbyshire, P., Lozano-Durán, R., Gro Malinovsky, F., Monaghan, J., Menke,

- F.L., Huber, S.C., He, S.Y. und Zipfel, C. (2014). A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* **343**, 1509-1512.
- Macho, A.P. und Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol* **23**, 14-22.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Dangl, J.L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. und Dangl, J.L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743-754.
- Malinovskiy, F.G., Fangel, J.U. und Willats, W.G. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci* **5**, 178.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G. und Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 614-629.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. und 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.
- Ménard, R., Sansonetti, P.J. und Parsot, C. (1993). Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**, 5899-5906.
- Meng, X. und Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 245-266.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C.Q., Sady, B.A., Clark, E.T. und Staskawicz, B.J. (2005). The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **41**, 801-814.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics.
- Minsavage, G., Dahlbeck, D., Whalen, M., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. und Stall, R. (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 41-47.
- Mohr, P.G. und Cahill, D.M. (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Funct Plant Biol* **30**, 461-469.
- Monaco, M.K., Stein, J., Naithani, S., Wei, S., Dharmawardhana, P., Kumari, S., Amarasinghe, V., Youens-Clark, K., Thomason, J., Preece, J., Pasternak, S., Olson, A., Jiao, Y., Lu, Z., Bolser, D., Kerhornou, A., Staines, D., Walts, B., Wu, G., D'Eustachio, P., Haw, R., Croft, D., Kersey, P.J., Stein, L., Jaiswal, P. und Ware, D. (2014). Gramene 2013: comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Res* **42**, D1193-1199.
- Morales, C., Posada, J., Macneale, E., Franklin, D., Rivas, I., Bravo, M., Minsavage, J., Stall, R. und Whalen, M. (2005). Functional analysis of the early chlorosis factor gene. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 477-486.
- Morbitzer, R., Elsaesser, J., Hausner, J. und Lahaye, T. (2011). Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res* **39**, 5790-5799.
- Moreira, L.M., Almeida, N.F., Jr., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., da Silva, A.C., da Silva, A.M., de Moraes, F.E., de Oliveira, J.C., de Souza, R.F., Facincani, A.P., Ferraz, A.L., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gimenez, D.F., Jones, J.B., Kitajima, E.W., Laia, M.L., Leite, R.P., Jr., Nishiyama, M.Y., Rodrigues Neto, J., Nociti, L.A., Norman, D.J., Ostroski, E.H., Pereira, H.A., Jr., Staskawicz, B.J., Tezza, R.I., Ferro, J.A., Vinatzer, B.A. und Setubal, J.C. (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* **11**, 238.
- Morita, M.T. und Nakamura, M. (2012). Dynamic behavior of plastids related to environmental response. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 722-728.
- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U. und Staskawicz, B.J. (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the

- Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13324-13329.
- Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y. und Mukaiharu, T. (2014). *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Mol Plant Pathol* **15**, 297-303.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. und Jones, J.D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**, 650-655.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. und Jones, J.D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* **135**, 1113-1128.
- Niks, R.E. und Marcel, T.C. (2009). Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytol* **182**, 817-828.
- Nino-Liu, D.O., Ronald, P.C. und Bogdanove, A.J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol* **7**, 303-324.
- Noël, L., Thieme, F., Gabler, J., Büttner, D. und Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, Two Novel Type III Effector Proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **185**, 7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **41**, 1271-1281.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und Bonas, U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol* **184**, 1340-1348.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S. und Bolwell, G.P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765-779.
- OECD und FAO (2015) OECD/FAO Agricultural Organization of the United Nations (2015), OECD-FAO *Agricultural Outlook 2015*. OECD Publishing, Paris.
- Oh, S.-K., Lee, S., Chung, E., Park, J.M., Yu, S.H., Ryu, C.-M. und Choi, D. (2006). Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. *Planta* **223**, 1101-1107.
- Oikawa, K., Yamasato, A., Kong, S.-G., Kasahara, M., Nakai, M., Takahashi, F., Ogura, Y., Kagawa, T. und Wada, M. (2008). Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiol* **148**, 829-842.
- Osteryoung, K.W. und Pyke, K.A. (2014). Division and dynamic morphology of plastids. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 443-472.
- Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.C. und Genin, S. (2013). Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics* **14**, 859.
- Pieretti, I., Pesic, A., Petras, D., Royer, M., Süßmuth, R.D. und Cociancich, S. (2015). What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? *Front Plant Sci* **6**, 289.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. und Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308-316.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. und Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 489-521.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J. und Jones, J.B. (2011). Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* **12**, 146.
- Potnis, N., Minsavage, G., Smith, J.K., Hurlbert, J.C., Norman, D., Rodrigues, R., Stall, R.E. und Jones, J.B. (2012). Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 307-320.

- Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J.D., Paret, M.L., Vallad, G.E. und Jones, J.B. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Mol Plant Pathol*, 10.1111/mpp.12244.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D. und Sonti, R.V. (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett* **415**, 125-128.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. und Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 317-343.
- Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J. und Mudgett, M.B. (2004). A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16624-16629.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. und Lahaye, T. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* **318**, 645-648.
- Ronald, P.C. und Staskawicz, B.J. (1988). The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol Plant Microbe Interact* **1**, 191-198.
- Ryan, R.P., Vorholter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J. und Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* **9**, 344-355.
- Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A.R., Roesley, S.N. und Sarcevic, B. (2012). Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* **64**, 136-142.
- Salomon, D., Dar, D., Sreeramulu, S. und Sessa, G. (2011). Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effectors in yeast affects cell growth and viability. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 305-314.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S. und Böhmer, M. (2013). Guarding the green: pathways to stomatal immunity. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 626-632.
- Schorneck, S., Moscou, M.J., Ward, E.R. und Horvath, D.M. (2013). Engineering plant disease resistance based on TAL effectors. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 383-406.
- Schulze, S. (2013). Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Typ III-Effektoren XopB, XopL und XopS aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Krüger, A., Lee, J., Müller, O., Scheel, D., Szczesny, R., Thieme, F. und Bonas, U. (2012). Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol* **195**, 894-911.
- Schwartz, A.R., Potnis, N., Timilsina, S., Wilson, M., Patané, J., Martins, J., Jr., Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Akhunova, A., Almeida, N., Vallad, G.E., Barak, J.D., White, F.F., Miller, S.A., Ritchie, D., Goss, E., Bart, R.S., Setubal, J.C., Jones, J.B. und Staskawicz, B.J. (2015). Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Front Microbiol* **6**, 535.
- Schwessinger, B. und Ronald, P.C. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 451-482.
- Sekhwil, M.K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S. und You, F.M. (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *Int J Mol Sci* **16**, 19248-19290.
- Senthil-Kumar, M. und Mysore, K.S. (2013). Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 407-427.
- Shang, Y., Li, X., Cui, H., He, P., Thilmony, R., Chintamanani, S., Zwiesler-Vollick, J., Gopalan, S., Tang, X. und Zhou, J.-M. (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19200-19205.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. und Innes, R.W. (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.

- Shen, Y., Pan, G. und Lübberstedt, T. (2015). Haploid Strategies for Functional Validation of Plant Genes. *Trends Biotechnol* **33**, 611-620.
- Singer, A.U., Schulze, S., Skarina, T., Xu, X., Cui, H., Eschen-Lippold, L., Egler, M., Srikumar, T., Raught, B., Lee, J., Scheel, D., Savchenko, A. und Bonas, U. (2013). A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. *PLoS Pathog* **9**, e1003121.
- Sinha, D., Gupta, M.K., Patel, H.K., Ranjan, A. und Sonti, R.V. (2013). Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS One* **8**, e75867.
- Sohn, K.H., Saucet, S.B., Clarke, C.R., Vinatzer, B.A., O'Brien, H.E., Guttman, D.S. und Jones, J.D. (2012). HopAS1 recognition significantly contributes to Arabidopsis nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pathogens. *New Phytol* **193**, 58-66.
- Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A.-K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M. und Büttner, D. (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Secretes Proteases and Xylanases via the Xps Type II Secretion System and Outer Membrane Vesicles. *J Bacteriol* **197**, 2879-2893.
- Spoel, S.H. und Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 89-100.
- Stork, W., Kim, J.-G. und Mudgett, M.B. (2015). Functional analysis of plant defense suppression and activation by the *Xanthomonas* core type III effector XopX. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 180-194.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A. und Bonas, U. (2010a). Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol* **187**, 1058-1074.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U. und Büttner, D. (2010b). Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187**, 983-1002.
- Takken, F.L. und Goverse, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 375-384.
- Tampakaki, A.P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* **5**, 114.
- Tan, L., Rong, W., Luo, H., Chen, Y. und He, C. (2014). The *Xanthomonas campestris* effector protein XopDXcc8004 triggers plant disease tolerance by targeting DELLA proteins. *New Phytol* **204**, 595-608.
- Taylor, I., Linfoth, R., Al-Naieb, R., Bowman, W. und Marples, B. (1988). The wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell And Environ* **11**, 739-745.
- Taylor, K.W., Kim, J.-G., Su, X.B., Aakre, C.D., Roden, J.A., Adams, C.M. und Mudgett, M.B. (2012). Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS Pathog* **8**, e1002768.
- Teper, D., Burstein, D., Salomon, D., Gershovitz, M., Pupko, T. und Sessa, G. (2015). Identification of novel *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector proteins by a machine-learning approach. *Mol Plant Pathol*, doi: 10.1111/mpp.12288.
- Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J.G., Mudgett, M.B. und Sessa, G. (2014). *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *Plant J* **77**, 297-309.
- 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. und Kaiser, O. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**, 7254-7266.

- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G. und Bonas, U. (2007). New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1250-1261.
- Thomma, B.P., Nürnberger, T. und Joosten, M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**, 4-15.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 351-357.
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J. und Whitbread, A. (2012). Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biol Conserv* **151**, 53-59.
- Tsuda, K. und Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 459-465.
- Tsugama, D., Liu, S. und Takano, T. (2011). A rapid chemical method for lysing *Arabidopsis* cells for protein analysis. *Plant Methods* **7**, 1-7.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R. und Somerville, S.C. (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol* **98**, 1304-1309.
- Uma, B., Rani, T.S. und Podile, A.R. (2011). Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *J Plant Physiol* **168**, 2141-2152.
- Üstün, S., Bartetzko, V. und Börnke, F. (2013). The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. *PLoS Pathog* **9**, e1003427.
- Varshavsky, A. (2012). The ubiquitin system, an immense realm. *Annu Rev Biochem* **81**, 167-176.
- Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. und Boeke, J.D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10315-10320.
- Vleeshouwers, V.G. und Oliver, R.P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 196-206.
- Wada, M. (2013). Chloroplast movement. *Plant Sci* **210**, 177-182.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L. und Mysore, K.S. (2012). Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol*, pp. 111.189217.
- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X. und Zhou, J.-M. (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **22**, 2033-2044.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M. und Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.
- Weber, E., Berger, C., Bonas, U. und Koebnik, R. (2007). Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 559-567.
- Wei, C.-F., Hsu, S.-T., Deng, W.-L., Wen, Y.-D. und Huang, H.-C. (2012). Plant innate immunity induced by flagellin suppresses the hypersensitive response in non-host plants elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi*. *PLoS One* **7**, e41056-e41056.
- Wei, C.-F.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.-C.C., Martin, G.B., Huang, H.-C.C. und Collmer, A. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **51**, 32-46.
- Weissman, A.M., Shabek, N. und Ciechanover, A. (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 605-620.
- Wengelnik, K. und Bonas, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **178**, 3462-3469.

- Wengelnik, K., Rossier, O. und Bonas, U. (1999). Mutations in the Regulatory Gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Result in Constitutive Expression of All *hrp* Genes. *J Bacteriol* **181**, 6828-6831.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U. (1996). HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 704-712.
- Whalen, M., Richter, T., Zakharevich, K., Yoshikawa, M., Al-Azzeh, D., Adefioye, A., Spicer, G., Mendoza, L.L., Morales, C.Q., Klassen, V., Perez-Baron, G., Toebe, C.S., Tzovolous, A., Gerstman, E., Evans, E., Thompson, C., Lopez, M. und Ronald, P.C. (2008). Identification of a host 14-3-3 Protein that Interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv. *Physiol Mol Plant Pathol* **72**, 46-55.
- Whalen, M.C., Wang, J.F., Carland, F.M., Heiskell, M.E., Dahlbeck, D., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Scott, J.W., Stall, R.E. und Staskawicz, B.J. (1993). Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 616-627.
- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H.-L., Swingle, B., Records, A.R., Dickman, M., He, P. und Shan, L. (2011). Bacterial effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* innate immunity at the plasma membrane. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 585-593.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. und Zhou, J.-M. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**, 74-80.
- Xu, J., Audenaert, K., Höfte, M. und De Vleeschauwer, D. (2013). Abscisic Acid Promotes Susceptibility to the Rice Leaf Blight Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Suppressing Salicylic Acid-Mediated Defenses. *PLoS One* **8**, e67413.
- Yamaguchi, K., Nakamura, Y., Ishikawa, K., Yoshimura, Y., Tsuge, S. und Kawasaki, T. (2013). Suppression of rice immunity by *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**, 796-801.
- Yang, B., Sugio, A. und 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, S., Li, J., Zhang, X., Zhang, Q., Huang, J., Chen, J.Q., Hartl, D.L. und Tian, D. (2013). Rapidly evolving *R* genes in diverse grass species confer resistance to rice blast disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18572-18577.
- Yeats, T.H. und Rose, J.K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* **163**, 5-20.
- Yu, S., Hwang, I. und Rhee, S. (2013). Crystal structure of the effector protein XOO4466 from *Xanthomonas oryzae*. *J Struct Biol* **184**, 361-366.
- Yu, S., Hwang, I. und Rhee, S. (2014). The crystal structure of type III effector protein XopQ from *Xanthomonas oryzae* complexed with adenosine diphosphate ribose. *Proteins* **82**, 2910-2914.
- Yue, J.X., Meyers, B.C., Chen, J.Q., Tian, D. und Yang, S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytol* **193**, 1049-1063.
- Zeng, L., Velasquez, A.C., Munkvold, K.R., Zhang, J. und Martin, G.B. (2012). A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *Plant J* **69**, 92-103.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X. und Zhou, J.M. (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**, 175-185.
- Zhao, B., Ardales, E.Y., Raymundo, A., Bai, J., Trick, H.N., Leach, J.E. und Hulbert, S.H. (2004). The *avrRxo1* gene from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* confers a nonhost defense reaction on maize with resistance gene *Rxo1*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 771-779.
- Zhao, B., Dahlbeck, D., Krasileva, K.V., Fong, R.W. und Staskawicz, B.J. (2011). Computational and biochemical analysis of the *Xanthomonas* effector AvrBs2 and its role in the modulation of *Xanthomonas* type three effector delivery. *PLoS Pathog* **7**, e1002408.

- Zhao, B., Lin, X., Poland, J., Trick, H., Leach, J. und Hulbert, S. (2005). A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15383-15388.
- Zhou, Y.-L., Xu, J.-L., Zhou, S.-C., Yu, J., Xie, X.-W., Xu, M.-R., Sun, Y., Zhu, L.-H., Fu, B.-Y., Gao, Y.-M. und Li, Z.-K. (2009). Pyramiding *Xa23* and *Rxo1* for resistance to two bacterial diseases into an elite indica rice variety using molecular approaches. *Mol Breeding* **23**, 279-287.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* **35**, 345-351.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. und Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.

6 Anhang

6.1 T3E von *Xcv* 85-10 und deren Beitrag zur Virulenz

Tabelle 14. Übersicht, ob bekannte T3E zum Wachstum von *Xcv* 85-10 in suszeptiblen Pflanzen beitragen.

Einzelmutation hat negativen Einfluss auf das <i>Xcv</i> -Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen	
AvrBs2	(Kearney und Staskawicz, 1990)
XopD	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
XopJ	(Üstün <i>et al.</i> , 2013)
XopN	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopX	(Stork <i>et al.</i> , 2015)
XopAD	(Teper <i>et al.</i> , 2015)
HpaA	(Huguet <i>et al.</i> , 1998)
Einzelmutation ohne Einfluss auf das <i>Xcv</i> -Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen	
XopC, XopJ	(Noël <i>et al.</i> , 2003)
XopE1, XopE2	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopF1, XopF2, XopO, XopP	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopB, XopG, XopI, XopK, XopM, XopR, XopS, XopV	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopL	(Singer <i>et al.</i> , 2013)
XopAA, XopAK, XopAP, XopAU, XopAV, XopAW, XopAX	(Teper <i>et al.</i> , 2015)

6.2 Übersicht über T3E-induzierte Pflanzenreaktionen

Tabelle 15. Reaktion von 18 verschiedenen Pflanzen der *Solanaceae* auf verschiedene T3E von *Xcv*.

Linie	Exp ^a	Analysiertes Protein																					
		AvrBs1	AvrBs2	AvrBs3	AvrBsT	AvrRxv	XopB	XopC	XopE1	XopE2	XopG	XopH	XopI	XopJ	XopK	XopL	XopM	XopO	XopP	XopQ	XopS	XopV	GFP
Nphy 1	1*	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nacu	1*	-	n	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nafn	1*	+	n	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nbena	1*	+	n	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ncle	1*	+	n	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nexc	1*	+	n	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nglu	1*	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	2*	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ning	1*	+	n	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nkaw	1*	+	n	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nnud	1*	+	n	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Npal	1*	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Npan	1*	+	n	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	2*	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Npau	1*	-	n	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nqua	1*	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nsyl	1*	+	n	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Nvel	1*	+	n	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Same 1	1*	+	n	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	2*	+	n	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Snig 3	1*	+	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

a) Die Ergebnisse von 3-4 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Experiment Nr. 1 entspricht dem in Tabelle 8 beschriebenem Experiment. Es wurden je Experiment zwei Blätter von 5 verschiedenen Pflanzen, also 10 Spots (markiert mit *) oder 3 Pflanzen, also 6 Spots (alle anderen Experimente) inokuliert.

Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter transientser Expression von T3E oder GFP in 18 verschiedenen Pflanzenlinien wurden in folgende Gruppen unterteilt: rot, schneller Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 3 dpi; orange, langsamer Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; gelb-orange-gestreift, Chlorose oder Zelltod bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; gelb, Chlorose bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; weiß, keine sichtbare Reaktion bei $\geq 7/10$ bzw. $\geq 4/6$ Spots 8 dpi; grau, inkonsistente Reaktion (sichtbare Reaktion bei 4-6/10 bzw. 3/6 Spots) 8 dpi. Der immunologische Nachweis der *in planta*-Proteinsynthese wurde von H. Prochaska durchgeführt: +, detektiert; -, nicht detektiert; n, nicht analysiert.

6.3 NWR-Reaktion von *N. benthamiana* drei Tage nach *Xcv*-Inokulation

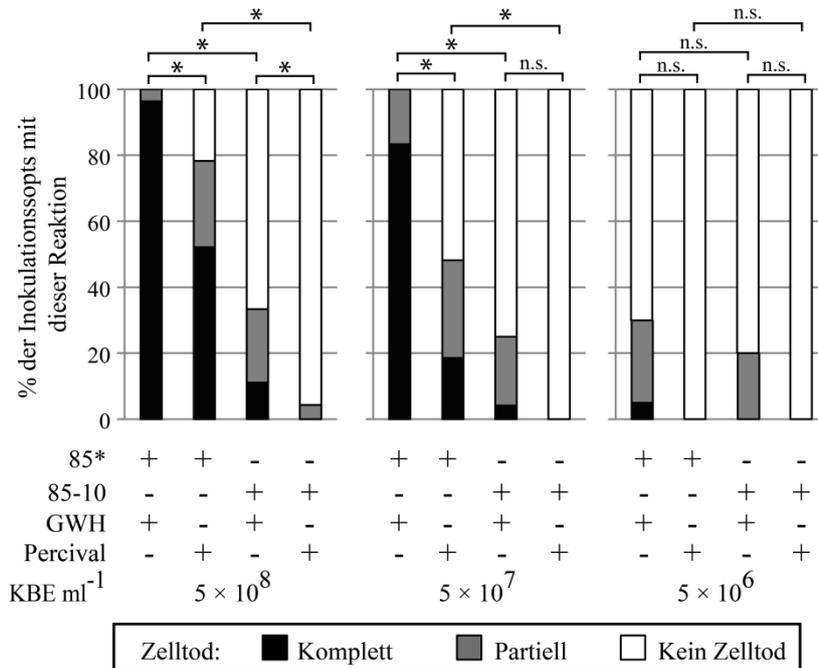


Abbildung 38. Die NWR-Reaktion von *N. benthamiana* nach Inokulation von *Xcv* nach drei Tagen.

Die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85* wurden mit unterschiedlichen Zelldichten (5×10^6 bis 5×10^8 KBE ml⁻¹) in die Blattunterseiten von *N. benthamiana* inokuliert. Anschließend verblieben die Pflanzen im Gewächshaus (GWH) oder wurden in eine Phytokammer (Percival) überführt. **A**) Pflanzenreaktionen wurden 3 dpi kategorisiert in kompletter Zelltod (> 90% des inokulierten Bereiches tot), partieller Zelltod (10% - 90% des inokulierten Bereiches tot) oder kein Zelltod (< 10% des inokulierten Bereiches tot). Die Balken repräsentieren die prozentuale Häufigkeit jeder Kategorie bei 20 - 28 Inokulationsspts. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde mittels „Wilcoxon signed rank test“ ermittelt (*, signifikant; n.s., nicht signifikant; $P \leq 0,05$).

6.4 Phylogenie verschiedener Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie

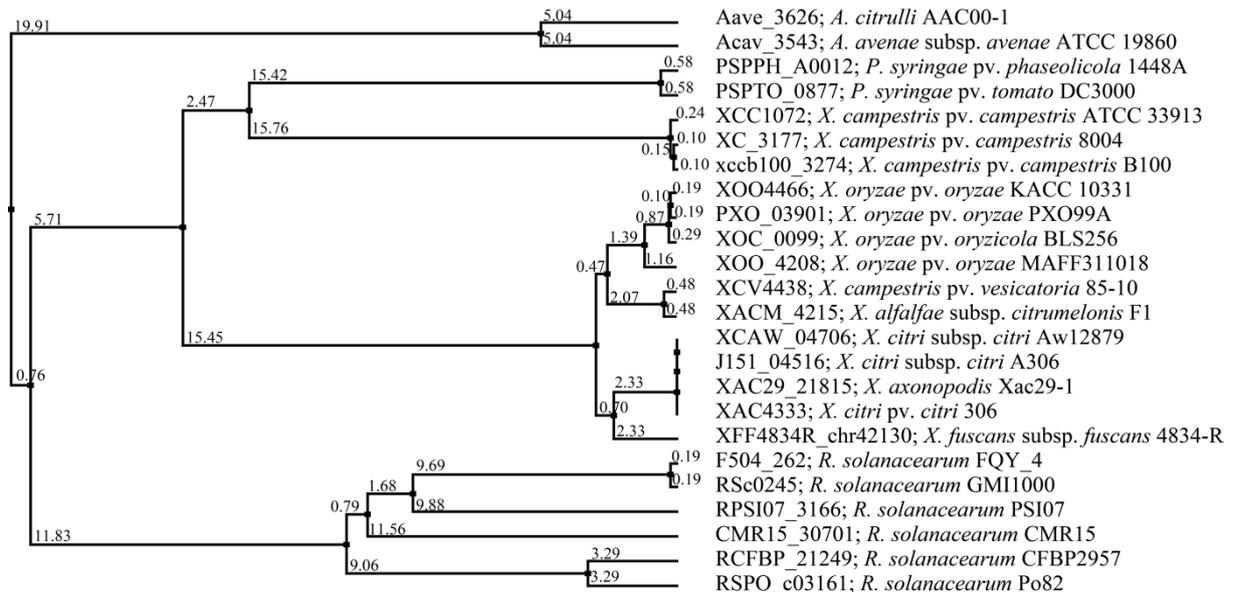


Abbildung 39. Phylogenie von 24 Vertretern der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie.

Ein Sequenzvergleich der 24 angegebenen Vertreter der XopQ/HopQ1-Effektorfamilie wurde mittels ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>) erzeugt und der Stammbaum (average distant tree; percentage identity distance) wurde mit Jalview 2.8 generiert. A.: *Acidovorax*, P.: *Pseudomonas*, R.: *Ralstonia* und X.: *Xanthomonas*.

6.7 Vorhergesagte Kernlokalisierungssignale

Tabelle 16. Bioinformatische Vorhersage von Kernlokalisierungssignalen.

	Startposition	Sequenz	Score
<i>SIARIA*</i>	15	RRSLKRKLEED	10
	186	ENSSIKTRVRVEGGIPPLVELLEFVDSKVQRA	5,4
	470	DDQKIIIFIDNSGLELLLELFDSTNLKHKRD	4
<i>CaARIA*</i>	18	RNLKRKLEQD	8
	17	KRNLRKLEQDFDDDRKMSSPS	9
	195	ENSSIKTRVRIEGGIPPLVELLGFADAKVQRA	5,3
<i>CaITSN1</i>	17	RQQQAVLKQFGGGYGS DHVADEAEMQQHHKLE	3,3
<i>SIHMGR2*</i>	2	DVRRRSEEPVYPSKVFAADEKPLKPHK	5,9
	268	NGKEFSVPMATTEGCLVASTNRGCKAIYAS	4
	289	RGCKAIYASGGATCILLRDGMTRAPCVRFGT	3,5
<i>SI/Box*</i>	87	PPPKKKARKE	10,5
	312	SKLYFMRSDPDGVSYD VVSGVWKQFIIP	3,9
	374	WELQKMTLLWKEVDRMPNIWCLEFYGKHVRMT	4,3
XopL	374	RAPLKRLILKDCSNLLTLPDIHRLTQLEKLD	4,6
	517	PGKRPTDVTTFGQVPALRDMLAESRDLEF	3,1

Vorhergesagte NLS („nuclear localization signal“) mittels „NLS MAPPER“ (Kosugi *et al.*, 2009) mit einem „Score“ über drei. *) weitere NLS vorhergesagt, aber nur die drei mit dem höchsten „score“ sind gezeigt. Der „Score“ beschreibt die Wahrscheinlichkeit einer Kernlokalisierung des Proteins: >8, ausschließlich im Kern; 7-8, partiell kernlokalisiert; 3-5, kern- und zytoplasmalokalisiert (Kosugi *et al.*, 2009).

6.8 Lokalisierungs- und Ko-Lokalisierungsstudien mit XopL

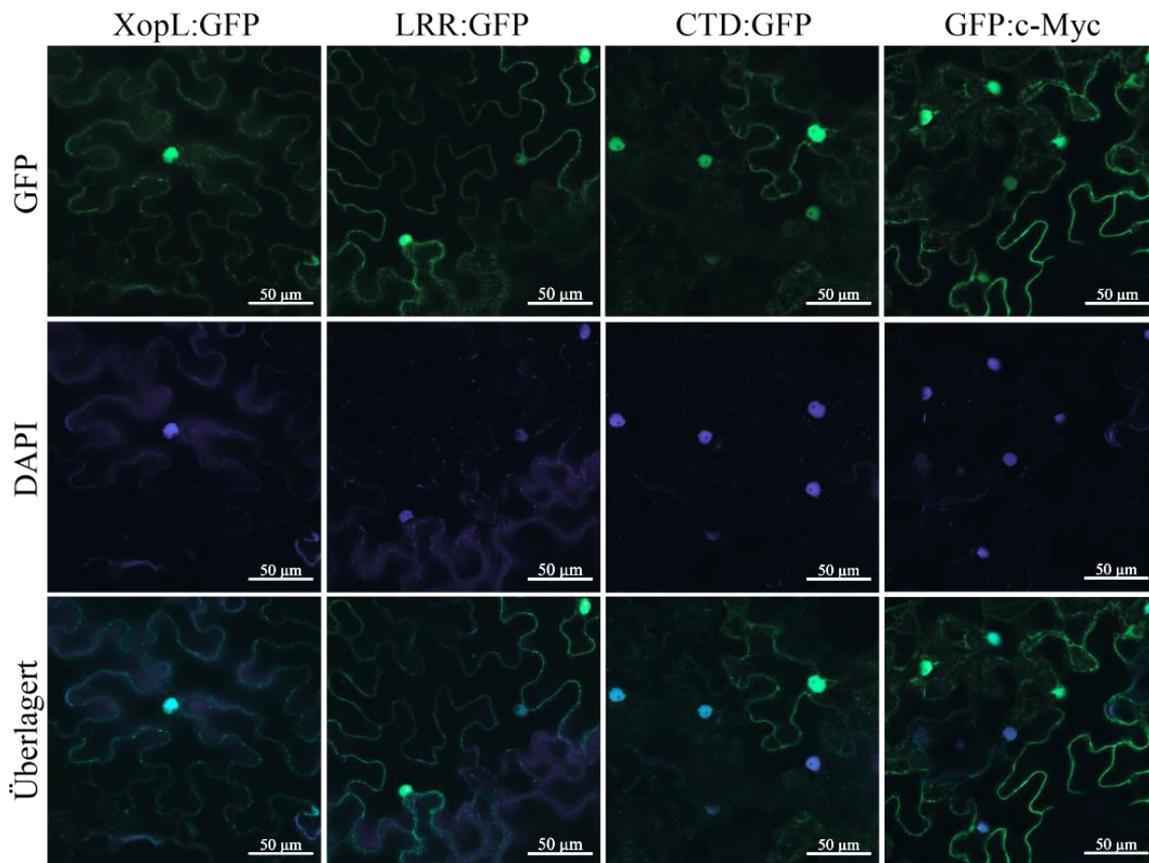


Abbildung 40. Nachweis der Kernlokalisierung von XopL, LRR und CTD.

A. tumefaciens GV3101-Stämme, die die Plasmide pGGA1_*xopL* (XopL:GFP), pGGA1_*LRR* (LRR:GFP), pGGA1_*CTD* (CTD:GFP) oder pGGA7_*gfp* (GFP:c-Myc) trugen, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert. 2 dpi wurde zusätzlich eine DAPI-Lösung infiltriert und anschließend die GFP-Fluoreszenz (GFP) und die DAPI-Fluoreszenz (DAPI) mittels LSM untersucht.

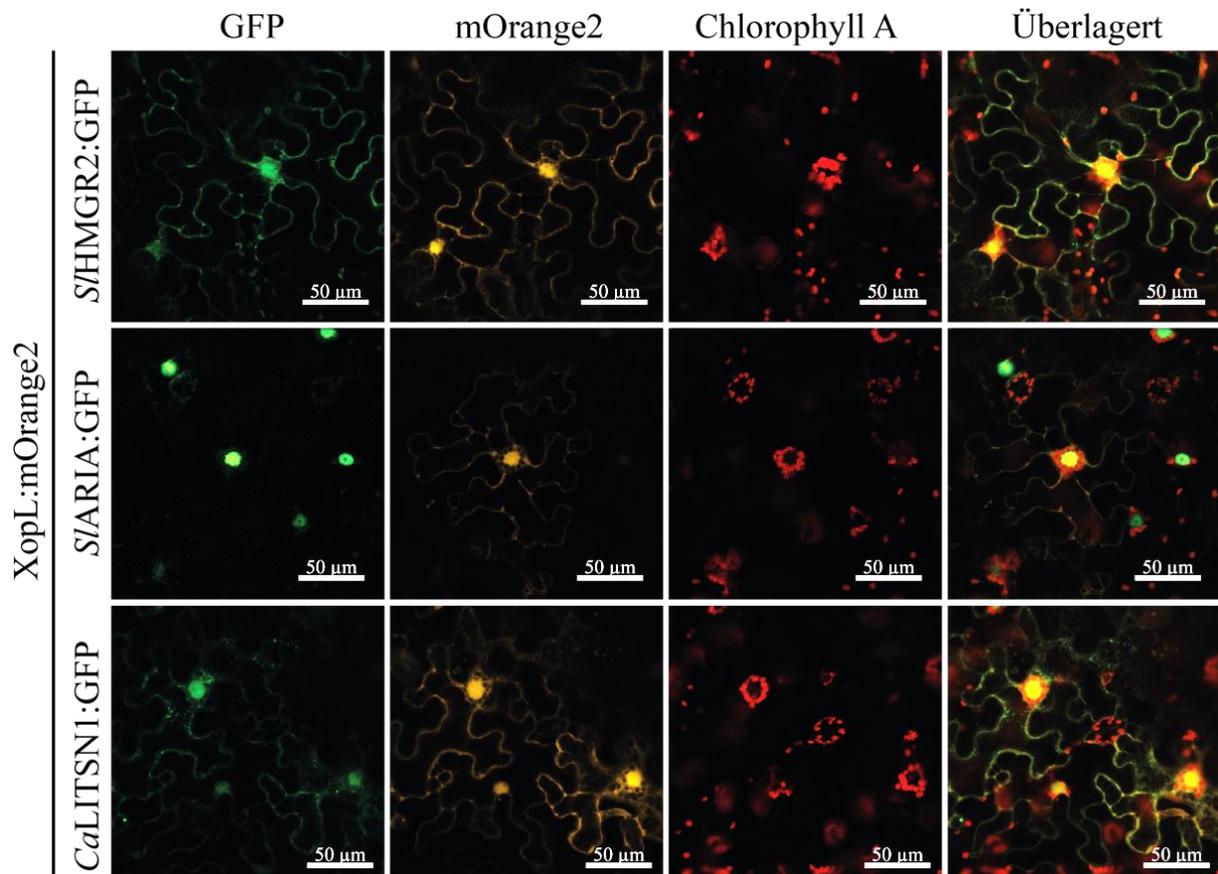


Abbildung 41. XopL beeinflusst nicht die Lokalisierung möglicher XopL-Interaktoren.

A. tumefaciens GV3101-Stämme, die die Plasmide pGGA1_*SIARIA* (*SIARIA*:GFP), pGGA1_*SIHMGR2* (*SIHMGR2*:GFP), pGGA1_*CaITSN1* (*CaITSN1*:GFP) oder pGGA11_*xopL* (*XopL*:mOrange2) trugen, wurden verwendet. Stämme wurden mit einer OD_{600} von 0,8 1:1 gemischt und in *N. benthamiana* inokuliert. 2 dpi wurde die GFP-Fluoreszenz, die mOrange2-Fluoreszenz und die Chloroplasten-Autofluoreszenz (Chlorophyll A) mikroskopisch untersucht. Das Experiment wurde mind. zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Lebenslauf

Name Norman Adlung
Anschrift Pfälzer Straße 23, 06108 Halle (Saale)
Geburtsdatum 08.09.1986
Geburtsort Gera

Ausbildung

2002 Erwerb des Realschulabschlusses an der staatlichen Regelschule Pölzig
2005 Erwerb der allgemeine Hochschulreife am Zabel-Gymnasium Gera
2005 - 2006 Grundwehrdienst im Pionierbataillon 701
2006 - 2011 Studium der Diplom-Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Abschluss: Diplom-Biologe)
Thema der Diplomarbeit: Analyse der putativen Typ VI Sekretionssysteme von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
12/2011 - 10/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Anfertigen der Promotionsarbeit am Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulla Bonas, für die Möglichkeit, diese spannenden Fragestellungen zu bearbeiten. Danke für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und Neugier sowie für die Hilfe und Ratschläge.

Viele fleißige Hände haben zum zügigen Voranschreiten meiner Experimente beigetragen. Ein besonderer Dank gebührt Bianca für das geduldige und engagierte managen meiner endlos erscheinenden Versuchspflanzenwunschliten. Für viele Stunden Inokulations-Unterstützung, auch bei wenig-kooperativen Pflanzenlinien, danke ich Heike, Doreen, Oli, Sebastian und Peter. Außerdem danke ich allen TAs der Arbeitsgruppe und Conny für die ausgezeichnete Hilfe.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und insbesondere der „Besatzung“ von Labor 222 sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt! Jens, danke fürs fit halten. Für viele nützliche Ratschläge und Kommentare danke ich insbesondere Sabine T.. Ich danke außerdem Marcel für das ausgezeichnete Mentoring und dem SFB 648.

Meiner Familie und Freunden danke ich dafür, dass sie mich auf meinem Weg begleiten. Uli, danke, dass du meinen Weg auf eine ganz besondere Weise bereicherst!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt 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), 19.10.2015

Norman Adlung