
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Etablierung und Durchführung verschiedener Sichtungen
zur Identifizierung von Signalwegkomponenten der
Paprika-Bs3-vermittelten Resistenzreaktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

von
Cornelia Jaenecke,
geboren am 06.09.1981 in Leipzig

Gutachter:

- Frau Prof. Dr. U. Bonas
- Herr Prof. Dr. K. Humbeck
- Herr Prof. Dr. Th. Debener

Halle/Saale, 01.02.2011

*für Birgit und Roland
mit denen alles begann
und
für Frank und Clara
mit denen es hoffentlich nicht endet*

Zusammenfassung

Das Resistenzgen *Bs3* aus Paprika (*Capsicum annuum* cv. ECW-30R) vermittelt Resistenz gegenüber Stämmen des bakteriellen Phytopathogens *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, die das Avirulenzprotein AvrBs3 in die Pflanzenzellen translozieren. *Bs3* ist ein atypisches Resistenzprotein, da es Homologie zu Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMOs) aufweist. Um den molekularen Mechanismus der *Bs3*-vermittelten Resistenz aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Sichtungen etabliert und durchgeführt.

cDNA-Fragmente einer Paprika-Bibliothek wurden zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* in *Nicotiana benthamiana* coexprimiert, um Signalkomponenten der *Bs3*-vermittelten Resistenz zu identifizieren. Dabei wurden unvollständige Gene für eine Kinase und *Bs3* identifiziert, die die *Bs3*-vermittelte hypersensitive Reaktion (HR) verzögern. Die Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR durch das unvollständige *Bs3*, welches allein exprimiert keine HR auslöst, deutet auf die Ausbildung von nicht-funktionalen heteromeren Komplexen mit dem Volllängen-*Bs3*-Protein hin. Das vollständige Gen der Kinase codiert für eine rezeptorähnliche Kinase mit Leuzinreichen Sequenzwiederholungen (LRR-RLK), die aufgrund ihrer Domänenstruktur vermutlich zur Familie der SRF (*STRUBBELIG-receptor like family*)- Proteine gehört. Auch das Volllängen-Protein CaLRR-RLK verzögert die *Bs3*-vermittelte HR. Allerdings ist CaLRR-RLK nicht spezifisch für die *Bs3*-vermittelte Resistenzreaktion, da es ebenfalls die durch BAX, Rx, *Bs4*, AvrB oder XopJ induzierten Zelltodreaktionen verzögert.

Außerdem wurde eine mutationsbasierte Sichtung in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt, um Signalwegkomponenten zu identifizieren, die am Auslösen der *Bs3*-vermittelten HR beteiligt sind. Dafür wurden *Bs3*-transgene Linien erstellt und diese hinsichtlich ihres Phänotyps und der Anzahl der Transgen-Kopien analysiert. Die Sichtung einer EMS-Population identifizierte 231 potentielle Kandidatenpflanzen, die die Induktion des *Bs3*-vermittelten Zelltodes überlebten und keine Mutation im *Bs3*-Gen aufwiesen.

Summary

The resistance gene *Bs3* from pepper (*Capsicum annuum* cv. ECW-30R) mediates resistance against races of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, which translocates the avirulence protein AvrBs3 into plant cells. *Bs3* is an atypical resistance protein because it has homology to flavin-dependent monooxygenases (FMOs).

To identify the molecular mechanism of the *Bs3*-mediated resistance different screens were established and conducted. cDNA-fragments of a pepper library together with *avrBs3* and *Bs3* were transiently coexpressed in *Nicotiana benthamiana* to identify signalling components of the *Bs3*-mediated resistance. In this screen incomplete genes for a kinase and *Bs3* were identified to delay the *Bs3*-mediated hypersensitive response (HR). Plants expressing the partial *Bs3* show no HR-like phenotype. The delay of *Bs3*-mediated HR during coexpression of the partial *Bs3* and *WT-Bs3* may be due to the formation of heteromeric non-functional complexes. The full-length ORF of the kinase encodes a Leucine rich repeat receptor like kinase (LRR-RLK), which may be a member of the SRF (STRUBBELIG receptor like family)-protein family. Although the full-length protein CaLRR-RLK delays the *Bs3*-mediated HR, it is not specific for the *Bs3*-mediated resistance, because CaLRR-RLK can delay the cell death reactions which are mediated by AvrB, BAX, *Bs4*, Rx and XopJ, as well.

In addition a mutation-based screen in *Arabidopsis thaliana* was initiated to identify signal components of the *Bs3*-mediated resistance. Therefore, transgenic lines were generated and analyzed for their phenotypes (death after *Bs3*-induction) and copy numbers of their transgene. Screening an EMS-population 231 potential candidate plants were identified, which survived the induction of the *Bs3*-mediated cell death and do not have a mutation in the *Bs3* transgene.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Formen der pflanzlichen Resistenz	1
1.1.1 Die Basalresistenz	1
1.1.2 Die Effektor-vermittelte Resistenz	2
1.1.3 Das Zick-Zack-Modell	3
1.1.4 Interaktionen zwischen Effektorprotein und Resistenzprotein	4
1.2 Resistenzproteine	5
1.2.1 Einteilung der Resistenzproteine	5
1.2.2 Bekannte und vermutete Funktionen der R-Protein Domänen	5
1.2.3 Wirkungsweise einiger bekannter genereller Signalwegkomponenten	6
1.3 Das Pathogen <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	7
1.4 Effektorproteine von <i>Xanthomonas</i>	9
1.5 AvrBs3 als Vertreter der TAL-Effektor-Familie	9
1.6 Das Resistenzgen <i>Bs3</i> aus Paprika	12
1.7 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Enzyme	14
2.2 Verwendete Stämme, Oligonukleotide, Vektoren und Plasmide	14
2.2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme	14
2.2.2 Verwendete Oligonukleotide	15
2.2.3 Verwendete Vektoren und Plasmide	15
2.3 Computerprogramme und Datenbanken	15
2.4 Medien und Anzuchtbedingungen	15
2.4.1 Anzucht von <i>N. benthamiana</i> und <i>C. annuum</i>	15
2.4.2 Anzucht von Bakterien	16
2.4.3 Anzucht von Hefen	16
2.5 Molekularbiologische Methoden	16
2.5.1 PCR	16
2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten	17
TOPO® – Reaktionen	18
LR – Rekombination	19
In-Fusion 2.0 Dry-Down Klonierungen	19
2.5.3 Sequenzierungen	20
2.5.4 Chemotransformation von Plasmiden in chemokompetente <i>E. coli</i>	21
2.5.5 Transformation von Plasmiden in elektrokompetente <i>A. tumefaciens</i> GV3101	21
2.5.6 Cotransformation von Plasmiden in einen Hefestamm	21
2.5.7 Hefe-Dihybridanalysen	21
2.5.8 Minipräparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Übernachtkultur	22
2.5.9 Isolation von DNA aus Agarose-Gelen	22
2.5.10 Isolation von RNA	22

2.5.11	Semiquantitative RT-PCRs	23
2.5.12	Generierung in dieser Arbeit erstellter Plasmide.....	23
	Generierung der Plasmide pK7FWG2-BAP1 und pK7FWG2-BON1	23
	Generierung der Silencingplasmide pTRV2a-765-1, pTRV2a-765-2.....	24
	Generierung der Virusexpressionsplasmide pTRV2a-Ca- und pTRV2a-765-	24
	Generierung des Silencingplasmids pTRV2a-CaLRR und des	
	Expressionsplasmids pER10-CaLRR::GFP	24
	Generierung des induzierbaren Hefepasmids pYR-CaLRR.....	25
	Generierung der Hefe-Dihybridplasmide	25
	Generierung der Plasmide pENTR-Bs3::GFP10-5 und pGWB2-Bs3::GFP10-5..	25
2.5.13	Western Blot Analysen	25
2.5.14	Zellfraktionierung	26
2.5.15	Co-Immunopräzipitation.....	27
2.5.16	Inokulationsexperimente.....	28
2.5.17	Virusinduziertes Gensilencing und Virusinduzierte Expression	28
	Der genutzte Virus.....	28
	Infiltrationsmethoden für VIGS oder Virusinduzierte Expression	29
2.5.18	Plasmolyse	29
2.6	Mikroskopie.....	30
2.7	Sichtung einer Paprika-cDNA-Expressionsbibliothek.....	30
2.7.1	Die cDNA- Bibliothek aus <i>Capsicum annuum</i>	30
2.7.2	Konjugation	31
2.8	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.8.1	Anzucht des Pflanzenmaterials	34
2.8.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.8.3	Isolation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.8.4	Southern Blot Analyse	36
2.8.5	Bestimmung des Integrationsortes	37
2.8.6	Mutagenese von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Gewinnung der M ₂	38
2.8.7	Sichtung der M ₂	38
2.8.8	Nachweis von Luciferaseaktivität	39
2.9	Benennung von Sequenzvarianten	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek nach Komponenten der Bs3-	
	vermittelten Resistenzreaktion.....	40
3.1.1	Identifizierung von Komponenten, welche die Bs3-HR beeinflussen, durch	
	die Expression von cDNA Klonen <i>in planta</i>	40
	Analyse des Einflusses der Bakteriendichte auf die Bs3-vermittelte HR	40
	Coexpression von <i>BON1</i> und <i>BAP1</i> mit <i>Bs3</i> beeinflusst die Bs3-vermittelte HR	41
	Ergebnisse der Überexpressionssichtung	42
3.1.2	Ein Ubiquitin-Homolog löst eine HR-ähnliche Reaktion aus.....	43
3.1.3	Ein <i>KH-domain containing</i> Protein löst eine Nekrose-ähnliche Reaktion	
	aus	43
	Das Silencing des ‚KH-domain containing proteins‘ beeinflusst nicht die	
	Bs3-vermittelte HR	44
	Die Expression von <i>avrBs3</i> hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des	
	‚KH-domain containing proteins‘	45
3.1.4	Die Coexpression eines unvollständigen <i>Bs3</i> mit <i>Bs3</i> verzögert die Bs3-	
	vermittelte HR.....	46
	Das partielle Bs3-Protein hat keinen Einfluss auf die Expression von Bs3.....	47

3.1.5	Eine Serin-Threonin-Kinase verzögert die Bs3-vermittelte HR	47
	Die Inokulation von <i>Xanthomonas</i> aber nicht die Expression von <i>avrBs3</i> hat Einfluss auf die Transkriptmenge der Kinase	49
3.1.6	Identifizierung und Analyse des vollständigen Gens der Kinase	49
	Identifikation der Vollängen-cDNA des Kinase-Klons	50
	CaLRR-RLK verzögert die Bs3-vermittelte HR in <i>N. benthamiana</i>	51
	Die Überexpression von CaLRR-RLK verzögert in <i>C. annuum</i> cv. ECW-30R die Bs3-vermittelte HR	52
	Das Protein CaLRR-RLK ist in der Plasmamembran lokalisiert	54
	CaLRR-RLK wird nicht durch die Expression von <i>avrBs3</i> induziert	56
	Das CaLRR-RLK Protein beeinflusst die Expression von <i>Bs3</i> nicht	56
	Eine Interaktion von CaLRR-RLK mit <i>Bs3</i> ist nicht nachweisbar	57
	Der Inhibitor CaLRR-RLK ist nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR	59
	CaLRR-RLK supprimiert den Bs3-vermittelten Zelltod in Hefe nicht	60
3.2	Generierung transgener Arabidopsis-Linien für eine mutations- basierte Sichtung	61
3.2.1	Analyse zweier induzierbarer Systeme hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens	62
3.2.2	Vorbereitende Klonierungen für die Generierung <i>Bs3</i> und <i>avrBs3</i> induzierbarer Konstrukte	65
	Generierung eines <i>avrBs3</i> -Gens mit PCR-amplifizierbaren <i>repeats</i>	65
	Generierung eines Binärvektors mit MCS und TIA-Epitoptag	66
3.2.3	Generierung von Plasmiden mit induzierbarer Expression von <i>Bs3</i> oder <i>avrBs3</i>	67
	Generierung des Plasmids pER10-Bs3::GFP	67
	Generierung des Plasmids pER10.1-356*	68
	Generierung des Plasmids pER10.2-356*	71
3.2.4	Beschreibung der erhaltenen T ₁ -Pflanzen	73
3.2.5	Identifizierung von Linien mit nur einer Kopie des jeweiligen Transgens	75
3.2.6	Analyse der Funktionalität des Transgens in der T ₂	76
3.2.7	Analyse der Funktionalität des Transgens und Bestimmung des Genotyps in der T ₃	77
3.2.8	Bestimmung des Integrationsortes der T-DNA in ausgewählten transgenen <i>A. thaliana</i> Linien	79
3.3	EMS-vermittelte Mutagenese	80
3.3.1	Einschätzung der Mutageneserate für eine ausgewählte Linie	81
3.3.2	Sichtung der ausgewählten Linie 77 in der M ₂	81
3.3.3	Zwei Mutationen im <i>Bs3</i> -Gen verhindern den Zelltod	82
3.3.4	Gewinnung der M ₃ für eine weitere Analyse der Kandidatenlinien	83
4	Diskussion	84
4.1	Die Überexpressionssichtung in <i>N. benthamiana</i>	84
4.1.1	Das Ubiquitin-Homologe beeinflusst die Bs3-vermittelte HR nicht	84
4.1.2	Das partielle <i>Bs3</i> stört die Aktivität eines oligomeren <i>Bs3</i> -Komplexes	84
4.1.3	Die unvollständige Kinase und CaLRR-RLK sind wahrscheinlich negative Regulatoren der Bs3-vermittelten HR	87
4.1.4	CaLRR-RLK ist nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR	88
4.1.5	Die Kinase-Domäne ist ausreichend für die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR	89
4.1.6	Mögliche Funktionen des CaLRR-RLK-Proteins	90
4.1.7	Maximal ein Siebentel des Paprikagenoms wurde analysiert	91

4.2	Erzeugung und Isolation von Mutanten für Komponenten des Bs3-Signalweges	93
4.2.1	Identifikation von vier transgenen Linien, die für eine Mutagenese geeignet sind	93
4.2.2	Einschätzung der Mutageneserate für die gewählte Linie 77	97
4.2.3	Die Bs3-Mutante (p.E170G,M171V) kann keine Bs3-vermittelte HR auslösen	97
4.2.4	Vergleichende Betrachtung der Mutationshäufigkeit im <i>R</i> -Gen	98
4.2.5	Ausblick zur Identifizierung der Arabidopsismutationen, die den Bs3-vermittelten Zelltod verhindern	99
5	Literaturverzeichnis	100
	Anhang	111
	Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide	112
	Anhang 2: Verwendete Vektoren und Plasmide	115
	Anhang 3: Vektorkarten	118
	Anhang 4: Klonierungsstrategien	123
	Anhang 5: Sequenzen	126
	Anhang 6: Alignment zwischen Bs3 und der bakteriellen FMO aus Methylophaga	133
	Anhang 7: zusätzliche Darstellungen des Bs3-Moleküls	134
	Anhang 8: T ₁ - Test auf Anwesenheit des Transgens	135
	Anhang 9: Segregations- und Southern Blot Analyse der T ₂	138
	Anhang 10: Southern Blots	142
	Anhang 11: Homozygote Tochterlinien in der T ₃	144
	Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M ₂	145
	Danksagung	155
	Lebenslauf	156
	Selbstständigkeitserklärung	157

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1.1:	Das Zick-Zack-Modell	3
Abb. 1.2:	Bakterielle Fleckenkrankheit verursacht durch <i>Xcv</i>	8
Abb. 1.3:	Struktur des <i>AvrBs3</i> -Proteins als Vertreter der TAL-Effektor-Familie	10
Abb. 1.4:	<i>AvrBs3</i> induziert <i>UPA</i> -Gene und das korrespondierende Resistenzgen <i>Bs3</i>	11
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung des In-Fusion-Klonierungsprinzips	20
Abb. 2.2:	Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek in <i>N. benthamiana</i>	31
Abb. 2.3:	Schematische Darstellung der Arbeiten mit transgenen Arabidopsis-Linien	33
Abb. 2.4:	Kontroll-PCRs für die Bestimmung des Integrationspunktes	37
Abb. 3.1:	Coexpression von <i>BON1</i> und <i>BAP1</i> mit <i>Bs3</i> verzögert die <i>Bs3</i> -vermittelte HR	42
Abb. 3.2:	Ein Beispiel für die Sichtung der Paprika-cDNAs in <i>N. benthamiana</i>	42
Abb. 3.3:	Der Klon 17F10	43
Abb. 3.4:	Der Klon 9G10	44
Abb. 3.5:	Die Expression von <i>avrBs3</i> hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des ' <i>KH-domain containing proteins</i> '.....	45
Abb. 3.6:	Verzögerung der <i>Bs3</i> -vermittelten HR durch den Klon 69F8.....	46
Abb. 3.7:	Die Proteinmenge von <i>Bs3</i> wird durch die Coexpression des <i>CaLRR- RLK::GFP</i> , dessen Mutante oder des <i>partiellen Bs3</i> nicht beeinflusst.....	46
Abb. 3.8:	Der Klon 9A4 verzögert die <i>Bs3</i> -vermittelte HR.....	47
Abb. 3.9:	Homologe des Klons 9A4	48
Abb. 3.10:	Die Expression von <i>avrBs3</i> hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge der unvollständigen <i>Kinase</i>	49
Abb. 3.11:	Struktur des <i>CaLRR-RLK</i> auf Gen- und Proteinebene	50
Abb. 3.12:	Suppression der <i>Bs3</i> -vermittelten HR durch <i>CaLRR-RLK</i>	51
Abb. 3.13:	<i>CaLRR-RLK</i> verzögert die <i>Bs3</i> -vermittelte HR in Paprika	53
Abb. 3.14:	Subzelluläre Lokalisierung des <i>CaLRR-RLK</i>	55
Abb. 3.15:	Die Expression von <i>avrBs3</i> hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des <i>CaLRR-RLK</i>	56
Abb. 3.16:	<i>CaLRR-RLK</i> hat keinen Einfluss auf die Promotoraktivierung von <i>Bs3</i>	57
Abb. 3.17:	Hefe-Dihybridanalyse zur Interaktion von <i>Bs3</i> mit <i>CaLRR-RLK</i>	58
Abb. 3.18:	<i>CaLRR-RLK</i> ist nicht spezifisch für die <i>Bs3</i> -vermittelte HR	59
Abb. 3.19:	<i>CaLRR-RLK</i> supprimiert den <i>Bs3</i> -vermittelten Zelltod in Hefe nicht	61
Abb. 3.20:	Schematische Darstellung der T-DNAs für die drei Sichtungsmöglichkeiten	62
Abb. 3.21:	Analyse des induzierbaren Systems <i>pJCGlox</i>	63
Abb. 3.22:	Analyse des induzierbaren Systems <i>pER10attR</i>	64

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 3.23:	Test des semisynthetischen <i>avrBs3</i> -Gens auf seine Funktionalität.....	66
Abb. 3.24:	Kontrollverdaus der modifizierten pER10attR-Plasmide	68
Abb. 3.25:	Das Plasmid pER10-Bs3::GFP erfüllt die Erwartungen bzgl. seiner Funktion	69
Abb. 3.26:	Das Plasmid pER10.1-356* funktioniert wie erwartet	71
Abb. 3.27:	Die Funktionalität des Plasmids pER10.2-356* entspricht den Erwartungen.....	73
Abb. 3.28:	PCR-Test auf Anwesenheit des Transgens in der T ₁ der transformierten <i>A. thaliana</i> cv. Col-0	74
Abb. 3.29:	Für die Linien 31,77,35 und 103 ist nur eine Kopie des Transgens nachweisbar	76
Abb. 3.30:	Beispiele für positiv getestete Linien in der T ₂	78
Abb. 3.31:	Identifizierung homozygoter Tochterlinien in der T ₃	79
Abb. 3.32:	Kontroll-PCRs für den Integrationsort der transgenen <i>A. thaliana</i> -Linie 31	80
Abb. 3.33:	Sichtbare phänotypische Veränderungen in der M ₂	81
Abb. 3.34:	Kandidatenpflanzen des Pools 4	82
Abb. 3.35:	Die Variante Bs3 _{E170G,M171V} löst keine HR aus	83
Abb. 4.1:	Modell der 3D-Struktur des Bs3-Proteins mit den Cofaktoren NADP und FAD	86
Abb. 4.2:	Phylogenetischer Stammbaum der SRF-Proteinfamilie und CaLRR-RLK	91
Abb. 4.3:	Schematische Darstellung möglicher Tandem-Anordnungen zweier nicht- segregierender T-DNA-Kopien	96
 Tabellen:		
Tab. 2.1:	Verwendete Bakterien- und Hefestämme	14
Tab. 2.2:	Verwendete Antibiotika.....	16
Tab. 2.3:	Details zu den drei Poolkonjugationen.....	32
Tab. 3.1:	Spezifitätstest	60
Tab. 3.2:	Anzahl der Kanamycin-resistenten bzw. PCR-positiven Arabidopsis-Linien.....	74
Tab. 3.3:	Zusammenfassung der Kopienzahl-Bestimmung	75
Tab. 3.4:	Anzahl der transgenen Arabidopsis-Linien, die in der T ₂ dem erwarteten Phänotyp entsprachen	76
Tab. 3.5:	Integrationsorte des Transgens für die transgenen <i>A. thaliana</i> -Linien 31, 35, 77 und 103	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
AAD	<i>acidic activation domain</i> (saure Aktivierungsdomäne)
Ac	Acetat
AIM	Agrobakterien-Infiltrationsmedium
APS	Ammoniumperoxodisulfid
As	Aminosäure
att-sites	<i>attachment sites</i>
Avr	Avirulenzprotein
bp	basepairs (Basenpaare)
Bs3	<i>bacterial spot resistance against Xcv race 3</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderalbumin)
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CC	<i>coiled-coil</i>
ccdB	<i>controlled cell death B</i> , cytotoxisches Protein aus <i>E. coli</i> K12
cDNA	komplementäre DNA
Col-0	Columbia-0 (Kultivar von <i>A. thaliana</i>)
CP	Coatprotein
cv.	Kultivar (<i>cultivar</i>)
Da	Dalton
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'- Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2' Desoxynukleotidtriphosphate
dpi	Tage nach der Infiltration (<i>days post infiltration</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECD	<i>extracellular domain</i> (extrazelluläre Domäne)
ECW	<i>Early Californian Wonder</i> (ein Paprika-Kultivar)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
ETI	<i>effector triggered immunity</i> (Effektor-vermittelte Resistenz)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
Gal	Galaktose
GFP	<i>green fluorescent protein</i> aus <i>Aequorea victoria</i>
Glc	Glukose
GOI	<i>gene of interest</i> , Gen des Interesses

Abkürzungsverzeichnis

hc	<i>high copy</i> , hohe Kopienzahl je Zelle
hpi	<i>hours post infiltration</i> (Stunden nach Infiltration)
HR	Hypersensitive Reaktion (<i>hypersensitive response</i>)
<i>hrp</i>	Hypersensitive Reaktion und Pathogenität
Hsp90	<i>Heat shock protein</i> mit dem Molekulargewicht 90 kDa
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasen
LB	lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharide
LR	Rekombinationsreaktion für GATEWAY-Klonierungen, attL x attR
LRR	Leucinreiche Sequenzwiederholung (<i>Leucin rich repeat</i>)
LSM	<i>laser-scanning microscope</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog- Medium
M _x	x. Generation nach der Mutagenese
NaAc	Natriuacetat
NADPH	Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat
NB	Nukleotid-bindende Domäne (<i>Nucleotide binding domain</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NMD	<i>nonsense</i> verursachter mRNA-Abbau (<i>nonsense mediated mRNA decay</i>)
NosT	Nopalinsynthase-Terminator
NYG	Nitrogen/Yeast/Glycerol
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei der Wellenlänge 600 nm
PAG	Polyacrylamidgel
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PR	<i>pathogenicity-related</i>
PTGS	posttranskriptionelles Gensilencing
PTI	<i>pathogen triggered immunity</i>
pv.	<i>pathovar</i> , Pathovar
R-	Resistenz-
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RLK	Rezeptor ähnliche Kinase (<i>receptor like kinase</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffverbindungen)
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SD	synthetic defined
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Seq	Sequenzierung
SGT1	<i>suppressor of the G2 allele of SKP1</i>

sp.	<i>species</i> (Art)
SRF	<i>STRUBBELIG receptor like family</i>
ss	<i>single stranded</i> (Einzelstrang-)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- <i>acetic acid</i> (Eisessig)-EDTA
TBST	<i>Tris buffered saline</i> + Tween
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TIA	<i>tandem immune affinity</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin like receptor</i> (Toll/Interleukin ähnlicher Rezeptor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
T _x	x. Generation nach der Transformation
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
VIGS	<i>virus induced gene silencing</i> (Virus-induziertes Gensilencing)
WS	<i>water soaked leason</i> (wässrige Läsion)
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
YEB	<i>Yeast Extract and Beef</i>
YPD	Yeast/Pepton/Dextrose

1 Einleitung

Zu den Phytopathogenen zählen Bakterien, Pilze, Nematoden und Insekten. In der Landwirtschaft verursachen Phytopathogene jährlich hohe Ertragseinbußen bei Nutzpflanzen, weltweit etwa 24 % (Agrios, 2005).

Bei der Schädlingsbekämpfung kommen häufig ökologisch bedenkliche Pestizide zum Einsatz. Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen bietet die Resistenzzüchtung. Dabei werden Nutzpflanzenlinien (so genannte Kultivare, cv.) mit resistenten Wildarten gekreuzt. Resistente Nachkommen werden anschließend solange mit dem kultivierten Elter zurückgekreuzt, bis die Nachkommen wieder die gewünschten Eigenschaften des kultivierten Elters aufweisen.

Eine zeitgemäße Alternative bietet die Gentechnologie, mit deren Hilfe man ein bekanntes Resistenz- (*R*-) Gen in ein Nutzpflanzenkultivar transformieren kann. Hieraus resultierende resistente Tochterlinien werden geselbstet, um homozygot resistente Nachkommen zu erhalten. Die zeitaufwendige Rückkreuzung entfällt. Ein weiterer Vorteil der Transgen-Technologie ist, dass das *R*-Gen nicht aus einer sexuell kompatiblen Spezies stammen muss und genetische Ressourcen anderer Arten genutzt werden können. Die Aufklärung zugrunde liegender Resistenzmechanismen stellt demnach ein wichtiges Forschungsfeld dar.

1.1 Formen der pflanzlichen Resistenz

Grundsätzlich unterscheidet man bei Pflanzen zwischen Basal- und spezifischer Resistenz. Während die Basalresistenz gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen wirkt, ist die spezifische Resistenz effektiv gegen einzelne Pathogen-Rassen.

1.1.1 Die Basalresistenz

Bei der Basalresistenz vermitteln pflanzliche, membranständige Rezeptoren die Erkennung charakteristischer pathogen-assoziiertes molekularer Strukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) wie z. B. Flagellin (Schwessinger und Zipfel, 2008), Lipopolysaccharide (LPS, Livaja *et al.*, 2008) oder Chitin (Wan *et*

al., 2008), und aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Abwehr der meisten Pathogene führt, bevor diese die Pflanze schädigen können. Daher wird die Basalresistenz heute auch PAMP- vermittelte Abwehr (*PAMP-triggered-Immunity*, PTI; Jones und Dangl, 2006) genannt.

Bei dieser induzierten Abwehr kommt es unter anderem zur Einlagerung von Kallose und Lignin in die Zellwand und zur Bildung phenolischer Substanzen. Zusätzlich wirken reaktive Sauerstoffspezies (ROS), *pathogenesis-related* (PR)- Proteine und Sekundärmetabolite wie Phytoalexine antimikrobiell (Nürnberger und Lipka, 2005; He *et al.*, 2007). Pathogene unterdrücken in ihrer Wirtspflanze diese Art der Abwehr mit Hilfe spezifischer Proteine (so genannter Effektoren, siehe 1.1.2), die in der Wirtszelle wirksam werden (Nürnberger *et al.*, 2004; Abramovitch *et al.*, 2006; Janjusevic *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007).

1.1.2 Die Effektor-vermittelte Resistenz

Vom Pathogen sekretierte Effektorproteine lösen in einigen Kultivaren einer bestimmten Wirtsspezies eine Resistenzgen-spezifische Reaktion aus. Ein Effektor, der eine Immunantwort induziert, wird auch als Avirulenz (Avr)-Protein bezeichnet, da Pathogene, die dieses Gen exprimieren, auf Pflanzen mit dem korrespondierendem *R*-Gen avirulent sind. Die *R*-Gen vermittelte Resistenz wird auch als Effektor-vermittelte Resistenz (*Effektor-triggered-Immunity*; ETI; Jones und Dangl, 2006) oder kultivarspezifische Gen-für-Gen-Resistenz bezeichnet (Flor, 1956).

Resistenzreaktionen gehen häufig mit einer hypersensitiven Reaktion (HR) einher, einem schnellen, lokalen Zelltod des infizierten pflanzlichen Gewebes (Klement, 1963; Lam und Blumwald, 2002; van Doorn und Woltering, 2005). Auf molekularer Ebene ist die Resistenzreaktion durch die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (*oxidative burst*, Lam *et al.*, 2001), die Akkumulation von Stickstoffmonoxid (Wendehenne *et al.*, 2004) und transkriptioneller Genaktivierung (Dixon und Harrison, 1990; Zamboni *et al.*, 2009) gekennzeichnet. Dies führt zur Hemmung des Wachstums des Pathogens.

1.1.3 Das Zick-Zack-Modell

Seit einiger Zeit weiß man, dass sowohl die Basal- als auch die rassenspezifischen Resistenzmechanismen durch ständigen evolutionären Druck des Pathogens auf die Pflanze evolviert sind. Im Zick-Zack-Modell (Jones und Dangl, 2006) ist die heutige Ansicht der Coevolution zwischen der pflanzlichen Abwehr und den Anpassungsmechanismen der Pathogene zusammengefasst (Abb. 1.1).

Das Pathogen besiedelt den Interzellularraum des pflanzlichen Gewebes. Durch die Interaktion von PAMPs mit membranständigen Rezeptoren erkennt die Pflanze die Anwesenheit des Pathogens und induziert die Basalabwehr (PTI, Abschnitt 1.1.1).

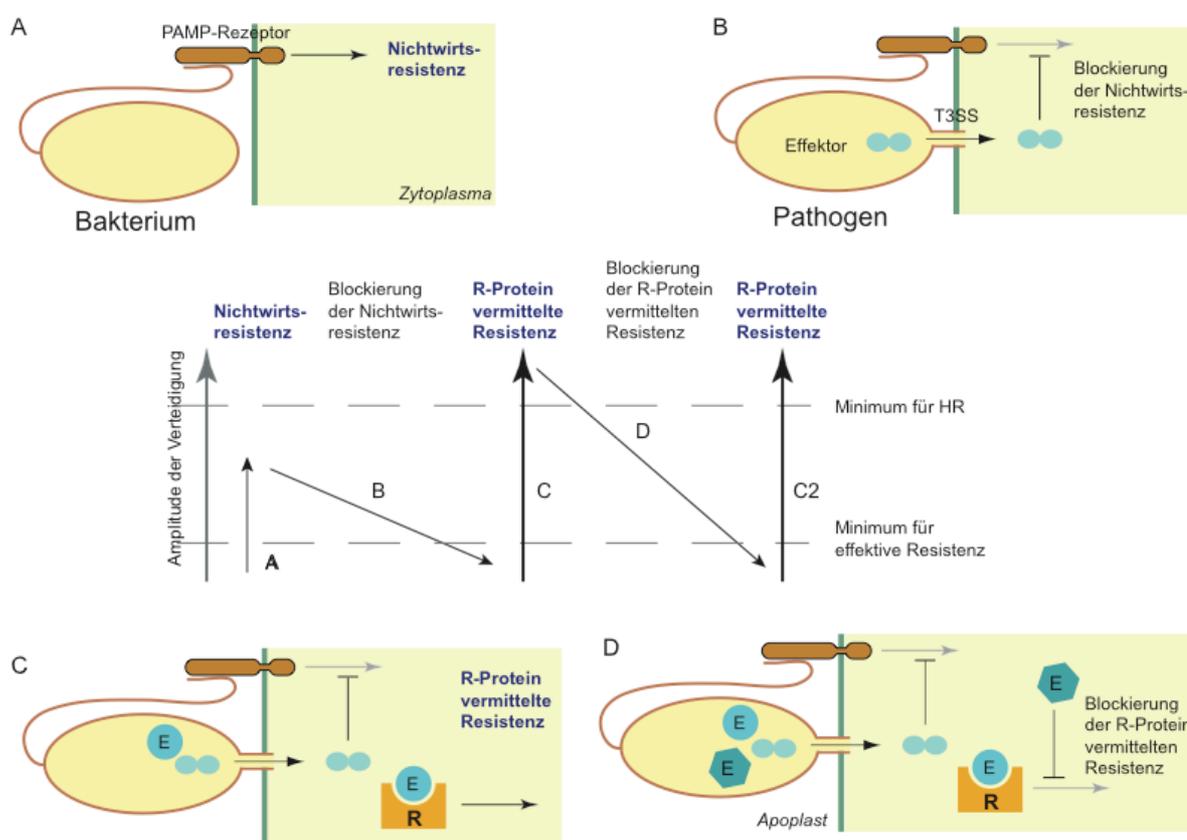


Abb. 1.1: Das Zick-Zack-Modell

A: Dringen Bakterien in das Pflanzengewebe ein, so lösen sie Nichtwirtsresistenz aus.

B: Um Nichtwirtsresistenz zu unterdrücken, haben bakterielle Pathogene Effektorproteine entwickelt, die sie mittels eines Typ III-Sekretionssystems in das Wirtszcytoplasma translozieren.

C: Resistenz (R)-Proteine vermitteln die Erkennung der Effektoren. Die R-Protein-vermittelte Resistenz resultiert häufig in einer lokalen hypersensitiven Reaktion (HR).

D: Bakterielle Pathogene können die R-Protein-vermittelte Resistenz unterdrücken, indem sie z. B. neue oder sequenzveränderte Effektoren translozieren, die die ausgelöste Signalkaskade inhibieren.

Abb. modifiziert nach Jones und Dangl, 2006 und Schornack, 2006

Viele Pathogene können die PTI unterdrücken (Zhou und Chai, 2008) und sind nur deshalb in der Lage, Krankheitssymptome auszulösen. Zum Beispiel können einige bakterielle Effektorproteine die Einlagerung von Kallose in die Zellwand supprimieren (Underwood *et al.*, 2007). Solche Eingriffe in die Physiologie der Pflanzenzelle werden durch Resistenzproteine (Abschnitt 1.2) überwacht, mit deren Hilfe die Effektoren erkannt werden und dann eine Resistenzreaktion (ETI; siehe 1.1.2) ausgelöst wird. Die nächste Anpassung auf Seiten der Pathogene war die Entstehung weiterer bzw. modifizierter Effektorproteine. Zahlreiche bakterielle Effektorproteine sind z. B. in der Lage die HR zu supprimieren (Guo *et al.*, 2009; Metraux *et al.*, 2009). Dadurch evolvierten die Pathogene weitere Abwehrmechanismen gegen die pflanzliche Resistenzreaktion.

1.1.4 Interaktionen zwischen Effektorprotein und Resistenzprotein

Die einfachste Möglichkeit der Erkennung eines Effektorproteins durch sein korrespondierendes R-Genprodukt ist die direkte Interaktion der beiden Proteine (Rezeptor-Liganden-Modell, Gabriel und Rolfe, 1990). Bisher konnte jedoch nur für einige Effektoren eine direkte Interaktion mit ihrem Resistenzprotein nachgewiesen werden, z. B. für das *Ralstonia solanacearum* Effektorprotein PopP2 und das korrespondierende R-Protein RRS1-R aus *Arabidopsis thaliana* (Deslandes *et al.*, 2003) oder die Interaktionen zwischen dem Effektorprotein AvrL567 aus *Melampsora lini* und den Resistenzproteinen L5, L6 oder L7 aus dem Rostpilz *Linum usitatissimum* (Dodds *et al.*, 2006).

Einen weiteren biochemischen Erklärungsansatz zur Gen-für-Gen Resistenz bietet das ‚Wächter‘-Modell (*guard-model*, van der Biezen und Jones, 1998). Es postuliert, dass das R-Protein strukturelle oder funktionelle Änderungen des Effektor-Virulenztargets detektiert und daraufhin eine Resistenzreaktion auslöst.

Eine Erweiterung dieses Modells stellt das *decoy*-Modell dar (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Ein *decoy* (‚Falle‘ oder ‚Lockvogel‘) ist ein Virulenztarget, dessen Avr- induzierte Modifikation nicht zu einer erhöhten Virulenz des Pathogens in suszeptiblen Pflanzen führt aber zur Erkennung durch das R-Protein. Das *decoy* ist jedoch für die Funktionalität der Pflanze in Abwesenheit des Pathogens nicht notwendig. Ein Beispiel hierfür wäre das Zusammenspiel zwischen dem Effektor Avr2 aus *Cladosporium fulvum* und dem *decoy* RCR3. Die Inhibition der Protease

RCR3 durch Avr2 wird von dem R-Protein Cf-2 erkannt und führt zu einem programmierten Zelltod in Tomate (Shabab *et al.*, 2008).

1.2 Resistenzproteine

1.2.1 Einteilung der Resistenzproteine

Resistenzproteine lassen sich in sechs Klassen unterteilen (Park und Paek, 2007). Klasse I -Resistenzproteine bestehen nur aus einer Kinase Domäne und sind im Zytoplasma der Pflanzenzelle lokalisiert wie z. B. Pto aus *Solanum lycopersicum*. Resistenzproteine des Typs II und III gehören zu den so genannten NB-LRR-Proteinen, Proteinen mit Nukleotidbindedomäne und einer Leucin rich repeat-Domäne. Sie unterscheiden sich nur in ihrer N-terminalen Domäne, die entweder eine *Coiled Coil* Domäne (CC, Klasse II, z. B. Rx aus *Solanum tuberosum*) oder eine Toll/Interleukin1 Rezeptor Domäne (TIR, Klasse III, z. B. Bs4 aus *S. lycopersicum*) besitzen. Beide Gruppen sind ebenfalls im Zytoplasma der Pflanzenzelle lokalisiert. Die Resistenzproteine der IV. Klasse bestehen aus einer extrazellulären LRR-Domäne und einem Membrananker, wie bspw. das Protein Cf-2 aus *S. lycopersicum*. Die V. Klasse besitzt neben der extrazellulären LRR-Domäne und einem Membrananker eine intrazelluläre Kinase-Domäne wie z. B. Xa21 aus *Oryza sativa*. Die sechste Gruppe beinhaltet alle Resistenzproteine, die sich keiner der anderen Gruppen zuordnen lassen, wie z. B. Mlo aus Gerste oder Bs3 aus Paprika (Abschnitt 1.6).

Eine gut untersuchte Gruppe von Resistenzproteinen sind die NB-LRR-Proteine, da sie sehr häufig vorkommen. Allein in Arabidopsis sind 150 NB-LRR-Gene bekannt (Jones, 2001), in Reis sind über 400 vorhergesagt (Tameling und Takken, 2008).

1.2.2 Bekannte und vermutete Funktionen der R-Protein Domänen

Die einzelnen *repeats* der pflanzlichen LRR-Domäne bestehen aus 24-28 Aminosäuren (As) mit einem konservierten 14 As-Motiv (LxxLxxLxLxxC/Nxx), wobei die variablen As Lösungsmittlexponiert sind und die Gesamtzahl der *repeats* variabel ist. Somit kann die LRR-Domäne pflanzlicher R-Proteine wahrscheinlich die Spezifität der Avr-Erkennung bzw. bei einigen R-Proteinen der Klassen IV und V die Spezifität der PAMP-Erkennung bestimmen (Tameling und Takken, 2008).

Für die Kinase-Domäne der pflanzlichen R-Proteine wird angenommen, dass sie nach einer Avr-induzierten Konformationsänderung entweder sich selbst oder einen Partner phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung wird die Signalkaskade ausgelöst (Schwessinger und Zipfel, 2008).

Für die IV. Klasse der R-Proteine wird postuliert, dass sie bei der Interaktion mit einem Avr Heterodimere mit R-Proteinen der V. Klasse bilden, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind. Ein ähnliches Zusammenspiel zweier *Pattern recognition receptors* konnte für FLS2 und BAK1 aus Arabidopsis nachgewiesen werden, die das PAMP Flagellin erkennen (Zipfel, 2009).

Neben der LRR-Domäne sind auch die N-terminalen Domänen (TIR oder CC) der NB-LRR-Proteine an der Erkennung des Effektors bzw. des *decoys* beteiligt. So konnte nachgewiesen werden, dass die CC-Domäne von RPM1 mit RIN4 nach dessen Phosphorylierung durch AvrB interagiert (Tammeling und Takken, 2008).

Die NB-Domäne selbst ist für die Generierung des Signals zuständig. Sie enthält neben dem konservierten Nukleotidbindemotiv ein ATPase-Motiv. Die ATPase-Funktion konnte bisher für I-2, Mi-1 und N bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mutationen im P-Loop zu einer reduzierten ATP-Bindung und -Hydrolyse sowie zu einem partiellen oder vollständigem Verlust der HR führen (Takken und Taming, 2009).

Außerdem können NB-LRR-Proteine als transkriptionelle Coregulatoren wirken. Für Mla10 konnte die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor *HvWRKY2* gezeigt werden (Shen und Schulze-Lefert, 2007). Für Rx und PopP2 ist die Kernlokalisierung nach Avr-Erkennung notwendig für ihre Resistenzfunktion (Tammeling und Takken, 2008). Für das Klasse IV R-Protein Cf-4 und die CC-NB-LRR-Proteine Prf, Rx und Mi-1.2 konnte gezeigt werden, dass sie ein weiteres CC-NB-LRR-Protein für ihre Resistenzfunktion benötigen (Gabriels *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass die Signalkaskaden der verschiedenen R-Proteine miteinander vernetzt sind und könnte erklären, warum es eine limitierte Anzahl an konservierten nachgeschalteten Signalwegkomponenten gibt.

1.2.3 Wirkungsweise einiger bekannter genereller Signalwegkomponenten

Für die Resistenzfunktion verschiedener R-Proteine sind unter anderem die Signalwegkomponenten SGT1 (*suppressor of the G2 allele of SKP1*), RAR1

(*required for Mla12 resistance*) und Hsp90 (*heat shock protein 90*) essentiell (Kadota *et al.*, 2010).

Das Chaperon Hsp90 kann in Abwesenheit des Effektors an das erkenntnis-kompetente NB-LRR-Protein binden und dessen Zustand stabilisieren (Kadota *et al.*, 2010). Ist die Menge des Hsp90 reduziert, wird auch die Menge des NB-LRR-Proteins reduziert, was zu einem Verlust der HR führt. Allerdings konnte der Verlust der HR für Bs2, Bs4 und N auch nach Überexpression des Hsp90 beobachtet werden (Schornack, 2006). Wahrscheinlich verhindert Hsp90 die Konformationsänderung des R-Proteins vom erkenntnis- zum signalkompetenten Zustand, was die Signalweiterleitung blockieren oder zumindest verzögern würde.

Als Cochaperone von Hsp90 werden RAR1 und SGT1 diskutiert (Shirasu, 2009). Diese beiden Proteine können miteinander und mit Hsp90, sowie mit Komponenten des COP9 (*constitutive photomorphogenic*) -Signalosoms interagieren (Azevedo *et al.*, 2006; Kadota *et al.*, 2010). SGT1 interagiert außerdem mit Komponenten des SCF (*SKP1-Cullin-F-Box-Protein*) -Ubiquitin-Ligase-Komplex (Azevedo *et al.*, 2002). COP9 und SCF sind am regulierten Ubiquitin-abhängigen bzw. Proteasom-vermittelten Proteinabbau beteiligt. Potentielle Targets für den SGT1- bzw. RAR1-vermittelten Proteinabbau könnten die NB-LRR-Proteine selbst oder negative Regulatoren der Immunabwehr sein (Shen und Schulze-Lefert, 2007). Bei einer Blockierung des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus durch die Überexpression einer Ubiquitinmutante oder durch chemische Inhibition mit Geldanamycin, konnte zwar eine reduzierte HR aber keine Akkumulation der R-Proteine Bs4 bzw. RPM1 nachgewiesen werden (Schornack, 2006). Dies deutet darauf hin, dass die reduzierten Mengen des R-Proteins nicht immer auf einem Ubiquitin-abhängigen Abbau beruhen. Die Regulation der NB-LRR-Proteinfunktion erfolgt anscheinend durch ein komplexes Zusammenspiel stabilisierender und abbauender Prozesse.

1.3 Das Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Um Pflanzen-Pathogen-Interaktionen zu studieren, untersucht man genetisch und molekularbiologisch „greifbare“ Systeme. Ein gutes Modellsystem ist die Interaktion zwischen *Xanthomonas* und Paprika-Pflanzen.

Bakterien der Gattung *Xanthomonas* sind Gram-negativ und meist polar monotrich begeißelt. Namensgebend ist die gelbe Pigmentierung, die von Brom-haltigen Polyenverbindungen verursacht wird. Die Bakterien sind biotroph und leben

epiphytisch oder im Interzellularraum von Wirtspflanzen (Swings und Kersters, 1993). Auf der Basis ihres Wirtsspektrums werden die *Xanthomonas*-Spezies in verschiedene Pathovaren (pv.) unterteilt.

Das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) wurde erstmals 1921 sowohl in Südafrika (Doidge, 1921) als auch in Amerika (Gardner und Kendrick, 1921) aus Tomatenpflanzen isoliert. Dye (1978) konnte nachweisen, dass *Xcv* der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate ist. *Xcv* dringt über Spaltöffnungen oder Verwundungen in die Pflanze ein und vermehrt sich im Apoplasten suszeptibler Wirtspflanzen (Abb. 1.2F). Im Gegensatz zu einigen anderen *Xanthomonas*-Stämmen verbreitet sich *Xcv* nicht systemisch in der Pflanze, sondern ist auf die lokale Infektionsstelle beschränkt. In Gegenden mit feuchtwarmem Klima ist *Xcv* besonders ertragsschädigend, da häufige und ergiebige Regenfälle die Verbreitung der Bakterien besonders begünstigen. Befallene susceptible Pflanzen zeigen makroskopisch wässrige Läsionen (*water soaked lesions*, WS) auf Blättern und Früchten, die später nekrotisch werden (Abb. 1.2A-C). Resistente Kultivare zeigen keine makroskopischen Symptome.

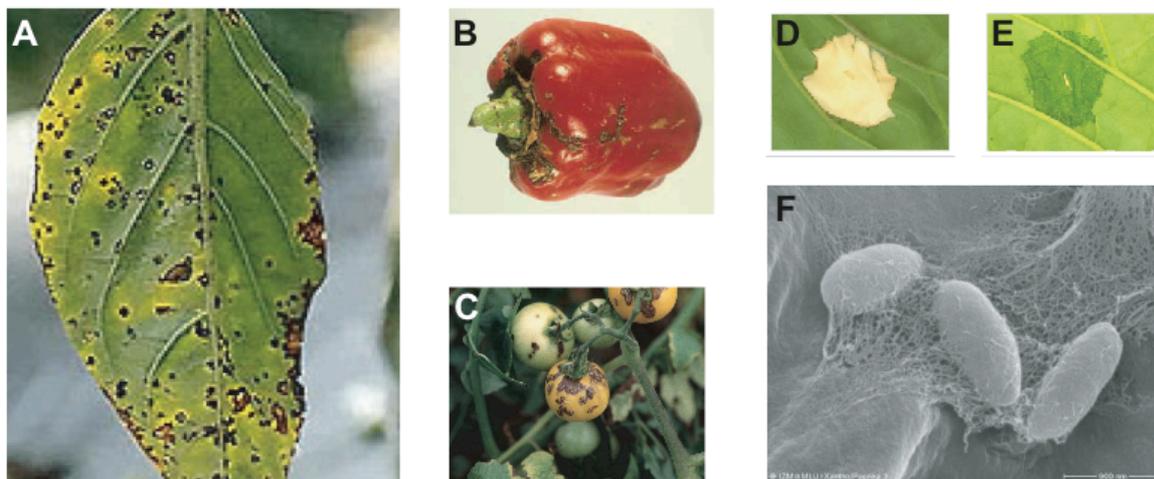


Abb. 1.2: Bakterielle Fleckenkrankheit verursacht durch *Xcv*

Das virulente Bakterium *Xcv* verursacht auf suszeptiblen Paprika- und Tomatenpflanzen wässrige Läsionen, die später nekrotisch werden. Hier gezeigt auf **A**: einem Paprikablatt **B**: einer Paprikafrucht **C**: einer Tomatenfrucht.

Für Analysen im Labor werden die Bakterienstämme in hohen Zelldichten inokuliert (4×10^8 Zellen/ml). **D**: ein avirulenter *Xcv*-Stamm auf einem resistenten Paprikablatt führt zu einer HR, **E**: ein virulenter *Xcv*-Stamm auf einem suszeptiblen Paprikablatt führt zu einer wässrigen Läsion. **F**: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Xcv* im Mesophyll eines Paprika-Blattes (Bildquellen: A: avrdc.org/LC/pepper/bactspot.html, B: vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/impt_diseases/pepper/pep_Bact.htm, C: plaza.ufl.edu/jbjones/joneslab/bacterial_spot_of_tomato.htm, D und E: pflanzengenetik-halle.de/staff-bonas-research.html, F: G. Hause)

Bei Inokulation mit hohem *Xcv*-Titer dagegen kommt es zwei bis drei Tage nach der Infektion zur Ausbildung einer flächigen HR im Bereich des inokulierten Gewebes (Laborphänotyp, Abb. 1.2D). Für das Ausprägen sowohl der Krankheitssymptome als auch der HR ist das durch die Gene des *hrp*-Genclusters (Hypersensitive Reaktion und Pathogenität) codierte Typ-III-Sekretionssystem notwendig, welches Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszellen transloziert (Hueck, 1998; Büttner und Bonas, 2006).

1.4 Effektorproteine von *Xanthomonas*

Die ersten Effektorproteine wurden anhand ihrer Funktion, als Auslöser einer HR in resistenten Kultivaren, identifiziert und als Avirulenzproteine bezeichnet. Vor etwa 15 Jahren erkannte man, dass Avr-Proteine TypIII-sekretierte Effektorproteine darstellen (Gopalan *et al.*, 1996; He *et al.*, 2004). Viele Effektoren und Effektorkandidaten wurden seitdem identifiziert (Kay und Bonas, 2009).

Einige Effektoren lassen sich nach ihrer Struktur und Sequenzhomologie in Gruppen einteilen. Intensiv untersucht ist die AvrBs3/PthA-Familie, die heute nach ihrer Funktion auch als TAL (*Transcription activator-like*)-Effektoren bezeichnet werden.

1.5 AvrBs3 als Vertreter der TAL-Effektor-Familie

AvrBs3 wurde als erster Vertreter seiner Proteinfamilie AvrBs3/PthA (TAL-Effektoren) aus *Xcv* isoliert (Bonas *et al.*, 1989). Das konstitutiv exprimierte *avrBs3*-Gen ist auf einem endogenen Plasmid lokalisiert und codiert für ein 122 kDa Protein (Knoop *et al.*, 1991).

Inzwischen wurden über 30 Mitglieder dieser Proteinfamilie aus verschiedenen *Xanthomonas* spp. und *Ralstonia solanacearum* isoliert. Southern Blot- und Genomanalysen identifizierten zahlreiche weitere Homologe, für die oftmals bisher keine biologische Aktivität gezeigt werden konnte (White *et al.*, 2009).

Alle Mitglieder der TAL-Effektor-Familie zeichnen sich durch eine sehr konservierte Struktur aus. Wie in Abb. 1.3 dargestellt, ist im N-terminalen Bereich ein Sekretions- und Translokationssignal. Im zentralen Bereich des Proteins befindet sich die DNA-Bindedomäne, die 1,5 (Avr/Pth3, Wu *et al.*, 2007) bis 33,5 (XOO3014, Lee *et al.*, 2005) hintereinander geschaltete Wiederholungen eines meist 34 Aminosäuren

langen Sequenzmotivs (*repeat unit*) umfasst. Ausnahmen gibt es in AvrXa7 (Yang *et al.*, 2000) und anderen Proteinen, die einzelne *repeats* mit nur 33 Aminosäuren haben und bei den Proteinen Hax1 und Hax2 aus *X. campestris* pv. *armoraciae*, die ausschließlich 35-Aminosäure-*repeats* beinhalten (Kay *et al.*, 2005). AvrBs3 besitzt 17,5 *repeats*. Diese *repeats* sind untereinander hoch homolog, weisen jedoch oft Variationen an Position 12 und 13 auf, die daher als hypervariable Reste bezeichnet werden (Hopkins *et al.*, 1992; Bonas *et al.*, 1993). Die Zahl und die Anordnung der *repeats* bestimmen die DNA-Bindungsspezifität (Herbers *et al.*, 1992; Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009). Vermutlich bildet die *repeat*-Region eine Solenoid-Struktur aus, die sich um die DNA windet und einen Kontakt zwischen hypervariablen Aminosäuren jedes *repeats* und einzelnen DNA-Basen ermöglicht (Schornack *et al.*, 2006).

Im C-terminalen Bereich der AvrBs3/PthA-ähnlichen Proteine sind typisch eukaryotische Sequenzmotive lokalisiert: zwei - manchmal auch drei - funktionale Kernlokalisierungssignale (*nuclear localisation signal*, NLS) und eine saure Aktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, AAD). Die NLSs ermöglichen die Interaktion mit Importin α , welches zusammen mit Importin β den Transport in den Zellkern vermittelt (Szurek *et al.*, 2001; Goldfarb *et al.*, 2004). Die AAD ist vermutlich durch eine Rekrutierung der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie in der Lage die Transkription von Suszeptibilitätsgenen zu aktivieren (Szurek *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2007).

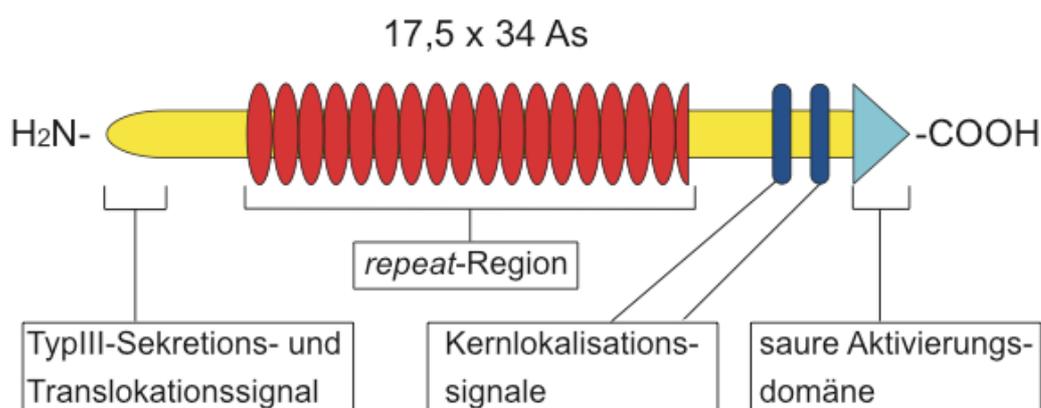


Abb. 1.3: Struktur des AvrBs3-Proteins als Vertreter der TAL-Effektor-Familie

Im N-terminalen Bereich befindet sich ein TypIII-Sekretions- und Translokationssignal, im zentralen Bereich eine repeat-Region (rot), die 17,5 Wiederholungen eines 34 Aminosäuremotivs aufweist. Im C-terminalen Bereich befinden sich zwei Kernlokalisierungssignale (dunkelblau) sowie eine saure Aktivierungsdomäne (hellblau).

Es konnte für AvrBs3 gezeigt werden, dass seine Virulenz- und Resistenzfunktion auf demselben molekularen Mechanismus beruht: AvrBs3 bindet spezifisch an DNA-Elemente in den entsprechenden Promotoren (UPA (*upregulated by AvrBs3*)-Box) und aktiviert die Transkription des betreffenden Gens (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Abb. 1.4). Ähnliches konnte für die Resistenzfunktion von AvrXa27 aus *X.oryzae* pv. *oryzae* (Gu *et al.*, 2005) und AvrBs3 Δ rep16 gezeigt werden. Beide Proteine binden spezifisch an den Promotor des korrespondierenden *R*-Gens und aktivieren dessen Transkription (Römer *et al.*, 2009a; Römer *et al.*, 2009b).

Das Allel, welches keine Resistenz vermittelt, weist eine Veränderung in den zu bindenden DNA-Elementen auf, die eine Transkriptaktivierung durch das jeweilige Effektorprotein verhindert, z. B. hat das *Bs3E*-Allel in seiner UPA-Box eine 13 bp Insertion im Vergleich zum *Bs3*-Allel. Diese bedingt, dass AvrBs3 diesen Promotor nicht aktivieren kann. (Römer *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2009b; Kay *et al.*, 2009).

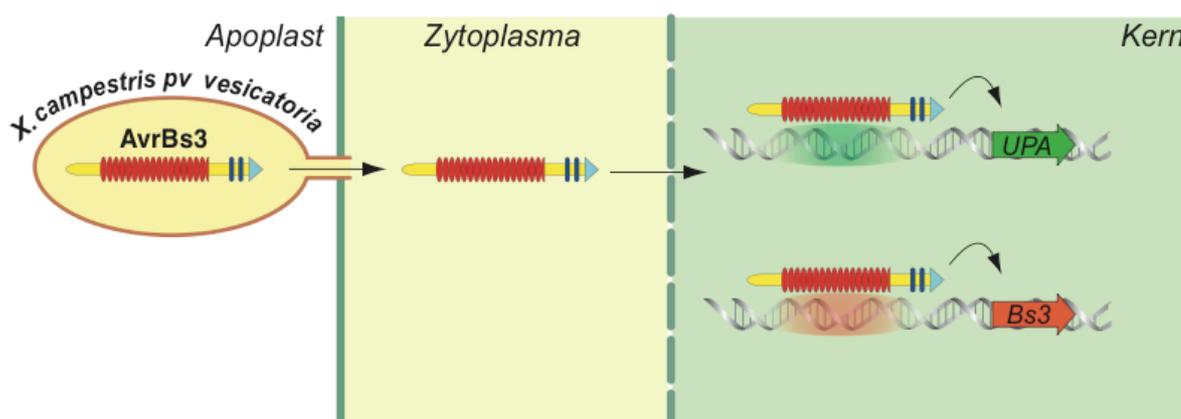


Abb. 1.4: AvrBs3 induziert UPA-Gene und das korrespondierende Resistenzgen *Bs3*

Xcv transloziert unter anderem den Effektor AvrBs3 in das Wirtszytoplasma. AvrBs3 bindet an die UPA-Box und aktiviert so die Transkription der UPA-Gene (UPA). In einer resistenten Pflanze wird auf die gleiche Weise zusätzlich die Transkription von *Bs3* aktiviert, was zu einer HR führt. (UPA = *up regulated by AvrBs3*)

Ebenso konnte für PthXo1 (Synonym: AvrXa13) aus *Xoo* nachgewiesen werden, dass es spezifisch an den Promotor von *xa13* bindet und dessen Transkription aktiviert (White und Yang, 2009; Römer *et al.*, 2010). Allerdings vermittelt die Expression von *xa13* keine Resistenz, sondern verschafft dem *Xanthomonas*-Stamm einen Wachstumsvorteil (Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009). Im Gegenzug ist im Allel *Xa13* (Os8N3), das Resistenz vermittelt, eine Bindung und Aktivierung durch den Effektor AvrXa13 nicht möglich. Ähnlich ist es bei AvrXa7: dieser Effektor induziert die Transkription von *xa7* (Os11N3) in suszeptiblen Reispflanzen. In AvrXa7-resistenten Reispflanzen liegt entweder das Allel *Xa7* oder

aber das rezessive *R*-Gen *xa5* (TFIIAg5) homozygot vor (Antony *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2010).

Aufgrund der hochkonservierten Struktur zwischen den TAL-Effektoren wird vermutet, dass alle Effektoren dieser Familie entweder ein korrespondierendes *R*-Gen transkriptionell aktivieren oder aber dass die transkriptionelle Aktivierung von Wirtsgenen durch das korrespondierende *R*-Gen supprimiert wird (White *et al.*, 2009).

Die einzige bisher bekannte Ausnahme ist AvrBs4, welches von dem Tomaten-Resistenzprotein Bs4 unabhängig von der Kernlokalisierung des Effektors AvrBs4 erkannt wird (Schornack *et al.*, 2004).

1.6 Das Resistenzgen *Bs3* aus Paprika

Das zu AvrBs3 korrespondierende *R*-Gen *Bs3* aus *Capsicum annuum* hat Homologie zu Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO; Römer *et al.*, 2007) und bildet somit eine Ausnahme innerhalb der R-Proteine, da die meisten bekannten R-Proteine den NB-LRR-Proteinen angehören (Park und Paek, 2007).

Bs3 weist eine hohe Homologie zu YUCCA-Proteinen aus *A. thaliana* auf (Römer *et al.*, 2007), die in der Auxin-Biosynthese involviert sind (Schlauch, 2007; Chandler, 2009). Die für FMOs charakteristischen Motive wie FAD-Bindestelle, NADPH-Bindestelle und FMO-Erkennungssequenz sind hochkonserviert zwischen den YUCCAs und Bs3 (Römer *et al.*, 2007). Aber im Gegensatz zu den YUCCA-Genen besteht das *Bs3*-Gen nur aus drei statt vier Exons.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Bs3* unter Kontrolle des konstitutiven, ‚starken‘ 35S CaMV Promotors, unabhängig von AvrBs3, ebenfalls eine Bs3-vermittelte HR auslöst (Römer *et al.*, 2007). Die Expression des Bs3-Proteins löst nicht nur in Paprika einen Zelltod aus, sondern auch in *Nicotiana benthamiana* (Römer *et al.*, 2007), *A. thaliana* (Römer und Lahaye, unveröffentlichte Daten) und in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* THY.AP4; Müglitz und Lahaye, unveröffentlichte Daten).

Wie der Bs3-vermittelte Zelltod ausgelöst wird, ist jedoch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Expression von einigen Signalkomponenten der NB-LRR vermittelten Resistenz (*SGT1* und *Hsp90*) auch eine verzögerte bzw. abgeschwächte Bs3-vermittelte HR-Reaktion bedingt (Römer und Lahaye, unveröffentlichte Daten).

1.7 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genetische Komponenten des Signalweges von der Expression des *Bs3*-Gens zur HR zu identifizieren.

Signalwegkomponenten können durch zwei verschiedene generelle Ansätze identifiziert werden: In einem *forward genetics*-Ansatz werden Mutanten isoliert, die in Anwesenheit von *AvrBs3* keine HR zeigen. Anschließend werden diese Mutanten genetisch charakterisiert. Bei einem *reverse genetics*-Ansatz werden Kandidatengene mutiert und anschließend analysiert, ob diese bei Anwesenheit von *AvrBs3* und *Bs3* keine HR mehr zeigen. Da *Bs3* kein typisches Resistenzprotein ist (siehe 1.2 und 1.6), können keine Aussagen über mögliche Kandidaten getroffen werden. Deswegen ist ein *forward genetics*-Ansatz von Vorteil.

Dafür sollten eine Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek in *N. benthamiana* und eine mutagenese-basierte Sichtung in einer *Bs3*-transgenen *A. thaliana*-Linie durchgeführt werden. Überlebende Mutanten der mutagenese-basierten Sichtung und Klone der Paprika-cDNA-Bibliothek, die bei Coexpression mit *avrBs3* und *Bs3* keine HR ausbilden, sollten identifiziert und anschließend weiterhin charakterisiert werden, um Einblicke in ihre Funktionsweise zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

In der Regel wurden die Chemikalien von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) geliefert.

Die nachfolgend genannten Chemikalien wurden von den angegebenen Herstellern bezogen: Restriktionsenzyme für molekularbiologische Arbeiten sowie Protein- und DNA-Marker von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland); Oligonukleotide von Metabion (Martinsried, Deutschland); MS (Medium nach Murashige und Skoog, 1962) von Duchefa (Haarlem, Niederlande); [α - 32 P]-dATP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol von Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland); das Detergenz Silwet L-77 von Lehle Seeds (Texas, USA) und Luciferin von Molecular Probes (Oregon, USA).

2.2 Verwendete Stämme, Oligonukleotide, Vektoren und Plasmide

2.2.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Resistenz/Selektionsmarker	Referenz
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Rif, Gent	Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974
<i>E. coli</i> ccdB-survival	-	Invitrogen
<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	Kan	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> Top10	-	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> AH109	ura ⁻ , leu ⁻ , ade ⁻ , trp ⁻ , met ⁻ , his ⁻	Clontech
<i>S. cerevisiae</i> THY.AP4	ura ⁻ , leu ⁻	Obdlik <i>et al.</i> , 2004
Xcv 85-10	Rif	Bonas <i>et al.</i> , 1989
Xcv 85-10 (pDS300)	Rif, Spec	Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996
Xcv I74a	Rif, Tet, Kan	Marois <i>et al.</i> , 2002
Xcv I74a (pDSK340)	Rif, Tet, Kan, Spec	Marois <i>et al.</i> , 2002

Die Tabelle gibt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme sowie deren Resistenzen bzw. Selektionsmarker an. Die Abkürzungen für die Antibiotika sind in Tab. 2.2 aufgeführt, außer Gent-Gentamycin. Die Hefestämme sind für die Synthese der Basen bzw. Aminosäuren defizient: ade⁻ Adenin, ura⁻ Urzyl, leu⁻ Leuzin, trp⁻ Tryptophan, met⁻ Methionin, his⁻ Histidin

2.2.2 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle des Anhangs 1 aufgeführt.

2.2.3 Verwendete Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind in der Tabelle des Anhangs 2 aufgeführt.

2.3 Computerprogramme und Datenbanken

Für die Erstellung von Alignments mehrerer Sequenzen bzw. von Phylogenetischen Stammbäumen wurde das Online-Programm ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) genutzt bzw. das Programm Geneious (<http://www.geneious.com>).

Für die Suche nach Homologen und die Identifizierung von Proteindomänen wurden folgende Datenbanken genutzt:

NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Solgene-Datenbank	http://210.218.199.240/SOL
Prosite	http://www.expasy.ch/prosite
Interpro	http://www.ebi.ac.uk/interpro
TMHMM Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0
rscb-Datenbank	http://www.pdb.org

2.4 Medien und Anzuchtbedingungen

2.4.1 Anzucht von *N. benthamiana* und *C. annuum*

Die Kultivierung von *N. benthamiana* und *C. annuum* erfolgte auf Flora Dur B Erde (Flora Guard; Oldenburg, Deutschland).

Die Anzucht der *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 22 °C und 60 % Luftfeuchte bzw. bei Nacht: 19 °C und 40 % Luftfeuchte) in vollklimatisierten Gewächshauskammern. Die Paprikapflanzen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert mit Ausnahme der Tagestemperatur, 24 °C.

2.4.2 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,0) mit den entsprechenden selektiven Antibiotika bei 37 °C. Platten enthielten zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar.

Die Kultivierung von Agrobakterium- Stämmen erfolgte in YEB-Medium (5 g/l Bacto Beef Extrakt, 1 g/l Yeast Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 2 mM Magnesiumsulfat, pH 7,2) mit den selektiven Antibiotika bei 30 °C. Platten wurde ebenfalls 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

Xanthomonas-Stämme wurden auf festem NYG-Medium (5 g/l Pepton, 3 g/l Yeast Extrakt, 2 % Glycerin, 15 g/l Bacto-Agar, pH 7,2) mit selektiven Antibiotika bei 30 °C kultiviert.

Tab. 2.2: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Abkürzung	Konzentration im Medium
Ampicillin	Amp	0,1 mg/ml
Chloramphenicol	Cm	5 µg/ml
Hygromycin B	Hyg	41,2 µg/ml
Kanamycin	Kan	25 µg/ml
Rifampicin	Rif	0,1 mg/ml
Spectinomycin	Spec	0,1 mg/ml
Tetracyclin	Tet	0,4 mg/ml

Die Tabelle gibt die verwendeten Antibiotika, sowie ihre Abkürzung und Endkonzentration im Medium an.

2.4.3 Anzucht von Hefen

Hefestämme wurden vor der Transformation in YPD-Medium (20 g/l Difco Pepton, 20 g/l D- α -Glukose, 10 g/l Yeast Extrakt, 40 ml/l 25xDropout) bei 30 °C kultiviert.

Hefestämme mit Plasmid wurden in SD-Medium (6,7 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 20 g/l Zucker (D- α -Galaktose oder D- α -Glukose), 40 ml/l 25xDropout) ebenfalls bei 30 °C kultiviert. Platten wurde 20 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

25xDropout enthält alle benötigten Aminosäuren im 25fachen Überschuss und wurde nach den Angaben im Yeast Protocols Handbook (2008) von Clontech hergestellt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*; Saiki *et al.*, 1985) ermöglicht die Amplifizierung

von DNA-Abschnitten, die von zwei definierten DNA-Sequenzen begrenzt werden. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit Heizdeckel (Flex Cycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt.

Im Allgemeinen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Template	50 ng		
10x Puffer	2 µl	oder 4 µl	5xPuffer HF oder 5x Puffer GC
dNTPs (je 10 mM)	2 µl		
Primer (je 1 µM)	2 µl		
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	oder 0,2 µl	Phusion Polymerase
H ₂ O	ad 20 µl		

Puffer HF und GC wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Der 10x Puffer für die *Taq*-Polymerase setzt sich wie folgt zusammen: 200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 100 mM (NH)₃SO₄; 1 % Triton X-100).

Üblicherweise lag der PCR folgendes Programm zu Grunde:

Denaturierung	95 °C 2 min	
Denaturierung	95 °C 15 sec	}
Annealing	55 °C 15 sec	} 35 Zyklen
Elongation	72 °C variabel	}
Elongation vervollständigen	72 °C 5 min	
Abschließende Kühlung	12 °C unendlich	

Die Elongationszeit richtet sich nach der Fragmentlänge und der genutzten Polymerase. Als Richtwert dienten folgende Angaben: für *Taq* 1 min pro 1 kb bzw. für Phusion 30 sec je 1 kb. Die Annealingtemperatur kann abweichen, wenn ein Primer eine Schmelztemperatur von deutlich über 60 °C oder unter 55 °C aufwies.

Für die Suche nach positiven Klonen mittels Kolonie-PCR wurden die *E. coli*-Zellen direkt in die PCR eingesetzt und der primäre Denaturierungsschritt auf 5 min verlängert, um die Zellen aufzuschließen und die DNA für Oligonukleotide zugänglich zu machen.

2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Vektor-DNA und die DNA, die das gewünschte Insert enthielt, wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen für 2 h bei 37 °C (sofern für das Enzym keine anderen Angaben des Herstellers vorlagen) inkubiert und anschließend die

Restriktionsendonukleasen für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Ein Teil des Restriktionsansatzes wurde in einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Für klassische Klonierungen wurde das Insert mit dem Zielvektor gemischt und bei Raumtemperatur für 1,5 h ligiert. Ein einfacher Ligationsansatz setzt sich wie folgt

zusammen:	Zielvektor	ca. 100 ng
	Insert	5x ‚molarer‘ Überschuss
	10x Ligationspuffer	1 µl
	T4 Ligase	200 u
	H ₂ O	ad 10 µl

Für die Berechnung des 5x ‚molaren‘ Überschusses wurde folgende Formel genutzt:

$$\frac{m_{\text{Insert}}}{l_{\text{Insert}}} = 5 \times \frac{m_{\text{Vektor}}}{l_{\text{Vektor}}}$$
$$m_{\text{Insert}} = \frac{5 \times m_{\text{Vektor}} \times l_{\text{Insert}}}{l_{\text{Vektor}}} = \frac{[\text{ng}] \times [\text{bp}]}{[\text{bp}]}$$

Dabei steht m für die eingesetzte Masse und l für die Länge des Vektors bzw. des Inserts.

Im Anschluss wurde die Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

Die nach der chemischen Transformation (siehe Abschnitt 2.5.4) des Ligationsansatzes in Top10 oder ccdB-survival-Zellen erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR analysiert. Von positiven Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und diese nochmals zur Kontrolle in einem Restriktionsverdau analysiert und anschließend im Bereich des Inserts sequenziert.

TOPO® – Reaktionen

Eine einfache Möglichkeit PCR-Produkte in einem *high copy* (hc)- Vektor zwischen zu klonieren, ist das PCR-TOPO®-blunt-System von Invitrogen. Dabei wird ein *blunt end* PCR-Produkt mit Hilfe einer Topoisomerase I in den Zielvektor ‚pCRtopo bluntII‘ kloniert.

Dafür wurde folgendes gemischt und ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemokompetente Zellen transformiert:

PCR-Produkt	5 µl
Salz 1 : 4 verdünnt	0,5 µl
Vektor/Topoisomerase-Mix	0,5 µl

Die gleiche Technik wird genutzt, um einen *entry*-Vektor (aus pENTR™/D topo®) herzustellen. Dieser Vektor besitzt zwei *att*-sites, die die homologe Rekombination mit einem Zielvektor vermitteln. Auf diese Weise kann ein Insert leicht in verschiedene Zielvektoren kloniert werden (Karimi *et al.*, 2002).

Zu beachten ist dabei, dass der *forward*-Primer zur Amplifikation des PCR-Produktes zur gerichteten Insertion zusätzlich die Sequenz CACC beinhalten sollte, direkt vor der ersten Base des gewünschten Inserts.

LR – Rekombination

Um das gewünschte Insert von dem *entry*-Vektor in einen so genannten *destination*-Vektor zu klonieren, wurde eine LR-Rekombination durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Angaben von Invitrogen wurde für eine LR-Reaktion *entry*- und Zielvektor unabhängig von ihrer Konzentration gemischt und der Ansatz für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz in einer Chemotransformation (siehe Abschnitt 2.5.4) eingesetzt.

LR-Reaktionsansatz:	Zielvektor	3 µl
	<i>entry</i> -Vektor	1 µl
	TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)	4 µl
	LR-Rekombinase Mix II	2 µl

In-Fusion 2.0 Dry-Down Klonierungen

Bei der Klonierung von *blunt end*-Fragmenten können verschiedene Probleme auftreten, zum Beispiel die Orientierung des Inserts oder dass die T4-Ligase nicht nur die Fragmente miteinander verbindet, sondern auch einzelne Basenpaare entfernt. Um dies zu umgehen wurde der In-Fusion 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit von Clontech benutzt.

Diese Klonierung basiert auf einer Rekombination homologer unspezifischer Sequenzabschnitte (Zhu *et al.*, 2007). Deswegen wird das gewünschte Insert mittels PCR amplifiziert, so dass vor und hinter dem Insert 15 bp mit dem Zielvektor übereinstimmen (siehe Abb. 2.1).

Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

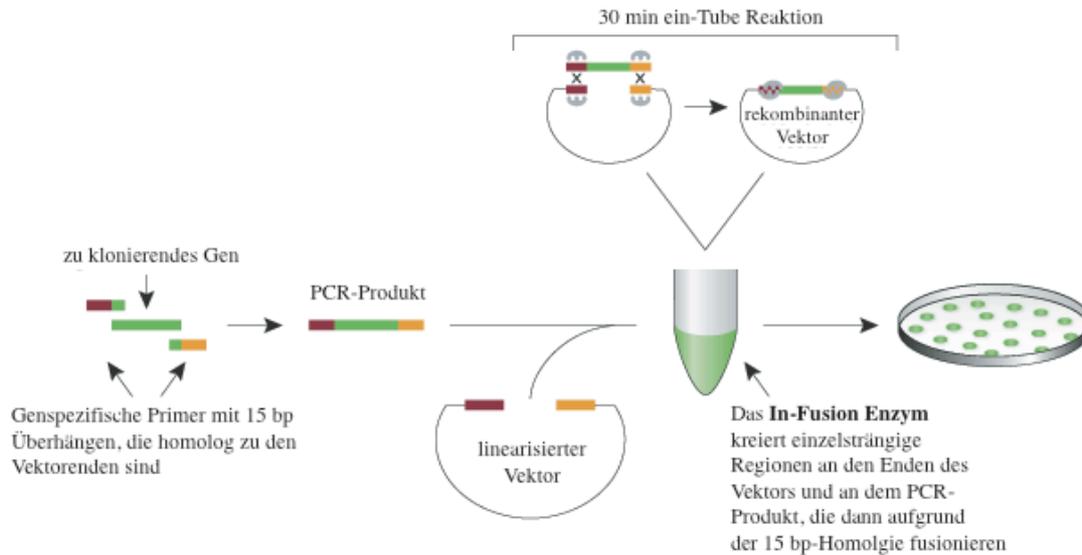


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des In-Fusion-Klonierungsprinzips

Das PCR-Insert muss eine 15 bp-Homologie mit jedem freien Vektorende aufweisen, um erfolgreich kloniert zu werden.

modifiziert nach: http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=206261&tabno=2

2.5.3 Sequenzierungen

Das verwendete Sequenzierungsverfahren beruht auf der Kettenabbruch-Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Statt der radioaktiv markierten Didesoxynukleotide wurden im hier benutzten Kit (Big Dye Terminator v1.3- Kit) vier verschiedene Fluorochrome zur Markierung der vier Didesoxynukleotide verwendet. Die nach der Sequenzierreaktion entstandenen Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einer CCD-Kamera detektiert (3130x/genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland)).

Für die Sequenzierung von Plasmidinserts wurden bei kleinen Vektoren (<5 kb) etwa 1 µg DNA eingesetzt, für Binärvektoren und den BAC-Klon 129M24 jeweils 2-3 µg DNA.

Sollte das Transgen in Arabidopsis-Linien sequenziert werden, wurde zunächst von den Linien DNA isoliert und diese (ca. 800 ng) als Template in einer PCR-Reaktion mit *Taq*-Polymerase zur Amplifikation des zu sequenzierenden Bereiches eingesetzt. Das Fragment der richtigen Größe wurde aus einem Agarosegel isoliert (2.5.9) und etwa 20 - 50 ng der Elution in einer Sequenzierreaktion eingesetzt.

2.5.4 Chemotransformation von Plasmiden in chemokompetente *E. coli*

Mit der Rubidiumchlorid-Methode wurden chemokompetente *E. coli* Top10 und *ccdB-survival* hergestellt (Mühlhardt, 2006) und in Aliquots von 150 µl bei -80 °C gelagert. Zur Transformation von Plasmiden wurde jeweils ein Aliquot der chemokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit maximal 10 µl Plasmid gemischt und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Hinterher wurden die Zellen bei 42 °C für ca. 45 sec einem Hitzeschock ausgesetzt und erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 250 µl LB-Medium zugegeben und der Mix bei 37 °C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.5 Transformation von Plasmiden in elektrokompetente *A. tumefaciens* GV3101

Es wurde nach einem Protokoll von Mühlhardt (2006) elektrokompetente *A. tumefaciens* GV3101 hergestellt und in Aliquots von 50 µl bei -80 °C gelagert. Zur Transformation von Plasmiden wurde jeweils ein Aliquot der elektrokompetenten *A. tumefaciens* GV3101 auf Eis aufgetaut und mit 2 µl der Plasmid-DNA gemischt. Im Anschluss wurde dem Gemisch in einer vorgekühlten 1 mm Küvette ein elektrischer Impuls ($U = 2500 \text{ V}$, $c = 25 \text{ mF}$, $R = 200 \text{ } \Omega$, $t = 5 \text{ ms}$) gegeben und danach 500 µl YEB-Medium dazu gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf einer selektiven YEB-Platte ausplattiert und für etwa 36 h bei 30 °C inkubiert

2.5.6 Cotransformation von Plasmiden in einen Hefestamm

Hefezellen wurden mit der LiAc-Methode (Ito *et al.* 1983) transformiert. Dabei wurde die Transformation nach dem Protokoll aus dem Yeast Protocols Handbook (PT3024-1, S. 20f.) von Clontech durchgeführt. Jedes Plasmid wurde mit ca. 300 ng in der Transformation eingesetzt.

2.5.7 Hefe-Dihybridanalysen

Es wurde das Gal4-Hefe-Dihybridsystem wie bei Chien *et al.*, 1991 beschrieben und der Hefestamm AH109 genutzt.

Nach der Cotransformation der Köder- und Beute-Vektoren wurden die Klone, die auf selektiven Platten (SD/Glc/-Trp/-Leu) gewachsen sind, auf frische Platten

übergestrichen. Der Stamm AH109 ist unter anderem Adenin- und Histidin-auxotroph. Bei Abwesenheit der genannten Chemikalien im Medium und ohne Aktivierung der Gene durch den Gal4-Transkriptionsaktivator kann er nicht wachsen. Außerdem besitzt dieser Stamm zusätzlich das *Melobiase(MEL1)*-Gen, welches ebenfalls durch den Gal4-Transkriptionsfaktor induziert wird. Somit wurde dem selektiven und induzierenden Medium (SD/Gal/-Ade/-His/-Leu/-Trp) zusätzlich X- α -Gal hinzugesetzt, um eindeutig auf Interaktion der exprimierten Proteine zu testen.

2.5.8 Minipräparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Übernachtskultur

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels eines alkalischen Zellaufschlusses einer Übernachtskultur von *E. coli* oder *A. tumefaciens* (Sambrook *et al.*, 1989) und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA. Dafür wurde das ‚mi-Plasmid Miniprep‘ Kit von Metabion verwendet und allen Angaben des Herstellers gefolgt. Für *hc*-Plasmide wurden 2 ml der Übernachtskultur eingesetzt und für *destination*-Vektoren sowie Plasmide aus *A. tumefaciens* 5 ml der Übernachtskultur.

2.5.9 Isolation von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem ‚GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification‘ Kit von GE Healthcare (München, Deutschland). Es wurde nach den vom Hersteller gemachten Angaben gearbeitet.

2.5.10 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA aus Blattmaterial erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Es wurden pro Probe jeweils 4 Blattscheiben mit dem Korkbohrer Größe 5 geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Schritt 3 wurde immer der RLT-Puffer benutzt, nie der RLC-Puffer. Der Schritt 7 wurde nur mit 350 μ l RW1-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurde die in der Säule gebundene RNA mit einer RNase-freien DNase (Qiagen) für 15 min inkubiert. Danach wurde erneut 350 μ l RW1-Puffer zugegeben und zentrifugiert. Dann wurde mit Schritt 8 des Qiagen-Protokolls fortgefahren. Zum Schluss wurde die RNA in 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und mittels Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer; Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland) die Konzentration bestimmt.

2.5.11 Semiquantitative RT-PCRs

Direkt nach der Isolation der RNA wurde die Erststrang-Synthese der cDNA durchgeführt mit dem ‚RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis‘ Kit von Fermentas. Für die miteinander zu vergleichenden Proben wurde immer die gleiche Menge RNA eingesetzt, meist 1000 ng oder 1500 ng. Es wurde immer der *random hexamer* Primer zur Synthese genutzt und dann entsprechend 25 °C für das Anlagern der Primer an die RNA eingestellt. Abgesehen davon wurde das von Fermentas vorgegebene Protokoll eingehalten.

Anschließend wurden verschiedene spezifische PCRs durchgeführt: Als Template dienten 0,5 µl der jeweiligen cDNA-Probe. Als Kontrolle für die Menge an eingesetzter RNA diente der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor 1 α , der mit den Primern ‚Ca-Elo-A02‘ und ‚Ca-Elo-B02‘ bei 55 °C Annealingtemperatur und 1:10 min Elongationszeit amplifiziert wurde. Da diese Primer so gewählt sind, dass sie ein Intron überspannen, kann mit dieser PCR auch festgestellt werden, ob die cDNA mit genomischer DNA kontaminiert ist. Der Bibliotheksklon 9G10 wurde in RT-PCR-Analysen mit den Primern ‚765 fwd‘ und ‚765rew‘ nachgewiesen. Der Bibliotheksklon 9A4 wurde mit den Primern ‚9A4 GR forw‘ und ‚9A4 GR rew‘ nachgewiesen. Das Transkript des *CaLRR-RLK*-Gens wurde mit den Primern ‚CaLRR-RLK forw‘ und ‚seqBAC7‘ nachgewiesen und das *Bs3*-Transkript mit den Primern ‚Bs3A forw‘ und ‚Bs3C rew‘.

2.5.12 Generierung in dieser Arbeit erstellter Plasmide

Generierung der Plasmide pK7FWG2-BAP1 und pK7FWG2-BON1

Es wurden die Gene *BON1* und *BAP1* bei ABRC bestellt und von den Vektoren pUNI51-BON1 bzw. pUNI51-BAP1 mit den Primern ‚BON1 entry fwd‘ und ‚BON1 entry rew‘ bzw. ‚BAPentry-fwd‘ und ‚BAPentry-rew‘ amplifiziert und die PCR-Produkte in pENTR™/D topo® kloniert (pENTR-BON1, pENTR-BAP1). Anschließend wurde jeweils eine LR-Rekombination mit dem Vektor pK7FWG2 durchgeführt. Die Plasmide pK7FWG2-BON1 und pK7FWG2-BAP1 wurden danach in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert.

Generierung der Silencingplasmide pTRV2a-765-1, pTRV2a-765-2

Das Silencing-Fragment 1, welches die ersten 824 bp des ‚KH-domain containing protein‘- ORFs beinhaltet, wurde mit den Primern ‚765 fwd‘ und ‚765rew‘ von dem Bibliotheksklon 9G10 amplifiziert. Das Silencing-Fragment 2, 1552-2040 bp des gleichen ORFs, wurde mit den Primern ‚entry765si_forw‘ und ‚entry765si_rew‘ ebenfalls von dem Bibliotheksklon 9G10 amplifiziert. Beide Fragmente wurden jeweils in pENTR™/D topo® kloniert (pENTR-765 und pENTRsi765) und anschließend in den Vektor pTRV2a rekombiniert. Die so entstandenen Plasmide TRV2a-765 und pYL279a-si765ΔN wurden in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert.

Generierung der Virusexpressionsplasmide pTRV2a-Ca- und pTRV2a-765-

Das Fragment CaLRR-RLK- wurde von dem Plasmid pENTR-CaLRR mit den Primern ‚CaminusOrient_forw‘ und ‚CaLRRAsc_forw‘ amplifiziert und in pENTR™/D topo® kloniert, das entstandene Plasmid heißt pENTR-Ca-. In diesem Plasmid befindet sich das Ende des *CaLRR-RLK*-Gens direkt neben der *attL1-site* und das Startcodon neben der *attL2-site*. Anschließend wurde mit diesem *entry*-Vektor und dem Vektor pTRV2a eine LR-Rekombination durchgeführt, um das Plasmid TRV2a-Ca- zu erhalten. In diesem Plasmid liegt das Gen in der richtigen Orientierung vor, um von dem 35S CaMV Promotor exprimiert zu werden. Danach wurde dieses Plasmid in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert. Für das ‚KH-domain containing-Protein‘ wurde in gleicher Weise verfahren. Der *entry*-Vektor pENTR-765-, der das Gen in der negativen Orientierung beinhaltet, wurde mittels PCR mit dem Bibliotheksklon 9G10 als Template und den Primern ‚765_minusOrient_forw‘ und ‚765_minusOrient_rew‘ generiert. Danach wurde das Fragment in den Vektor pTRV2a rekombiniert und das so entstandene Plasmid pTRV2-765- in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert.

Generierung des Silencingplasmids pTRV2a-CaLRR und des Expressionsplasmids pER10-CaLRR::GFP

Zunächst wurde ein *entry*-Vektor generiert, der das Gen *CaLRR-RLK* in andere Zielvektoren transferieren kann. Dafür wurde das Fragment mit den Primern ‚CaLRR-RLK forw‘ und ‚entry9A4rew‘ und cDNA von nicht-induzierten *C. annuum*

ECW-30R-Pflanzen als Template amplifiziert und mittels einer TOPO®-Reaktion in pENTR™/D topo® kloniert.

Anschließend wurde das Gen *CaLRR-RLK* mittels LR-Rekombination in die Zielvektoren pTRV2a bzw. pER10-GW-GFP transferiert und somit die Plasmide pTRV2a-CaLRR bzw. pER10-CaLRR::GFP erhalten.

Generierung des induzierbaren Hefepiasmids pYR-CaLRR

Das Plasmid pENTR-CaLRR diente als Template für eine PCR mit den Primern ‚CaLRRAsc_forw‘ und ‚CaLRRHind_rew‘. Das amplifizierte Fragment wurde mittels einer *topo*-Reaktion in den pCRtopo bluntII Vektor zwischenkloniert und das entstandene Plasmid pBACaLRRH genannt. Anschließend wurde sowohl der Zielvektor pYR-Kti11 als auch das Plasmid pBACaLRRH mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *HindIII* in 2xTango-Puffer geschnitten und anschließend ligiert. Das entstandene Plasmid heißt pYR-CaLRR.

Generierung der Hefe-Dihybridplasmide

Für die Hefe-Dihybridanalysen wurden die Vektoren pENTR-CaLRR bzw. pENTR-Bs3_{G39A} in einer LR-Rekombination mit entweder den Vektoren pGADT7 oder pGBST7 eingesetzt, um die Plasmide pGADT7-CaLRR und pGBST7-CaLRR bzw. pGADT7-Bs3m und pGBST7-Bs3m zu erhalten.

Generierung der Plasmide pENTR-Bs3::GFP10-5 und pGWB2-Bs3::GFP10-5

Für die Analyse des mutierten *Bs3*-Gens aus der *A. thaliana*-Linie 77-10-5 wurde zunächst genomische DNA (Abschnitt 2.8.3) von dieser Linie isoliert und anschließend mit den Primern ‚Bs3A forw‘ und ‚GFP rew‘ das mutierte *Bs3::GFP* amplifiziert und mittels einer *topo*-Reaktion in pENTR™/D topo® kloniert. Das entstandene Plasmid heißt pENTR-Bs3::GFP10-5. Anschließend wurde das mutierte *Bs3::GFP* mittels einer LR-Reaktion von pENTR-Bs3::GFP10-5 in pGWB2 transferiert und das Plasmid pGWB2-Bs3::GFP10-5 erhalten.

2.5.13 Western Blot Analysen

Für verschiedene Fragestellungen wurde ein Western Blot durchgeführt, z. B. um zu zeigen, dass die im Mikroskop beobachtete Lokalisierung von Proteinen nicht auf ein

Abspalten des Fluoreszenz-Tags zurückzuführen ist oder dass Proteine in vergleichbaren Mengen in verschiedenen Proben vorlagen und nicht einem Abbau unterliegen.

Das Verfahren selbst beruht darauf, dass Proteine der Größe nach in einer Polyacrylamidgel (PAG)-Elektrophorese aufgetrennt werden und anschließend mittels eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert werden (Sambrook *et al.*, 1989).

In dieser Arbeit wurden nach zwei Tagen jeweils vier Blattscheiben (Korkbohrer Größe 5) pro Probe geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Mörsern wurde 100 µl denaturierender Extraktionspuffer (8 M Urea) zugegeben, kurz gevortext und mit 25 µl 5xLämmli gemischt. Anschließend wurden die Zellwandbestandteile abzentrifugiert und der Überstand für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die PAG-Elektrophorese wurde bei 130 V für etwa 2 h in einem denaturierenden 10 % SDS-PAG (10 % Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,04 % TEMED) durchgeführt.

Als Blot-Technik wurde der semi-dry-Blot mit folgenden Bedingungen verwendet: 1,25 mA/cm² für 1-1,5 h.

Im Anschluss wurde die Membran für 1,5 h in 5 % Milchpulver/1xTBST (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 500µl/l Tween 20) inkubiert, um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1xTBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit 1x TBST gewaschen und für 1,5 h mit dem 2. Antikörper, der an eine Peroxidase fusioniert ist, inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde der 2. Antikörper mit Hilfe einer Luminollösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,42 mM Luminol; 75 µM p-Cumarsäure; 0,05 % H₂O₂) detektiert und auf einem Film sichtbar gemacht.

2.5.14 Zellfraktionierung

Diese Methode dient zum Beispiel dazu, die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins zu analysieren. Durch verschiedene Zentrifugationsschritte kann man einzelne Kompartimente der Zelle von einander trennen (Kim *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde nur die lösliche Fraktion von der Membran-Fraktion getrennt. Zunächst wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine Agrobakterium-vermittelt

in *N. benthamiana* exprimiert. Dann wurde je Probe 8 Blattscheiben (Korkbohrer Größe 5) 2 dpi geerntet und nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und dem Mörsern mit 500 µl MEB (10 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,33 M Saccharose, 1 mM EDTA, 40 µl/ml Protease-Inhibitor-Mischung (complete, EDTA-free; Roche, Mannheim, Deutschland)) gemischt. Dieses Gemisch wurde bei 8.000 g für 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es wurden 50 µl als Totalextrakt entnommen und zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die restlichen 450 µl des Überstandes wurden mit 10 µl 1 M CaCl₂ gemischt und für 1,5 h bei 50.000 g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)) zentrifugiert. Der Überstand bildet die lösliche Fraktion, die hauptsächlich Bestandteile des Zytoplasmas enthält. Das Pellet wurde in 460 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, 2 % SDS) resuspendiert und bildet die Membran-Fraktion. Die drei Fraktionen wurden anschließend in einem Western Blot analysiert (Abschnitt 2.5.13).

2.5.15 Co-Immunopräzipitation

Für Co-Immunopräzipitationsexperimente (Co-IP) wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine Agrobakterium-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. 48 hpi wurden 6 Blattscheiben mittels Korkbohrer Größe 4 geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Homogenisierung des Blattmaterials wurde 1 ml Co-IP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 µl/ml Protease-Inhibitor-Mischung) sowie eine Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen und 15 minütiger Zentrifugation wurde der Extraktüberstand mit 2 µl 15 %igem Nonidet-P40 versetzt, zu 25 µl Protein G-Agarose (Roche) gegeben und für 30 min bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Der vorgeklärte Extrakt wurde anschließend mit 25 µl Protein G-Agarose gemischt (Roche) und über Nacht bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4 °C kaltem Co-IP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 1 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-PAG aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (Abschnitt 2.5.13).

2.5.16 Inokulationsexperimente

Die verschiedenen Agrobakterienstämme wurden in selektivem Flüssigmedium über Nacht angezogen und anschließend abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in Agrobakterien-Infiltrationsmedium (AIM, 10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 150 µg/ml Acetosyringon) resuspendiert und anschließend die gewünschte Zelldichte (OD₆₀₀) am Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) eingestellt.

Xanthomonas- Stämme wurden auf selektiven Platten ebenfalls über Nacht angezogen. Für die Infiltrationen wurden die Bakterien mit einem flachen Holzstäbchen von den Platten abgenommen und in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und anschließend auf die gewünschte Zelldichte (OD₆₀₀) eingestellt.

Die Bakteriensuspensionen wurden dann in die Blattunterseite junger Blätter mit einer nadellosen Einwegspritze injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, das Blattgewebe nicht zu verletzen, damit die Verwundungsreaktion nicht mit dem beobachteten Phänotyp verwechselt werden kann. Die inokulierten Pflanzen verblieben in den Gewächshauskammern, in denen sie auch angezogen wurden.

2.5.17 Virusinduziertes Gensilencing und Virusinduzierte Expression

Der genutzte Virus

In dieser Arbeit wurde sowohl für das Virusinduzierte Gensilencing (VIGS) als auch die Virus-induzierte Expression der TRV (*tobacco rattle virus*, Liu *et al.*, 2002) verwendet.

Das virale Genom wurde zweigeteilt und als cDNA-Klone in je ein Ti-Plasmid kopiert. Der Vektor pTRV1 enthält die RNA1 und der Vektor pTRV2 die RNA2. Für eine vereinfachte Klonierung wurde der Polylinker im Vektor pTRV2 durch eine GATEWAY-Kassette ersetzt (Liu *et al.*, 2002). In diesen ursprünglichen Vektor pTRV2 wurde zur besseren Selektionierbarkeit eine Ampicillin-Resistenz eingefügt (Römer und Lahaye, unveröffentlichte Daten). Dieser neue Vektor wurde pTRV2a genannt. Hervorzuheben ist, dass die GATEWAY-Kassette in negativer Orientierung in den Vektoren pTRV2 und pTRV2a vorliegt, so dass bereits in der Expressionsphase antisense-mRNA entsteht.

Infiltrationsmethoden für VIGS oder Virusinduzierte Expression

Die jeweiligen *A. tumefaciens*-Übernachtskulturen pTRV1 und pTRV2a-GOI wurden wie unter 2.5.17 beschrieben vorbereitet und zu gleichen Teilen gemischt. Die Infiltration der *A. tumefaciens*-Bakteriensuspension erfolgte entweder mittels einer nadellosen Spritze oder per Vakuuminfiltration. Für die Spritzeninfiltration wurde die Suspension auf die OD₆₀₀ 0,2 eingestellt und mit der Spritze in die Blattunterseite der Versuchspflanzen (*N. benthamiana*) inokuliert. Bei der Vakuuminfiltration wurden die Bakteriensuspensionen auf die OD₆₀₀ 0,1 eingestellt und zur Verringerung der Oberflächenspannung 0,05 % Silvet L77 zugesetzt. Die Gefäße der Versuchspflanzen (*C. annuum*) wurden mit Kunststoffolie abgedeckt und zur Stabilisierung mit einer zur Hälfte geschlitzten Pappscheibe abgedeckt, um zu verhindern, dass Erde oder Wasser in die Bakteriensuspension tropft, und anschließend überkopf in ein geeignetes Gefäß mit der Bakteriensuspension getaucht. In einem Exsikkator wurden die Pflanzen etwa 3 min einem Vakuum ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Pflanzen für 10 bis 20 min seitlich liegend auf Papiertüchern getrocknet, um zu verhindern, dass Bakteriensuspension in die Erde gelangt.

Danach integriert die T-DNA in die genomische DNA der Pflanze und wird ebenfalls transkribiert. Nach der Translation der Viruskomponenten können diese assemblieren. Somit kann sich der Virus systemisch in der Pflanze ausbreiten und seine Erbinformation in andere Pflanzenzellen integrieren. Neben den viralen Genen werden auch große Mengen mRNA des exogenen Fragmentes erzeugt, was für die Virusinduzierte Expression genutzt wurde. Die Bildung von dsRNA, die bei der TRV-Replikation üblich ist, löste posttranskriptionelles Gensilencing (PTGS) in der Pflanze aus.

2.5.18 Plasmolyse

Bei der Plasmolyse werden Pflanzengewebe einem hohen osmotischen Druck ausgesetzt, so dass die Plasmamembran sich von der Zellwand ablöst und die Zelle sich zusammen zieht (Oparka, 1994).

In dieser Arbeit wurden Blattscheiben (Korkbohrer Größe 5) für eine Stunde in 0,8 M Mannitol inkubiert und anschließend mit dem Mikroskop analysiert.

2.6 Mikroskopie

Blattproben wurden je nach exprimiertem Konstrukt zwischen 2 und 3 dpi genommen und am konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (cLSM) LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert.

Für die GFP-Aufnahmen wurde zur Analyse der Breitbandfilter BP 505-530 nm genutzt, sowie der Argon-Laser mit der Wellenlänge von 488 nm zur Anregung der GFP-Fluoreszenz.

Die Aufnahmen für m-cherry fusionierte Proteine wurden mit dem Breitbandfilter BP 560-615 nm aufgenommen. Es wurde Laserlicht der Wellenlänge 543 nm zur Anregung genutzt (HeNe1 Laser).

2.7 Sichtung einer Paprika-cDNA-Expressionsbibliothek

Zur Identifizierung von Signalkomponenten der Bs3-vermittelten HR wurden cDNA-Fragmente einer Paprika-Bibliothek zusammen mit dem Resistenzgen *Bs3* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors und dem Avirulenzgen *avrBs3* transient in *N. benthamiana* coexprimiert. Die cDNA-Fragmente sollten unter der Kontrolle des starken, konstitutiven 35S CaMV Promotors exprimiert werden, was *in planta* zu einer Überexpression der korrespondierenden Proteine führt (Abschnitt 3.1, Abb.2.2).

2.7.1 Die cDNA- Bibliothek aus *Capsicum annuum*

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA-Bibliothek wurde von der Firma Invitrogen unter Nutzung der *ClonMiner*TM-Technologie hergestellt. Es handelt sich um eine gemischt-induzierte Bibliothek aus Pflanzenmaterial der zwei Paprika-Kultivare ECW-30R und ECW-10R, welches jeweils mit drei verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen, die die Effektoren *avrBs3*, *avrBs1* oder *avrBsT* in verschiedenen Kombinationen exprimieren, induziert wurde, sowie unbehandeltem Blattmaterial. Die isolierte RNA von dem beschriebenen Blattmaterial wurde zu gleichen Teilen gemischt, außerdem wurde die Bibliothek normalisiert und die cDNAs größer als 1,5 kb angereichert. Diese im Vektor pENTR222fl vorliegende Bibliothek besitzt 16×10^6 cfu, 96 % aller Klone tragen ein Insert und die Insertgröße beträgt im Mittel 1,7 kb (Angaben von Invitrogen).

Für die Expression der einzelnen Klone wurde diese Bibliothek in den Expressionsvektor pK7FWG2 überführt und ebenfalls von Invitrogen normalisiert.

Diese Expressions-Bibliothek hat 46×10^6 cfu Primärklone, 100 % dieser Klone haben ein Insert und die durchschnittliche Insertgröße beträgt 1,68 kb (Angaben von Invitrogen). Mit dem Ausdruck ‚die cDNA-Bibliothek‘ ist im Folgenden immer die Expressionsbibliothek im Vektor pK7FWG2 gemeint.

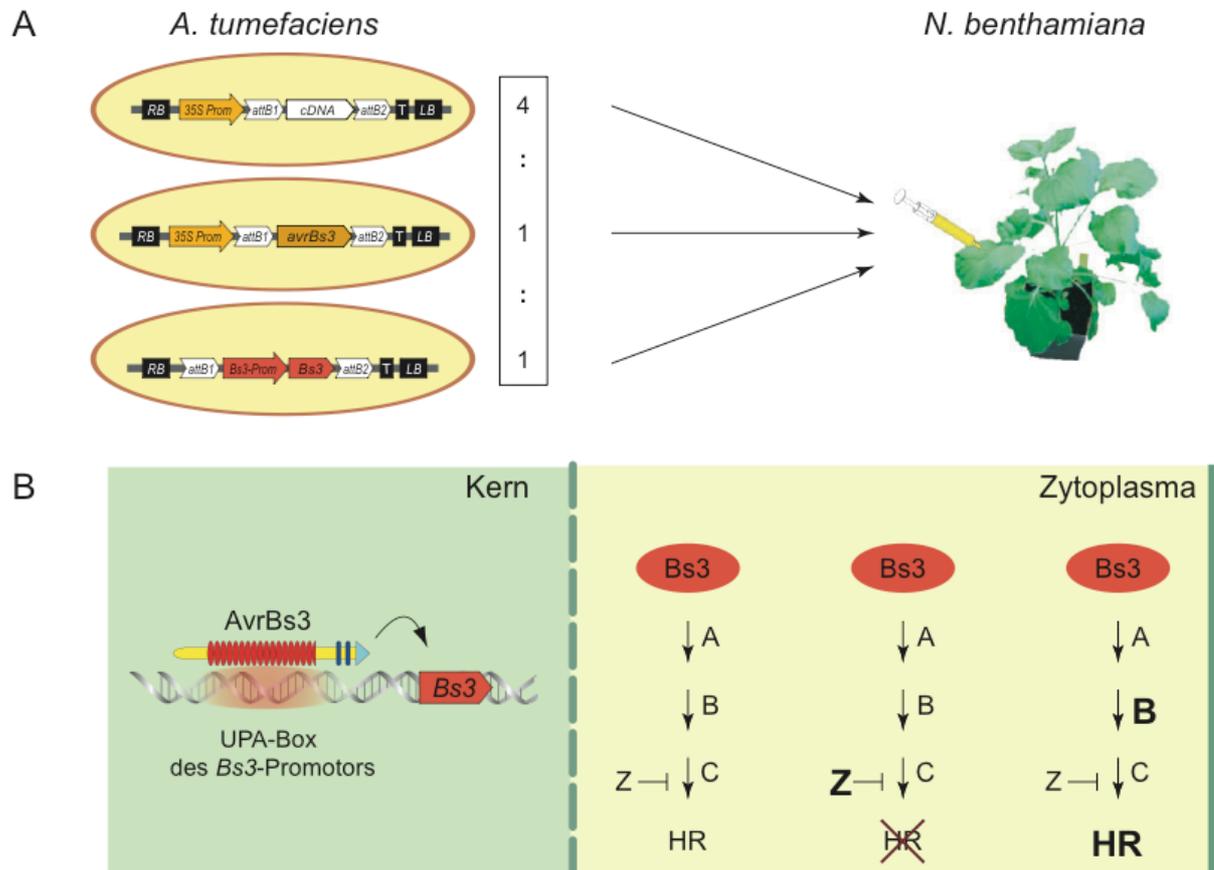


Abb. 2.2: Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek in *N. benthamiana*

A: Die drei Agrobakterienstämme, die die Expression der cDNA-Bibliothek, von *avrBs3* bzw. *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen Promotors vermitteln, wurden im Verhältnis 4 : 1 : 1 gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter coinfiltriert.

B: AvrBs3 induziert die Expression von *Bs3* (Abschnitt 1.4), welches mittels einer unbekanntes Signalkaskade (beispielhaft mit den Komponenten A, B, C und Z dargestellt) eine HR auslöst. Ist die coexprimierte cDNA ein Inhibitor des Signalweges (Z), so wird die *Bs3*-vermittelte HR supprimiert, entspricht die cDNA einem positiven Regulator der *Bs3*-vermittelten HR (A,B oderC) so wird die HR verstärkt.

2.7.2 Konjugation

Mittels Konjugation (Ditta *et al.*, 1980; Figurski und Helinski, 1979) wurden die Plasmide der Paprika-cDNA-Expressionsbibliothek von *E. coli* DHB10-T1 in *A. tumefaciens* GV3101 überführt. Die ersten 2972 Klone wurden einzeln konjugiert, die nachfolgenden fast 3000 Klone in drei Pools. Für die Einzelklonkonjugation wurde der *E. coli*-Donor-Klon, der das zu transferierende Plasmid pK7FWG2-libclone enthält, der Helferstamm *E. coli* HB101 (pRK2013) und der Agrobakterium-

Akzeptorstamm im Verhältnis 1 : 1 : 3 auf einer 1 % YEB-Agar-Platte vermischt und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Konjugationsgemisch auf eine 1,5 % YEB-Agar-Platte mit den selektiven Antibiotika Spectinomycin für das Plasmid und Rifampicin für die Selektion auf Agrobakterien übergestrichen und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Für die drei Poolkonjugationen wurde jeweils ein Aliquot der cDNA-*E. coli*-Bibliothek auf selektiven Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Klone gezählt und in 20 ml YEB resuspendiert. Anschließend wurde der *E. coli*-Helferstamm und der Agrobakterium-Akzeptorstamm in oben genannten Verhältnis dazugegeben und über Nacht in einem 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C ruhend inkubiert und am nächsten Tag auf selektive 1,5 % YEB-Agar-Platten ausplattiert, so dass pro Platte bis zu 500 Kone gewachsen sind.

Danach wurden die Agrobakterium-Klone in Mikrotiterplatten transferiert und über Nacht in selektivem Medium angezogen und anschließend als 25 % Glycerolstock bei –80 °C gelagert. Die Mikrotiterplatten wurden durchnummeriert. Somit ist jeder Einzelklon exakt bezeichnet: „3G7“ benennt beispielsweise den Klon in der Mikrotiterplatte Nr. 3, in der Reihe G, in der 7ten Spalte.

Tab. 2.3: Details zu den drei Poolkonjugationen

	Pool 1	Pool 2	Pool 3
Mikrotiterplatten	33 - 36	37 - 56	57 - 72
eingesetzte <i>E. coli</i> - Klone	ca. 2000	ca. 4.000	ca. 6.000
insgesamt erhaltene Agrobakterienklone	ca. 8.000	ca. 16.000	ca. 25.000
analysierte Agrobakterienklone	380	950	1520

Die Tabelle gibt an, wie viele *E. coli*- Klone für die jeweilige Poolkonjugation eingesetzt wurden, wie viele Agrobakterien-Klone insgesamt gewachsen wären, wenn der gesamte Ansatz ausplattiert worden wäre und wie viele dieser Agrobakterien-Klone anschließend analysiert wurden.

2.8 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

Für die mutagenese-basierte Sichtung in *Arabidopsis* wurde wie folgt vorgegangen: Die T₀ (*A. thaliana* Col-0) wurde transformiert, die T₁ erstmals auf Anwesenheit des Transgens selektioniert und dieses mittels PCR nachgewiesen. In der T₂ wurden sowohl Segregationsanalysen als auch Southern Blot Analysen zur Bestimmung der Kopienzahl des Transgens durchgeführt, sowie das Induktionsverhalten analysiert.

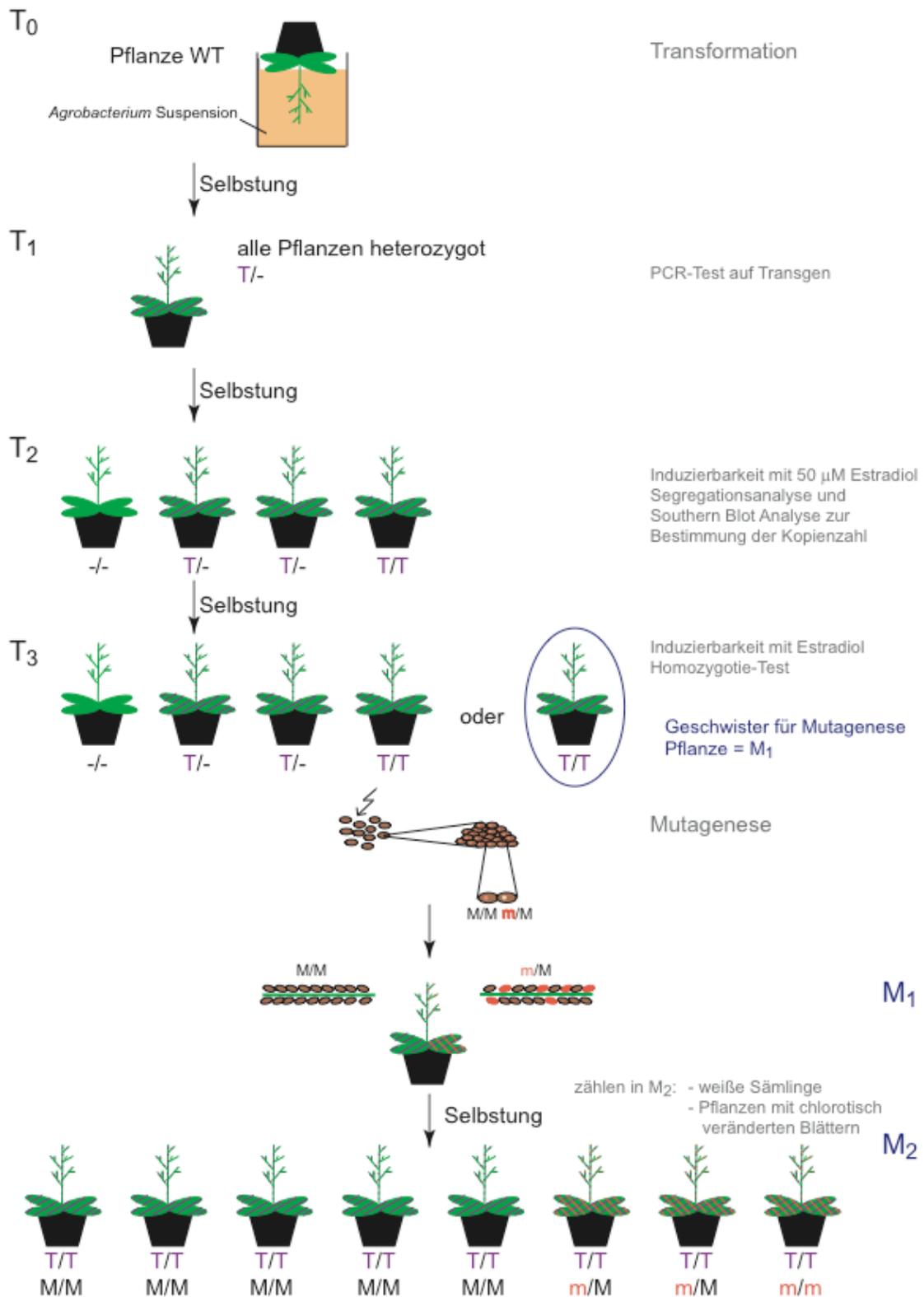


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Arbeiten mit transgenen Arabidopsis-Linien

Gezeigt ist, in welcher Generation welcher Versuch gemacht wurde und welche Genotypen vorliegen können. T-Transgen, m-Mutation. Abbildung modifiziert nach Page und Grossniklaus, 2002

In der T₃ wurden homozygote Tochterlinien identifiziert, die nur eine Kopie des Transgens besitzen, sowie der Phänotyp nach Induktion analysiert. Homozygote Tochterlinien, die nach Induktion den gewünschten Phänotyp (Zelltod oder Photonenemission) aufwiesen, wurden mutagenisiert. Die aus diesem mutagenisierten T₃-Saatgut resultierenden Pflanzen sind die M₁. In der nächsten Generation (M₂) liegen Mutationen erstmals homozygot vor. Deswegen wurde die M₂ gesichtet, um potentielle Kandidaten zu identifizieren, die die Bs3-vermittelte Zelltodreaktion beeinflussen. Außerdem wurde in einer nicht induzierten Population die ‚Mutageneserate‘ durch Zählen von weißen Sämlingen und Sämlingen mit chlorotisch veränderten Blättern abgeschätzt.

In Abb. 2.3 ist schematisch zusammengefasst mit welcher transgenen Arabidopsis-Generation, welcher Versuch durchgeführt wurde und welcher Genotyp vorliegen kann.

2.8.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Anzucht von *A. thaliana* auf Erde (Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinnatal-Jossa, Deutschland) mit 40 % Vermiculit erfolgte in einer Phytokammer der Firma Heraeus (Hanau) unter Kurztagbedingungen mit 8 h Licht bei 23 °C und 16 h Dunkelheit bei 20 °C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %.

Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen in teilklimatisierte Gewächshauskammern mit Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkelheit, tags 20 °C, nachts 19 °C, max. 65 % Luftfeuchte) mit Tageslicht und Zusatzbeleuchtung umgeräumt.

Die axenischen Ganzpflanzenkulturen von *A. thaliana* wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf einem modifizierten Medium nach Murashige und Skoog (1962) erzeugt (0,5xMS: 2,2 g/l MS, 10 g/l Saccharose, 0,5 g/l MES, pH 5,7). Zur Herstellung festen Mediums für Selektionsplatten wurde 8 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

Zum Oberflächensterilisieren wurden die Samen zuerst ca. 2 min in 70 %igem Ethanol und danach ca. 10 min mit Natriumhypochlorid-Lösung (8,4 % freies Chlor) inkubiert und anschließend fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen.

2.8.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach der Vakuuminfiltrationsmethode (Bechtold *et al.* 1993) bzw. der Blütentauchmethode (*floral dip*, Clough und Bent 1998). Für beide Methoden wurden zunächst 300 ml YEB-Medium mit 100 mg/l Spectinomycin und 100 mg/l Rifampicin mit einer 10 ml Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterienkulturen abzentrifugiert (20 min, 4000 g).

Anschließend wurde das Bakterienpellet in 400 ml Infiltrationsmedium (5 % Saccharose, 0,05 % Silvet L-77) aufgenommen. Bei der Vakuuminfiltrationsmethode wurden die Blütenstände von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen in diese Suspension getaucht und einem Vakuum ausgesetzt, bis an Stamm und Blüten starke Bläschenbildung zu beobachten war.

Für die Blütentauchmethode wurden die Blütenstände und Blattrosetten von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen für etwa eine Minute in diese Suspension getaucht.

Die infiltrierten bzw. getauchten Pflanzen wurden für 24 Stunden dunkel gestellt und dann bis zum Reifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert.

Transgene Pflanzen mit Kanamycinresistenz als Selektionsmarker wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf 0,5x MS-Medium mit 50 mg/l des Antibiotikums Kanamycin identifiziert. Nach 10 - 14 Tagen wurden die überlebenden Pflanzen in Erde umgesetzt.

2.8.3 Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation von pflanzlicher Gesamt-DNA wurde auf die von Brandstädter *et al.* (1994) beschriebene Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion zurückgegriffen. Zur Präparation wurden 3 - 5 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines vorgekühlten Glasstabes fein zermörsert und in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) aufgenommen. Nach gründlichem Suspendieren des Materials wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l essigsäure Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und für mindestens 10 min im Eisbad inkubiert. Zur Sedimentation der

Zelltrümmer wurde 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) extrahiert. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation für 6 min bei 6.000 x g wurde die DNA aus der wässrigen Oberphase mit 500 µl Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 µg/ml RNase A aufgenommen.

2.8.4 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse ist ein Verfahren (Southern, 1975), bei dem DNA-Fragmente zunächst nach ihrer Größe in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf geeignete Trägermembranen durch die Wirkung von Kapillarkräften transferiert werden. Nach Fixierung auf der Membran werden die DNA-Moleküle mit einer Sonde hybridisiert. Southern Blot Analysen werden unter anderem zur Aufklärung von Struktur und Organisation von Genen, Identifizierung homologer Nukleinsäuresequenzen, RFLP-Analysen und in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Kopienzahl eines Transgens verwendet.

Die genomische DNA transgener *A. thaliana* Pflanzen wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I (pER10attR oder pER10-Bs3::GFP transgene) oder *Pdm*I (alle anderen in dieser Arbeit genannten) behandelt und anschließend in einem 0,7 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA durch einstündige Inkubation in Denaturierungslösung (1 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert und in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,4) 1 h gewaschen. Die so vorbereitete DNA wurde mittels Kapillarblottechnik mit 20 x SSC (0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,4) aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim, Deutschland) transferiert und im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, USA) durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) kovalent an die Membran gebunden.

Die als Sonden zur Hybridisierung verwendeten DNA-Fragmente (*NPTII*-Gen aus pRT100-NPTII) wurden mit Hilfe des ‚Megaprime DNA-labelling‘ Kits (Amersham Pharmacia) mit 50 µCi [α -³²P]-dATP nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit ProbeQuant® G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit den

radioaktivmarkierten DNA-Fragmenten erfolgte mit ‚High efficiency Hybridization System Super Hyb‘-Puffer (MRC, Cincinnati, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenz Analyzer FLA-3000 der Firma Fujifilm unter Verwendung der Software BASreader 3.14 und AIDA der Firma raytest Isotopenmessgeräte GmbH.

2.8.5 Bestimmung des Integrationsortes

Für die Bestimmung des Integrationsortes des Transgens wurde die iPCR-Methode (inverse PCR; Ochman *et al.*, 1988) genutzt. Dafür wurden 10 µg pflanzlicher Gesamt-DNA mit *FspBI* in 1x Tango über Nacht bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 50 µl geschnitten, mit dem 3x Volumen absolutem Ethanol gefällt und das Pellet nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol in 20 µl dH₂O aufgenommen. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 2 Weiss U T4-Ligase ligiert. Danach wurde eine *nested* PCR mit den Primern ‚LB1‘ und ‚LB_iPCRrew1‘ bzw. ‚LB2‘ und ‚RB_iPCRrew2‘ durchgeführt, um spezifisch die der T-DNA benachbarten Sequenzen zu amplifizieren. Dieses PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel eluiert und diente als Template für eine Sequenzierreaktion.

Um den Integrationsort zu bestätigen, wurden zwei Kontroll-PCRs durchgeführt (Abb.2.4): zum einen mit Primern, die den Integrationsort flankieren und etwa ein 1 kb langes PCR-Produkt im WT und in der transgenen Linie kein PCR-Produkt geben, da die Elongationszeit für ein etwa 10 kb großes Fragment zu klein ist. Zum anderen wurde eine PCR mit den Primern ‚LB2‘ und je einem der den Integrationsort flankierenden Primer durchgeführt. Diese PCR sollte im WT kein Produkt geben, aber ein 300 bp bis 500 bp Fragment in der jeweiligen transgenen Linie.

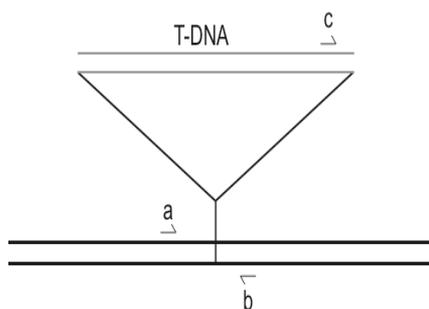


Abb. 2.4: Kontroll-PCRs für die Bestimmung des Integrationspunktes

Schematische Darstellung zur Primerwahl für zwei mögliche Kontroll-PCRs für die Bestätigung des Integrationsortes. Mit den Primern a und b ist nur im WT ein PCR-Produkt amplifizierbar, mit dem Primerpaar b und c = ‚LB2‘ ist nur ein PCR-Produkt amplifizierbar, wenn das Transgen tatsächlich an diesem Ort ist, nicht in der WT-Probe.

2.8.6 Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* und Gewinnung der M₂

Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese ist die am weitesten verbreitetste Mutagenesetechnik für *Arabidopsis*. EMS hat eine hohe Mutationsrate und eine geringe Sterblichkeitsrate. Ein weiterer Vorteil einer EMS-Mutagenese im Vergleich zu anderen Techniken ist, dass EMS eine hohe Dichte ungerichteter, irreversibler Mutationen im Genom bewirkt, was eine sättigende Mutagenese erlaubt, ohne eine riesige Zahl von Pflanzen mit individueller Mutation analysieren zu müssen. Es entstehen nicht nur *loss-of-function* Mutationen, sondern auch dominante oder *gain-of-function* Versionen von Proteinen (Maple und Moller, 2007).

Das chemische Prinzip einer EMS-Mutagenese basiert auf der Fähigkeit von EMS Guanin zu alkylieren. Dies resultiert in einer Basenfehlpaarung, da ein alkyliertes Guanin mit Thymin paart und somit von einem G/C-Basenpaar zu einem A/T-Basenpaar mutiert wird. Dieser Einzelbasenpaaraustausch kann dann zu einer Aminosäuresubstitution oder aber zu einer Deletion aufgrund eines frühzeitigen Stopp-Codons führen (Maple und Moller, 2007).

Die Mutagenese von *A. thaliana* mit EMS erfolgte nach Leyser und Furner (1992). Zunächst wurden die zu mutagenisierenden Samen über Nacht in 13,4 mM KCl-Lösung vorgequollen. Im Anschluss wurden die Samen 4 h in einer Lösung von 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 5,0 mit 5 % DMSO und 90 mM EMS inkubiert. Durch zweimaliges Waschen für 15 min mit 100 mM Natriumthiosulfatlösung wurde das EMS inaktiviert. Danach wurde zweimal 15 min mit Wasser gewaschen.

Die mutagenisierten Samen wurden anschließend gleichmäßig auf Erde in 50 Pools ausgesät. Die M₁ wurde zunächst drei Wochen unter Kurztagbedingungen aufgezogen, anschließend bis zur Reife des M₂-Saatgutes unter Langtagbedingungen.

2.8.7 Sichtung der M₂

Von jedem M₂-Pool der Linie 77 wurde je ein Aliquot des Saatgutes oberflächensterilisiert und auf selektiven nicht-induzierenden bzw. selektiven induzierenden (50 µM Estradiol) Platten ausgesät.

Estradiolfreies Medium dient der Einschätzung der Mutageneserate, um den Anteil an weißen Sämlingen und Sämlingen mit chlorotischen Blättern zu bestimmen.

Estradiolhaltiges Medium induziert die Expression von *Bs3* und gestattet die Suche nach Individuen mit einer Mutation in einem Gen, welches die *Bs3*-vermittelte HR beeinflusst.

2.8.8 Nachweis von Luciferaseaktivität

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in transgenen Pflanzen erfolgte *in vivo* mit einer CCD-Kamera (C2400-40H, Hamamatsu Photonics K.K) unter der Verwendung der Software Argus control program v.3 des Kameraherstellers. Mindestens 10 min vor Beginn der Messung wurden die Pflanzen mit 1,3 mM Luciferinlösung besprüht. Das für die Enzymreaktion notwendige Luciferin wurde als Natriumsalz eingesetzt. Bei der Messung wurden die emittierten Photonen mit einer CCD-Kamera aufgenommen und in einem Falschfarbenbild dargestellt, wobei weiß hohe Photonendichten symbolisiert und dunkelblau niedrige. Die Sensitivität der Kamera wurde für alle Messungen auf 7, bei einer Skala von 0 bis 10 eingestellt. Die Aufspreizung der Farbskala (*Bit Range*) wurde auf die empfindlichste Einstellung (0-3) gesetzt.

2.9 Benennung von Sequenzvarianten

Alle Sequenzangaben der *Bs3*-cDNA in dieser Arbeit beziehen sich auf die CDS der genomischen Sequenz EU078684.1, Varianten der *CaLRR-RLK*-cDNA bzw. des semisynthetischen *avrBs3*-Gens beziehen sich auf die im Anhang 5 angegebenen Sequenzen des jeweiligen Gens.

Die Benennung der Sequenzvarianten erfolgte nach den Nomenklaturregeln von den Dunnen und Antonarakis (2001). Die Positionsangabe der dargestellten Mutationen wurde in Relation zum Startcodon gewählt: Position 1 entspricht dem Adenin des Startcodons bzw. dem ersten Methionin auf Proteinebene.

3 Ergebnisse

3.1 Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek nach Komponenten der Bs3-vermittelten Resistenzreaktion

Im Kontext der Bs4-vermittelten HR wurde gezeigt, dass die Überexpression von *Hsp90* zu einer stark reduzierten Bs4-vermittelten HR führt (Schornack *et al.*, 2006). Es ist denkbar, dass die Überexpression negativer Regulatoren der Bs3-Resistenz ebenfalls sichtbare Veränderungen der HR bewirken. Mit dem Ziel solche Faktoren zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit cDNA-Fragmente einer Paprika-Bibliothek unter Kontrolle des starken, konstitutiven 35S CaMV Promotors zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* transient in *N. benthamiana* coexprimiert. *AvrBs3* wurde ebenfalls unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors exprimiert, während *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen 343 bp Promotors stand.

3.1.1 Identifizierung von Komponenten, welche die Bs3-HR beeinflussen, durch die Expression von cDNA Klonen *in planta*

Analyse des Einflusses der Bakteriendichte auf die Bs3-vermittelte HR

Um *Agrobacterium* bedingte Reaktionen zu vermeiden wurde eine geringe Agrobakterien-Zelldichte angestrebt. Andererseits sollte die Bakteriendichte ausreichend hoch sein, damit in jede Wirtszelle T-DNA transferiert wird und kein Mosaik aus Zellen mit bzw. ohne T-DNA entsteht. Der Bibliotheksklon sollte bei dem Co-Transfer der drei verschiedenen T-DNAs im Überschuss vorliegen, um schwache Effekte ggf. besser erkennen zu können. Somit muss zuerst getestet werden mit welcher Zelldichte die Agrobakterienstämme (Stamm GV3101), die die Expression von *avrBs3* oder *Bs3* vermitteln, inokuliert werden müssen, um eine Bs3-vermittelte HR beobachten zu können, wenn gleichzeitig ein anderes Protein im Überschuss von der Pflanze synthetisiert wird. Als Maß für die Zelldichte diente die optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}).

Es wurde eine Verdünnungsreihe der *avrBs3*- bzw. *Bs3*- Expression vermittelnden Agrobakterienstämme mit einem dritten Agrobakteriumstamm, der die Expression

von *GFP* vermittelt, im vierfachen Überschuss in *N. benthamiana* Blätter inokuliert und die pflanzliche Reaktion analysiert.

Es stellte sich heraus, dass die Inokulationen mit einer OD_{600} zwischen 0,2 und 0,8 jeweils für die Agrobakterien, die die Expression von *avrBs3* und *Bs3* vermitteln, nach drei Tagen zu einer HR führte. Bei der Inokulation mit der OD_{600} 0,1 war die *Bs3*-vermittelte HR erst nach fünf Tagen zu beobachten. Deswegen wurde entschieden, die Sichtung mit der Gesamt- OD_{600} 1,2 und dem Verhältnis 1 : 1 : 4 der drei Agrobakterienstämme, die *avrBs3*-, *Bs3*- bzw. Bibliotheksklon-Expression vermitteln, durchzuführen.

Coexpression von BON1 und BAP1 mit Bs3 beeinflusst die Bs3-vermittelte HR

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war kein Suppressor für die *Bs3*-vermittelte HR bekannt. Um eine mögliche Positivkontrolle für die Sichtung der cDNA-Klone zu etablieren, wurden mögliche Suppressoren der *Bs3*-vermittelten HR durch Überexpression getestet. Es erfolgte die Analyse der Arabidopsis-Proteine *BON1* und *BAP1*, welche als generelle Zelltod-Inhibitoren beschrieben wurden, da sie unter anderem die Zelltodreaktionen unterdrücken, die von *avrRpt2*- oder *avrRpm1*-Expression in *A. thaliana* cv. Col-0 vermittelt werden (Yang *et al.* 2007).

Wie Abb. 3.1 zeigt, löst die Expression von *BON1* bzw. *BAP1* alleine keine HR aus. Auch die Coexpression von *BON1* mit *BAP1* induziert keine HR. Exprimiert man dagegen *BON1* **oder** *BAP1* zusammen mit *Bs3* unter der Kontrolle des konstitutiven 35S CaMV Promotors wird drei Tage nach Inokulation eine HR sichtbar, die in ihrer Intensität vergleichbar ist mit der konstitutiven Expression von *Bs3*. Wird allerdings *Bs3* zusammen mit *BON1* **und** *BAP1* coexprimiert, ist eine Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR um etwa einen Tag zu beobachten.

Die Expression von *Bs3* unter der Kontrolle des nativen Promotors und Coexpression von *avrBs3* sowie *BON1* und *BAP1* lieferten identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Da die Coexpression von *BON1* und *BAP1* die *Bs3*-vermittelte HR verzögert bei Coexpression mit konstitutiv exprimiertem *Bs3*, greifen sie wahrscheinlich erst nach der *Bs3*-Transkriptinduzierung in den Signalweg ein.

Die Coexpression von *BON1* und *BAP1* mit *Bs3* ist daher als Positivkontrolle zur Identifizierung eines Suppressors der *Bs3*-vermittelten HR geeignet.

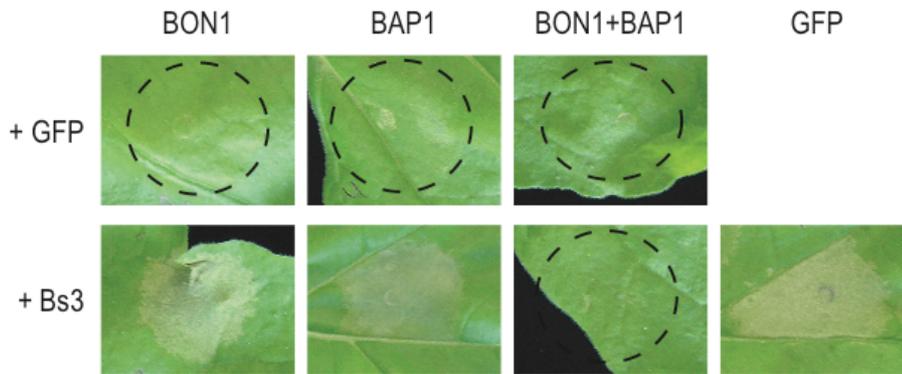


Abb. 3.1: Coexpression von *BON1* und *BAP1* mit *Bs3* verzögert die *Bs3*-vermittelte HR

Die generellen Zelltod-Inhibitoren *BON1* und *BAP1* können zusammen die *Bs3*-vermittelte HR verzögern. *BON1*- und *BAP1*- Expression vermittelnde Agrobakterien wurden jeweils mit der OD_{600} 0,8 inokuliert (pK7FWG2-Konstrukte), konstitutive *Bs3*-Expression vermittelnde Agrobakterien dagegen mit OD_{600} 0,2 (pGWB2-*Bs3*). Die Reaktionen wurden 4 dpi fotografiert. Das Ergebnis konnte in drei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Ergebnisse der Überexpressionssichtung

Insgesamt wurden 5.800 cDNA-Agrobakterienklone analysiert. Um zu testen, ob die Klone Autoaktivatoren einer HR-ähnlichen Reaktion codieren oder ob sie die *Bs3*-vermittelte HR beeinflussen, wurden sie alleine (OD_{600} 0,8) oder zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* exprimiert. Jeder Klon wurde auf zwei Pflanzen getestet. Zeigten die Phänotypen Abweichungen von der Kontrolle (GFP- anstatt Bibliotheksklon-Expression vermittelnder Agrobakterienstamm), wurde die Inokulation zweimal mit drei weiteren Pflanzen wiederholt.

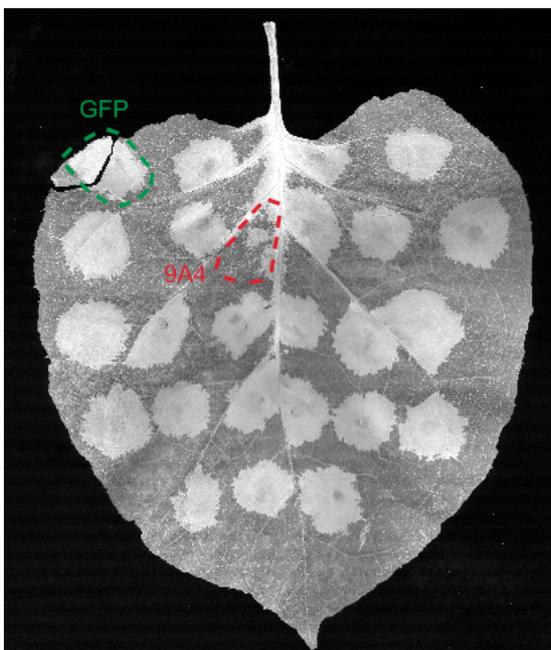


Abb. 3.2: Ein Beispiel für die Sichtung der Paprika-cDNAs in *N. benthamiana*

Co-Inokulation dreier Agrobakteriumstämme, im Verhältnis 1 : 1 : 4, die die transiente Expression von *avrBs3*, *Bs3* und eines Bibliotheksklons in *N. benthamiana* vermitteln (pVS300, pGWB16-*Bs3*, pK7FWG2-libclones). Das Blatt wurde 4 dpi in Alkohol gebleicht und fotografiert.

grün umrandet: Kontrolle mit GFP anstatt eines Bibliotheksklons

rot umrandet: Klon 9A4 verzögert die *Bs3*-vermittelte HR, nur die Verwundungsreaktion der Spritze ist zu sehen

Beispielhaft ist in Abb. 3.2 das Resultat für 24 Klone der Sichtung gezeigt.

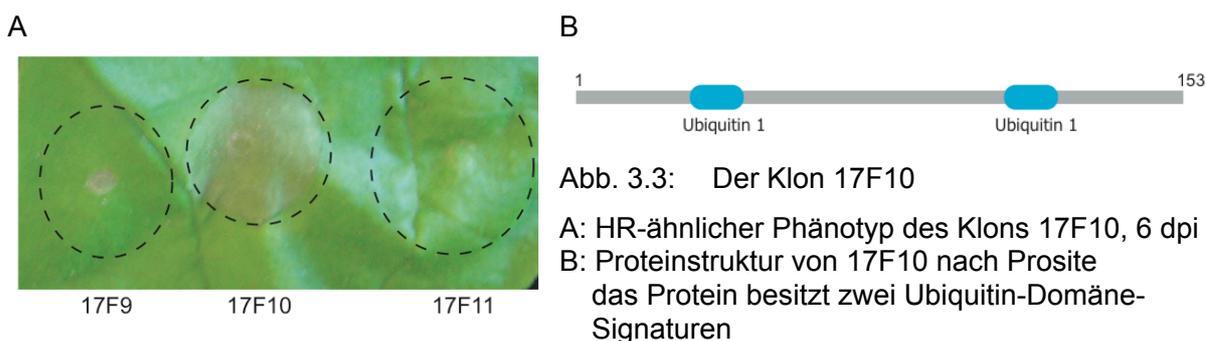
Unter den 5.800 analysierten Klonen konnte bei 14 Klonen ein reproduzierbares Abweichen von der Kontrollreaktion festgestellt werden. Zwei Klone (17F10 und 9G10) erwiesen sich als Autoaktivatoren einer HR-ähnlichen Reaktion, während die Klone 9A4, 37D1-10 und 69F8 die Bs3-vermittelte HR verzögern. Die weitere Analyse ist im Folgenden beschrieben.

3.1.2 Ein Ubiquitin-Homolog löst eine HR-ähnliche Reaktion aus

Der Klon 17F10 wurde identifiziert, weil er allein exprimiert innerhalb von ca. sechs Tagen zu einer HR-ähnlichen Reaktion führt (siehe Abb. 3.3). Die Coexpression von 17F10 mit *avrBs3* und *Bs3* hatte keinen Einfluss auf die Bs3-vermittelte HR.

Da es denkbar ist, dass dieser Klon als Positivregulator für die Bs3-vermittelte HR wirkt und sich ein Effekt nur im Silencing-Experiment zeigt, wurde das Insert sequenziert. Es ist zu 100 % identisch zu der 4.4 Polyubiquitin mRNA aus *C. annuum* cv. *Nockkwang* (AY489136) und beinhaltet den vollständigen Polyubiquitin-ORF von 234 bp, sowie die 5'UTR von 320 bp und die 3'UTR mit einer Länge von mindestens 120 bp.

Für dieses Gen wurde kein Silencing-Experiment durchgeführt, weil aus Vorarbeiten bekannt war, dass das Silencing von Ubiquitin zum Absterben der Pflanze führt (Schornack und Lahaye, unveröffentlicht).

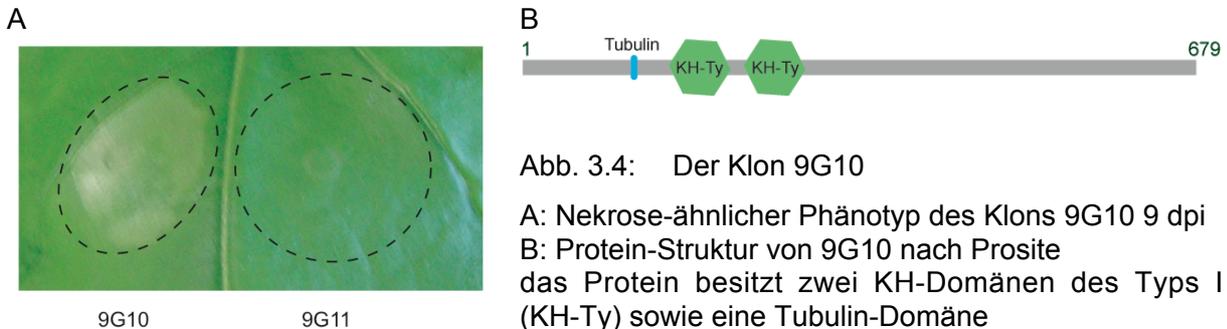


3.1.3 Ein *KH-domain containing* Protein löst eine Nekrose-ähnliche Reaktion aus

Der Klon 9G10 führt allein exprimiert zu einer Nekrose-ähnlichen Reaktion innerhalb von ca. neun Tagen (siehe Abb. 3.4A). Die Coexpression von 9G10 mit *avrBs3* und *Bs3* hat keinen Einfluss auf die Bs3-vermittelte HR.

Die Sequenzierung des Inserts von Klon 9G10 ergab einen ORF von 2040 bp, eine 37 bp 5'UTR und eine 205 bp 3'UTR. BLAST-Analysen zeigten, dass der ORF zu

54 % identisch ist mit 'KH-domain containing protein' aus *A. thaliana* (NP_180167.1). Das Genprodukt 9G10 besitzt zwei KH-Domänen des Typs I, die dafür bekannt sind, ssRNA oder ssDNA zu binden (Valverde *et al.*, 2008), und eine so genannte Tubulin-Domäne (siehe Abb. 3.4:B).



Das Silencing des 'KH-domain containing proteins' beeinflusst nicht die Bs3-vermittelte HR

Über die RNA- oder DNA-Bindung mittels der KH-Domäne ist es vorstellbar, dass dieses Protein in die Regulierung der Proteinexpression auf Transkriptions- oder Translationsebene eingreift. Deswegen sollte in einem Silencing-Experiment analysiert werden, ob und welche Zelltodreaktionen eventuell 'KH-domain containing protein' abhängig sind.

Für das Silencing-Experiment wurden zwei verschiedene Fragmente benutzt. Zum einen das Silencing-Fragment 1 (1 - 824 bp des ORFs), und das Silencing-Fragment 2 (1552 - 2040 bp des ORFs; beides TRV2a Konstrukte). Etwa 14 Tage nach der Initiation des Silencings in *N. benthamiana* wurden folgende HR-Reaktionen mittels Agrobakterium-vermittelter Expression getestet: Bs3 (pGWB2-Bs3), Bs4 (pGWB20-Bs4 + pVSF-avrBs4), AvrB (pVR220), XopJ (pGWB2-XopJ), Rx (pBIN61-Rx + pBIN35STK) und BAX (pK7FWG2-BAX). Beide Silencing Fragmente führten zum gleichen Ergebnis, wobei die Intensität der Reaktionen auf den mit dem Silencing Fragment 2 behandelten Pflanzen etwas größer war. Das Silencing des 'KH-domain containing proteins' hatte keinen Einfluss auf die genannten HRs, da die Reaktionen zeitgleich und mit ähnlicher Intensität mit denen der GFP gesilenceten Kontrollpflanzen auftraten.

Die Expression von avrBs3 hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des ‚KH-domain containing proteins‘

Neben den phänotypischen Analysen in *N. benthamiana* wurde analysiert, ob die Expression von *avrBs3* einen Einfluss auf die Transkriptmenge des Gens für ‚KH-domain containing proteins‘ hat. Dafür wurde RNA von *C. annuum* cv. ECW und *C. annuum* cv. ECW-30R Pflanzen etwa 24 hpi isoliert, die mit *Xcv* 85-10 oder *Xcv* 85-10 (pDS300) inokuliert wurden (OD₆₀₀ 0,2).

Xcv 85-10 besitzt kein *avrBs3* und ist somit in beiden genannten Paprikakultivaren virulent. Im Gegensatz dazu exprimiert *Xcv* 85-10 (pDS300) *avrBs3* und löst eine Bs3-vermittelte HR in *C. annuum* cv. ECW-30R aus. Als Kontrolle diente mit MgCl₂ infiltriertes Pflanzengewebe. Wie Abb. 3.5 zeigt, wird die Expression von ‚KH-domain containing protein‘ minimal induziert durch die Inokulation mit *Xcv* 85-10, aber nicht zusätzlich durch die Expression von *avrBs3* induziert. Als Kontrolle für etwa gleiche eingesetzte RNA-Mengen diente die Amplifizierung des konstitutiv exprimierten *Elongationsfaktors 1α* (Pokalsky *et al.*, 1989).

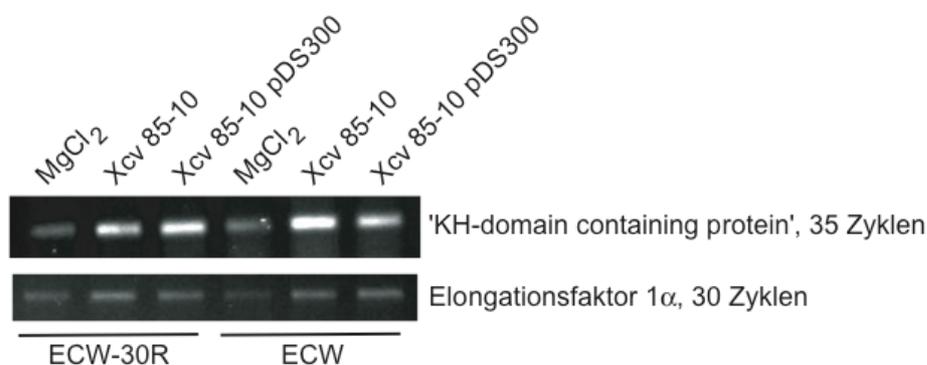


Abb. 3.5: Die Expression von *avrBs3* hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des ‚KH-domain containing proteins‘

Mittels semiquantitativer RT-PCR (2.5.11) wurde die Transkriptmenge des ‚KH-domain containing protein‘ etwa 24 hpi nach Inokulation verschiedener *Xanthomonas*-Stämme (OD₆₀₀ 0,2) miteinander verglichen. Der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor 1α diente als Kontrolle für etwa gleiche RNA-Mengen.

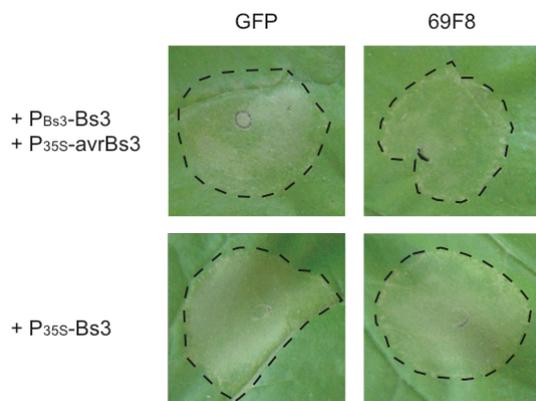
Das ‚KH-domain containing protein‘ wird durch die Inokulation mit *Xcv* 85-10 induziert, aber nicht durch die Expression von *avrBs3* (*Xcv* 85-10 pDS300).

3.1.4 Die Coexpression eines unvollständigen *Bs3* mit *Bs3* verzögert die *Bs3*-vermittelte HR

Der Klon 69F8 verzögert die *Bs3*-vermittelte HR (siehe Abb. 3.6). Allein exprimiert induziert er keine HR. Die Sequenzierung ergab, dass das Insert des Klons 69F8 für ein partielles *Bs3* codiert. Das Insert beginnt im Promotor des *Bs3*-Gens, ca. -340 bp, und endet im ersten Exon bei ca. +630 bp, wobei +1 das A des Startcodons ist.

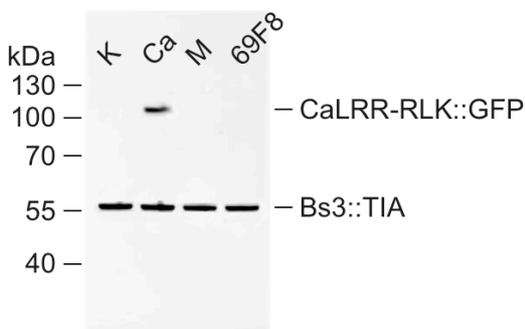
Bei Coexpression des Klons 69F8 mit *Bs3* jeweils unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors ist die *Bs3*-vermittelte HR nach drei Tagen vergleichbar mit der Coexpression von *GFP* mit *Bs3* (siehe Abb. 3.6).

Abb. 3.6: Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR durch den Klon 69F8



N. benthamiana-Blätter wurden mit Agrobakterienstämmen, die die Expression von GFP (pGWB6) oder 69F8 (pK7FWG2-libclone) vermitteln, und der OD₆₀₀ 0,8 coinokuliert mit Agrobakterienstämmen, die entweder die konstitutive Expression von *Bs3* (P_{35S}-*Bs3*; pGWB2-*Bs3*) oder die *AvrBs3*-abhängige *Bs3*-Expression (P_{Bs3}-*Bs3*+P_{35S}-*avrBs3*; pGWB16-*Bs3* + pVS300) vermitteln, OD₆₀₀ jeweils 0,2. Nur die Coexpression des *AvrBs3*-abhängigen *Bs3* mit 69F10 zeigt nach 3 Tagen eine Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR.

Abb. 3.7: Die Proteinmenge von *Bs3* wird durch die Coexpression des *CaLRR-RLK::GFP*, dessen Mutante oder des *partiellen Bs3* nicht beeinflusst



Überlagerung zweier Western Blots: *avrBs3*- und *Bs3*-Expression vermittelnde Agrobakterienstämmen wurden mit der OD₆₀₀ 0,2; *CaLRR-RLK*-, dessen Mutante und der Klon 69F8-Expression vermittelnde Agrobakterienstämmen dagegen mit der OD₆₀₀ 0,8 inokuliert. Die Proben wurden 40 hpi geerntet und wie in 2.5.13 beschrieben bearbeitet.

K = P_{35S}-*avrBs3* mit P_{Bs3}-*Bs3*::TIA
 Ca = K + P_{35S}-*CaLRR-RLK::GFP*
 M = K + P_{35S}- *CaLRR-RLK_{c.1delA}::GFP*
 69F8 = K + P_{35S}-69F8 (partielles *Bs3*)

Mit α -HA wurde *Bs3*::TIA und mit α -GFP *CaLRR-RLK::GFP* nachgewiesen. Sowohl die *CaLRR-RLK*-Mutante als auch der Klon 69F8 bilden keine translationale Fusion mit dem GFP-Epitoptag und können deswegen nicht nachgewiesen werden. (*CaLRR-RLK* und Mutante siehe Abschnitt 3.1.6)

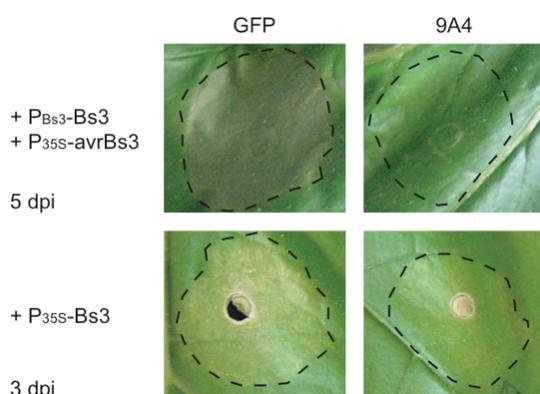
Das partielle Bs3-Protein hat keinen Einfluss auf die Expression von Bs3

Da das partielle Bs3-Protein die Bs3-vermittelte HR verzögert, wurde im Folgenden analysiert, ob es einen Einfluss auf die Bs3-Proteinmenge hat. Dafür wurden Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen mit Agrobakterienstämmen inokuliert, die entweder die Expression von *avrBs3* und *Bs3::TIA* unter der Kontrolle seines nativen Promotors vermitteln (pVS300, pK7360PBs3-TIA) oder zusätzlich den Klon 69F8 exprimieren. 40 h nach der Inokulation wurde Blattmaterial für Western Blot-Analysen geerntet. Für die Detektion von Bs3 ::TIA diente α -HA als erster Antikörper. Wie Abb. 3.7 zeigt, war in beiden Proben etwa gleich viel Bs3 detektierbar, was darauf schließen lässt, dass die Proteinmenge von Bs3 nicht durch die Expression des *partiellen Bs3* beeinflusst wird.

3.1.5 Eine Serin-Threonin-Kinase verzögert die Bs3-vermittelte HR

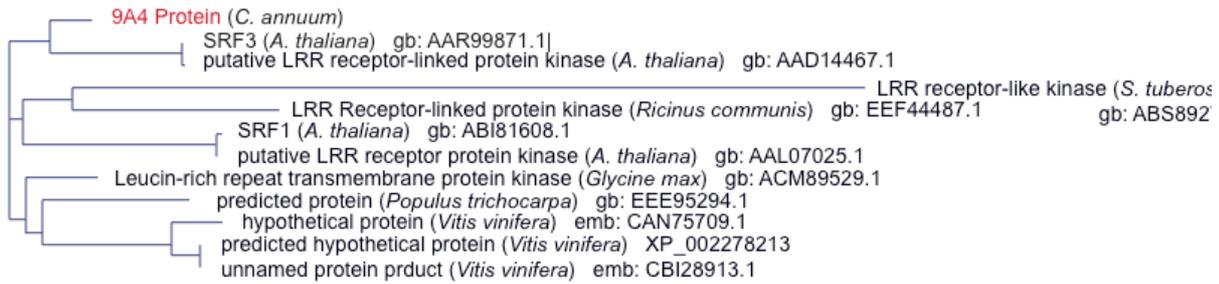
Der Klon 9A4, der sequenzidentisch mit den Klonen 37D1 bis 37D10 ist, verzögerte die Bs3-vermittelte HR. Allein exprimiert zeigte er keine HR- ähnliche Reaktion. Die Coexpression des Klons 9A4 mit einem konstitutiv exprimierten *Bs3* zeigte ebenfalls eine verzögerte HR (Abb. 3.8). Die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR ist nicht stabil, da insgesamt drei verschiedene Beobachtungen gemacht wurden. Zweimal war bei der Coexpression des Bibliotheksklons 9A4 mit *avrBs3* und *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen Promotors auch nach 10 Tagen keine HR induziert, einmal war keine Abweichung des Phänotyps von der Kontrolle (*avrBs3* mit *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen Promotors) zu sehen und in allen anderen Versuchen (>20) war die Bs3-vermittelte HR um etwa einen Tag verzögert.

Abb. 3.8: Der Klon 9A4 verzögert die Bs3-vermittelte HR



N. benthamiana-Blätter wurden coinokuliert. Die Agrobakterienstämmen, die die Expression von *GFP* (pGWB6) oder *9A4* (pK7FWG2-libclone) vermitteln, wurden mit der OD₆₀₀ 0,8 inokuliert. Die Agrobakterienstämmen, die entweder die konstitutive Expression von *Bs3* (P_{35S}-Bs3; pGWB2-Bs3) oder die AvrBs3- abhängige *Bs3*-Expression (P_{Bs3}-Bs3+P_{35S}-avrBs3; pGWB16-Bs3 + pVS300) vermitteln, wurden jeweils mit der OD₆₀₀ 0,2 inokuliert. 9A4 verzögert die Bs3-vermittelte HR, unabhängig von der *Bs3*-Induktion durch AvrBs3. Fotos: 3 bzw. 5 dpi.

A Phylogenetischer Stammbaum



B Domänen-Struktur der Homologen

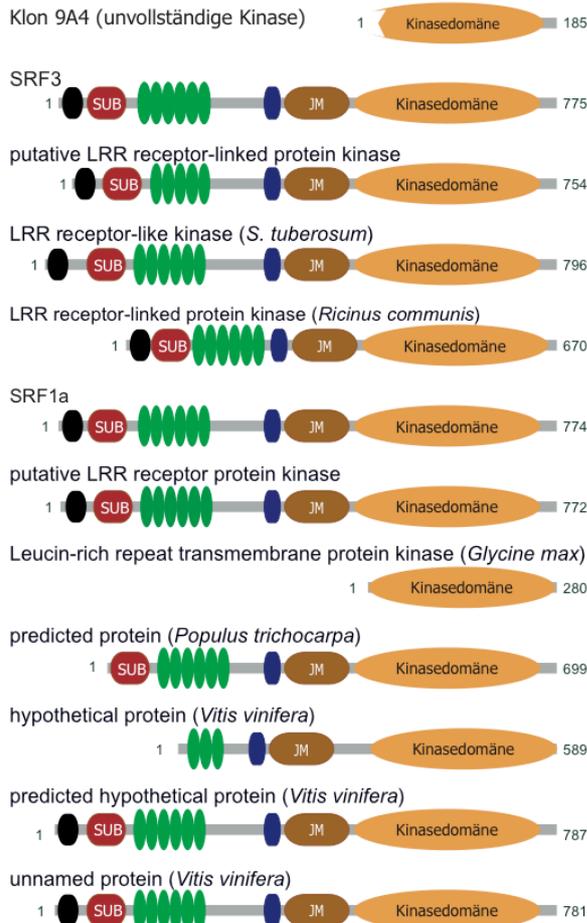


Abb. 3.9: Homologe des Klons 9A4

A: Der Phylogenetische Stammbaum wurde mit 'BLAST tree view' und den angegebenen Sequenzen erstellt. Die nächsten Homologen zu der Kinase-Domäne stammen aus *S. tuberosum* und *A. thaliana*, ein LRR-RLK sowie einige Vertreter der SRF (*STRUBBELIG receptor like family*)-Proteinfamilie.

B: Fast alle Homologen besitzen in ihrem N-terminalen Bereich eine LRR-Domäne. Die Domänen wurden nach Sequenzhomologie zu SRF3, wie in Eyüboğlu et al., 2007 beschrieben, definiert. Trotz seines Namens codiert das Gen gb: ACM89529.1 aus *Glycine max* nur für die Kinasedomäne.

(schwarz: Signalpeptid, rot: SUB-Domäne, grün: LRR-Domäne, blau: Transmembran- Motiv, braun: Juxta-membran-Domäne, orange: Kinase-domäne ohne Protonenakzeptor)

Die Sequenzierung ergab, dass das Insert des Klons 9A4 für eine Kinase-Domäne codiert, die als Serin-Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase) identifiziert wird, der der Protonenakzeptor und die Nukleotidbindestelle fehlen. Der ORF umfasst 558 bp und ist 100 % identisch mit dem unter CACN17431 in der Solgene-Datenbank annotierten Gen aus *C. annuum*. Der Klon 9A4 enthält ebenfalls 24 bp der 35 bp als 5'UTR annotierten Sequenz und die 404 bp lange 3'UTR. Es gibt Homologe in verschiedenen Spezies, alle besitzen eine Kinase-Domäne und fast alle haben LRRs in ihrem N-terminalen Bereich (Abb. 3.9).

Die Inokulation von Xanthomonas aber nicht die Expression von avrBs3 hat Einfluss auf die Transkriptmenge der Kinase

Da festgestellt wurde, dass die Bs3-vermittelte HR durch die Kinase beeinflusst wird, sollte untersucht werden, ob die Expression der Kinase durch AvrBs3 induziert wird. Hierfür wurden *C. annuum* cv. ECW und *C. annuum* cv. ECW-30R mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 (pDS300) inokuliert (OD_{600} 0,2). 24 h nach der Inokulation wurde Blattmaterial geerntet und RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde die Sequenz der Kinase-Domäne und als Kontrolle der Elongationsfaktor1 α amplifiziert. Wie in der Abb. 3.10 zu sehen ist, wird die Kinase nicht durch die Expression von *avrBs3* induziert, da die Akkumulation der PCR-Fragmente in allen Proben etwa gleich stark ist. Auffällig ist, dass die Transkriptmenge der Kinase-Domäne durch die Inokulation von *Xcv* 85-10 erhöht wird.

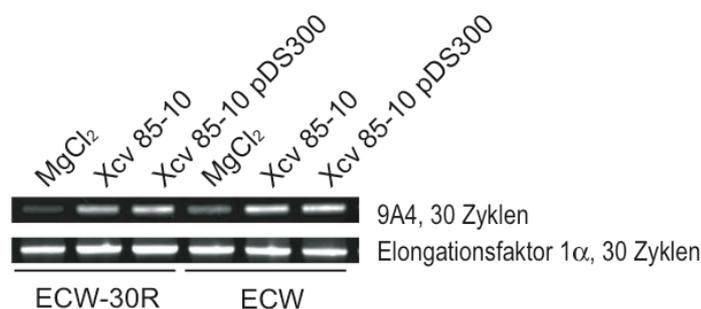


Abb. 3.10: Die Expression von *avrBs3* hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge der unvollständigen *Kinase*

Mittels semiquantitativer RT-PCR (2.5.11) wurde die Transkriptmenge der *unvollständigen Kinase* etwa 24 hpi nach Inokulation verschiedener *Xanthomonas*-Stämme (OD_{600} 0,2) miteinander verglichen. Der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor 1 α diente als Kontrolle für etwa gleiche RNA-Mengen. Die *unvollständige Kinase* wird durch die Inokulation mit *Xcv* 85-10 induziert, aber nicht zusätzlich durch die Expression von *avrBs3* (*Xcv* 85-10 pDS300).

3.1.6 Identifizierung und Analyse des vollständigen Gens der Kinase

Die BLAST-Analyse der Sequenz des Klon 9A4 ergab viele Homologe, die eine Kinase-Domäne ohne Protonenakzeptor besitzen. Auffällig dabei war, dass alle Homologe weitere gemeinsame Proteinmotive hatten und die Übersetzung der als 5'UTR annotierten Sequenz ebenfalls eine hohe Homologie zu den anderen homologen Proteinen zeigte. Dies deutet darauf hin, dass die cDNA des Klon 9A4 unvollständig ist.

Deswegen wurde in weiteren Analysen untersucht, ob der Klon 9A4 vollständig ist oder die cDNA sich in Richtung des 5' Endes verlängern lässt.

Identifizierung der Vollängen-cDNA des Kinase-Klons

Wegen der zu erwartenden hohen Homologie verschiedener Ser/Thr-Kinase-Domänen im Paprika-Genom, war eine 5'-RACE-Analyse nicht erfolgreich. Deswegen wurde beschlossen auf Genom-Ebene zu suchen. Mittels PCR-basierter Sichtung wurde die Paprika (ECW-30R)-BAC-Bibliothek, wie in der Promotion von Dr. T. Jordan beschrieben, nach einem Klon durchsucht, der die Sequenz des Klons 9A4 beinhaltet.

Der einzige bestätigte BAC-Klon 129M24 diente als Template für weitere Sequenzierungen, sowohl in 3'- als auch in 5'- Richtung. Das 3' Ende des Klons 9A4 erwies sich als fast vollständig, nur 16 bp der 3'UTR fehlten. Die erste Sequenz in 5' Richtung zeigte Homologie zu den bereits genannten Homologen des Klons 9A4. Um die Sequenzierung auf Genom-Ebene zu beschleunigen, wurde angenommen, dass die vollständige zu erwartende Sequenz des Kandidaten einem der Homologen von 9A4 gleichen müsste. Das einzige mit BLAST ermittelte Homologe, welches aus einer *Solanaceae* stammt, war ein so genanntes LRR-RLK aus *L. esculentum* (gb EU049848.1). Passend zu dessen DNA-Sequenz wurden Primer abgeleitet, um das Kandidatengen zu sequenzieren.

Die vollständige Sequenz des Kandidatengens umfasst etwa 10 kb auf Genom-Ebene. Das Kandidatengen wurde aus cDNA amplifiziert und kloniert und somit auch seine Existenz bestätigt.

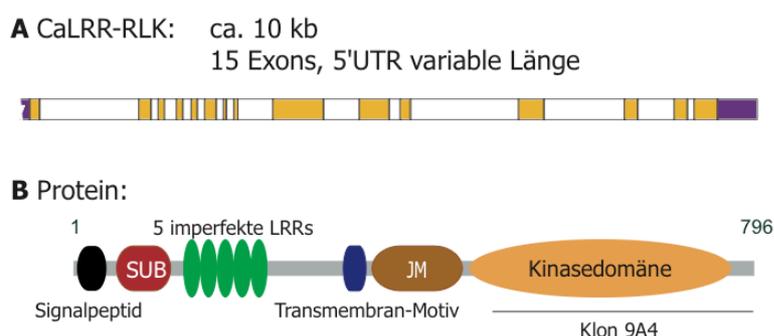


Abb. 3.11: Struktur des CaLRR-RLK auf Gen- und Proteinebene

A: Genstruktur von *CaLRR-RLK*: orange – Exons, weiß – Introns, lila – UTR. Die 5'UTR ist in den sequenzierten Transkripten von variabler Länge.

B: Proteinstruktur von *CaLRR-RLK*: Der Bereich, der mit dem Klon 9A4 übereinstimmt wurde unterstrichen. SUB – SUB-Domäne, JM - Juxtamembran-Domäne, beide Domänenfeatures sind bei Eyüboğlu *et al.*, 2007 für die 9 Mitglieder der SRF-Familie beschrieben. Des Weiteren besitzt *CaLRR-RLK* ein Signalpeptid, fünf imperfekte LRRs, ein Transmembran-Motiv und eine Ser/Thr-Kinase-Domäne ohne Protonenakzeptor.

Durch den Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz wurden die Exons und Introns definiert unter Berücksichtigung der „GT-AG“-Regel (Breathnach und Chambon, 1981).

Bei dem Kandidaten handelt es sich ebenfalls um ein *LRR-RLK*-Gen. Da es aus *C. annuum* isoliert wurde, wurde es *CaLRR-RLK* genannt. Das Gen besteht aus 15 Exons und 14 Introns, die 5'UTR ist von variabler Länge (112 bp – 329 bp), während die 3'UTR 420 bp lang ist. Der ORF umfasst 2391 bp und codiert somit für 796 Aminosäuren. Das Protein beinhaltet folgende Motive: ein Signalpeptid, die SUB-Domäne, fünf imperfekte LRRs, ein Transmembran-Motiv, eine Juxtamembran-Domäne und eine Kinase-Domäne ohne Protonenakzeptor (siehe Abb. 3.11).

CaLRR-RLK verzögert die Bs3-vermittelte HR in N. benthamiana

Nach der Identifizierung des Vollängen-Gens galt es zu analysieren, ob *CaLRR-RLK* ebenfalls in der Lage ist, die Bs3-vermittelte HR zu verzögern. Dafür wurde das Gen *CaLRR-RLK* zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen Promotors (pVS300, pGWB16-Bs3) oder zusammen mit *Bs3* unter Kontrolle des 35S CaMV Promotors (pGWB2-Bs3) exprimiert. Wie in Abb. 3.12A gezeigt wird, wird die Bs3-vermittelte HR von *CaLRR-RLK* um etwa 1,5 Tage verzögert im Vergleich zu einer Coexpression von *Bs3* mit *GFP*.

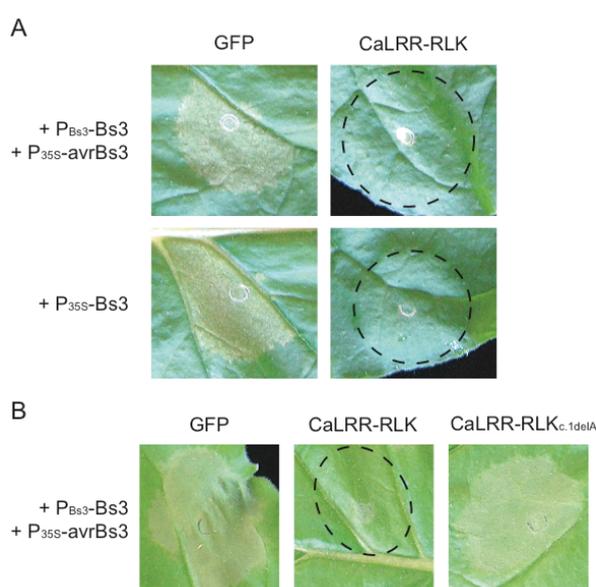


Abb. 3.12: Suppression der Bs3-vermittelten HR durch *CaLRR-RLK*

N. benthamiana-Blätter wurden coinokuliert. Die Agrobakterienstämme, die die Expression von *GFP* (pGWB6) oder *CaLRR-RLK* (pER10-*CaLRR::GFP*) bzw. dessen Mutante vermitteln, wurden mit der OD_{600} 0,8 inokuliert. Die Agrobakterienstämme, die die konstitutive Expression von *Bs3* (pGWB2-Bs3; P_{35S} -Bs3) oder aber die *AvrBs3*-abhängige *Bs3*-Expression (pGWB16-Bs3 + pVS300; P_{Bs3} -Bs3 + P_{35S} -avrBs3) vermitteln wurden mit der OD_{600} 0,2 inokuliert. **A:** *CaLRR-RLK* verzögert die Bs3-vermittelte HR **B:** Die Mutante *CaLRR-RLK_{c.1delA}*, verzögert nicht die Bs3-vermittelte HR. Bilder: 3 dpi

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf einer Überexpression des *CaLRR-RLK* beruht und nicht auf einer Reduzierung seines Transkriptes wurde

eine Mutante erstellt, bei der das Desoxyadenosinmonophosphat des Startcodons in der cDNA deletiert wurde (CaLRR-RLK_{c.1delA}). Dieses Derivat sollte transkribiert werden und somit einen Silencing-Effekt ermöglichen. Wenn das nächste ATG als Translationsstart genutzt wird, entsteht ein 20 Aminosäurepeptid aus einem anderen Leserahmen, das höchstwahrscheinlich wieder abgebaut wird.

In Abb. 3.12B ist gezeigt, dass bei transienter Expression in *N. benthamiana* die genannte Mutante nicht in der Lage ist, die Bs3-vermittelte HR zu supprimieren. Was darauf hindeutet, dass die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR durch CaLRR-RLK tatsächlich auf Überexpression von *CaLRR-RLK* und nicht auf einen Silencing-Effekt des CaLRR-RLK zurückzuführen ist.

Die Überexpression von CaLRR-RLK verzögert in C. annuum cv. ECW-30R die Bs3-vermittelte HR

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Expression des Volllängen-Gens *CaLRR-RLK* die Bs3-vermittelte HR verzögert, sollte analysiert werden, ob das CaLRR-RLK-Protein auch im natürlichen System die Bs3-vermittelte HR verzögert. Dafür sollte *CaLRR-RLK* in *C. annuum* cv. ECW-30R Pflanzen Agrobakterium-vermittelt exprimiert werden. Danach soll die Bs3-vermittelte HR durch einen *avrBs3* exprimierenden *Xanthomonas*-Stamm induziert werden. Bereits 2002 wurde festgestellt, dass weniger virulente Stämme, wie z. B. I74a, ein Derivat von 85-10, durch ihr langsames Wachstum deutlichere Phänotypen bezüglich der HR oder Hypertrophie ausbilden (Marois *et al.*, 2002). Deswegen wurden zum Vergleich sowohl Xcv 85-10 als auch Xcv I74a Stämme mit und ohne *avrBs3* genutzt.

Da Paprika-Pflanzen mit unspezifischen Reaktionen auf die Inokulation von Agrobakterienstämmen mit hoher Zelldichte reagieren (Choi *et al.*, 2009), konnte keine überlappende Inokulation von Agrobakterienstämmen mit *Xanthomonas*-Stämmen genutzt werden. Eine Alternative ist die systemische Verbreitung des Virus TRV, da hier die Inokulation der *Xanthomonas*-Stämme auf einem jüngeren Blatt erfolgen kann und die Agrobakterienstämmen, die die Expression des TRV vermitteln in deutlich geringerer Zelldichte eingesetzt werden können.

Es wurden zunächst *C. annuum* cv. ECW-30R Pflanzen mit Agrobakterienstämmen vakuumfiltriert, die die Expression von *CaLRR-RLK* bzw. dem ‚KH-domain containing protein‘ über die Verbreitung des Virus TRV vermitteln. Nach vier Tagen

wurden diese Pflanzen mit den genannten *Xanthomonas*-Stämmen in verschiedener Zelldichte inokuliert.

In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 12 Pflanzen mit den *CaLRR-RLK*-Expression vermittelnden Agrobakterienstämmen (TRV Konstrukt) vakuumfiltriert. Diese Pflanzen wurden insgesamt 64-mal mit dem *Xanthomonas*-Stamm *Xcv* 174a (pDSK340) (*avrBs3*-Expression) mit der OD_{600} 0,4 inokuliert, von denen 43 innerhalb von zwei Tagen keine HR ausbildeten und 21 eine HR zeigten. Am dritten Tag zeigten alle Inokulationsstellen eine Bs3-vermittelte HR. Zur Kontrolle wurde der *Xanthomonas*-Stamm *Xcv* 174a mit der OD_{600} 0,4 ebenfalls 64-mal inokuliert. Dieser löste wie erwartet keine HR aus.

Dieselben Pflanzen wurden 46-mal mit *Xcv* 85-10 (pDS300) mit der OD_{600} 0,002 inokuliert. Es konnte in 32 Inokulationsstellen eine Verzögerung der Bs3-vermittelten HR gezeigt werden. Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Stamm *Xcv* 85-10 inokuliert, der keine HR auslöste.

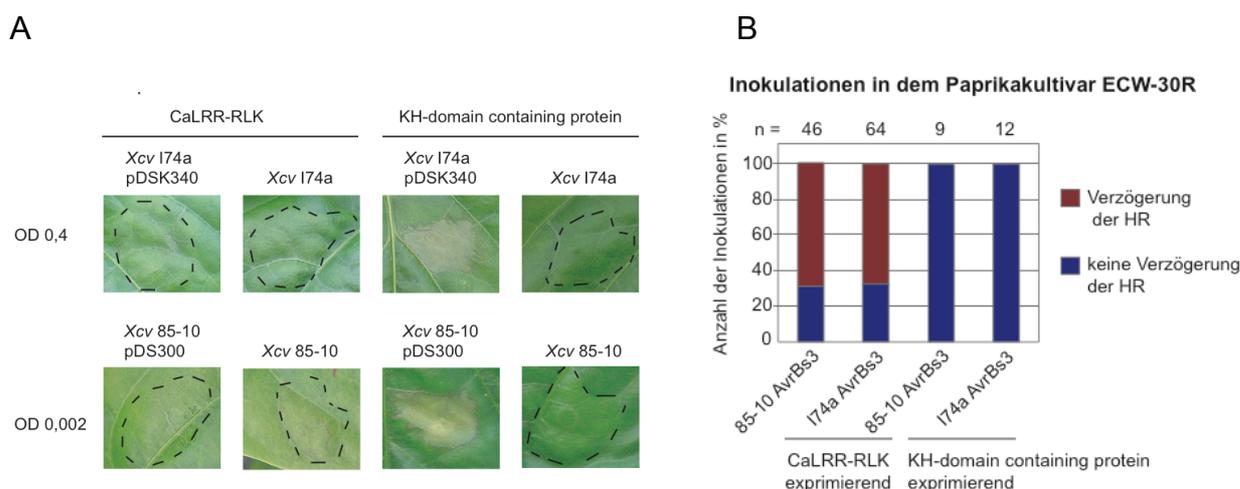


Abb. 3.13: *CaLRR-RLK* verzögert die Bs3-vermittelte HR in Paprika

A: *C. annuum* cv. ECW-30R-Pflanzen wurden mit Agrobakterienstämmen vakuumfiltriert, die auf ihrer T-DNA den Virus TRV und entweder das Gen *CaLRR-RLK* oder als Kontrolle das Gen ‚*KH-domain containing protein*‘ tragen. Vier Tage später wurden diese Pflanzen mit *Xcv* 174a und *Xcv* 174a (pDSK340) OD_{600} 0,4 bzw. *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 (pDS300) OD_{600} 0,002 inokuliert. Zwei Tage nach dieser zweiten Inokulation konnten die *avrBs3*-exprimierenden *Xanthomonas*-Stämme auf den ‚*KH-domain containing protein*‘ exprimierenden Pflanzen immer eine Bs3-vermittelte HR auslösen, auf den *CaLRR-RLK* exprimierenden Pflanzen dagegen nur bei etwa 30 %.

C. annuum cv. ECW-30R Pflanzen, die *CaLRR-RLK* überexprimieren, zeigen somit eine verzögerte Bs3-vermittelte HR im Vergleich zu ‚*KH-domain containing protein*‘ überexprimierenden Pflanzen.

B: graphische Darstellung für die Anzahl der Inokulationsstellen mit dem in A gezeigtem Phänotyp (Verzögerung der Bs3-vermittelten HR; rot).

Als Kontrolle für die zeitliche Verzögerung bzw. dafür, dass die Stämme tatsächlich eine Bs3-vermittelte HR auslösen können, dienten neun *C. annuum* cv. ECW-30R Pflanzen, die mit Agrobakterienstämmen, die die Expression von ‚*KH-domain containing protein*‘ vermitteln (TRV-Konstrukt), vakuumfiltriert wurden. Diese Pflanzen wurden ebenfalls mit den genannten vier *Xanthomonas*-Stämmen inokuliert (*Xcv* I74a und *Xcv* I74a (pDSK340) OD₆₀₀ 0,4; *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 (pDS300) OD₆₀₀ 0,002). Die beiden *avrBs3* exprimierenden Stämme induzierten 2 dpi eine Bs3-vermittelte HR.

In der Abb. 3.13 ist für jeden Stamm eine Inokulation beispielhaft für die *CaLRR-RLK* bzw. ‚*KH-domain containing protein*‘ exprimierenden Pflanzen gezeigt.

Somit ist *CaLRR-RLK* auch in Paprika in der Lage, die Bs3-vermittelte HR zu verzögern.

Das Protein CaLRR-RLK ist in der Plasmamembran lokalisiert

Um die Lokalisierung des CaLRR-RLK-Proteins zu bestimmen, wurde der ORF des Gens *CaLRR-RLK* als translationale GFP-Fusion (pER10-*CaLRR::GFP*) transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Induktion wurde der inokulierte Bereich mikroskopiert. Die cLSM-Aufnahme lässt vermuten, dass das CaLRR-RLK-Protein in der Plasmamembran lokalisiert (siehe Abb. 3.14A). Die GFP-Fluoreszenz ist weder im Zellkern noch in Zytoplasmasträngen zu beobachten, wie das bei der nicht-gezeigten GFP-Kontrolle zu beobachten war.

Um zu untersuchen, ob das CaLRR-RLK tatsächlich in der Zellmembran lokalisiert und nicht in der Zellwand oder im Zytoplasma, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt: Zum einen wurde eine Plasmolyse mit Blattscheiben des inokulierten Bereiches durchgeführt. Hier war zu beobachten, dass die GFP-Fluoreszenz sich zusammen mit der Zellmembran zusammenzieht. CaLRR-RLK ist demzufolge nicht in der Zellwand lokalisiert. Allerdings lässt sich bei diesem Versuch nicht unterscheiden, ob CaLRR-RLK in der Zellmembran oder im Zytoplasma lokalisiert.

Zum anderen wurde eine Zellfraktionierung mit inokuliertem Blattmaterial durchgeführt und die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot analysiert. In der Abb. 3.14C ist zu sehen, dass *CaLRR-RLK::GFP* nur im Totalextrakt und in der Membranfraktion zu detektieren ist aber nicht in der Zytoplasmafraktion, genau wie die Kontrolle PIP2A::GFP, ein GFP-Fusionsderivat eines Aquaporins. Im Gegensatz

dazu ist das kern- und zytoplasmalokalisierte GFP::GFP nur im Totalextrakt und in der Zytoplasmafraktion zu detektieren und nicht in der Membranfraktion.

Dies zeigt eindeutig, dass CaLRR-RLK in der Plasmamembran lokalisiert.

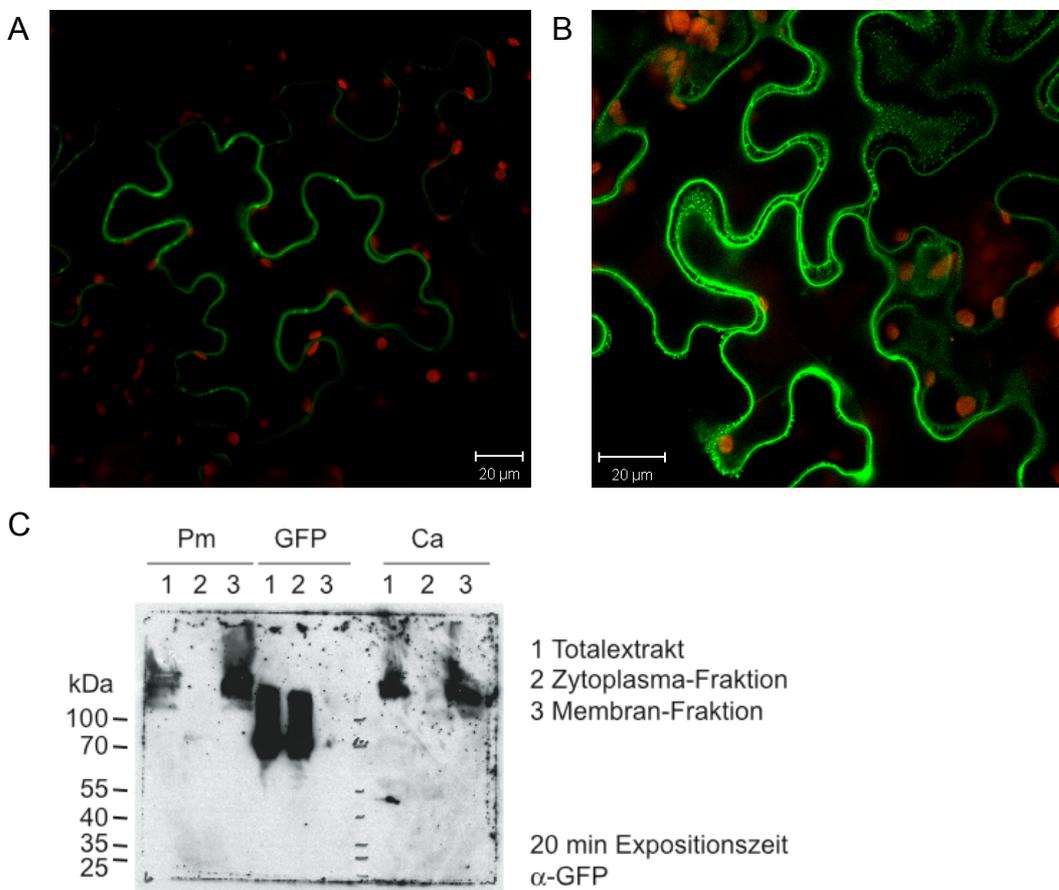


Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisierung des CaLRR-RLK

A: *Agrobacterium* GV3101 (pER10-CaLRR-GFP) wurde mit der OD_{600} 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert. CaLRR-RLK::GFP cLSM- Aufnahme 2 dpi

B: wie A mit anschließender Plasmolyse von Blattscheiben, die CaLRR-RLK::GFP exprimieren, Inkubation in 0,8 M Mannitol 1 h, cLSM, 2dpi. Die Zellmembran hat sich von der Zellwand gelöst und zusammengezogen. Da jetzt ‚doppelte Linien‘ zuerkennen sind, kann eine Lokalisierung in der Zellwand für CaLRR-RLK::GFP ausgeschlossen werden.

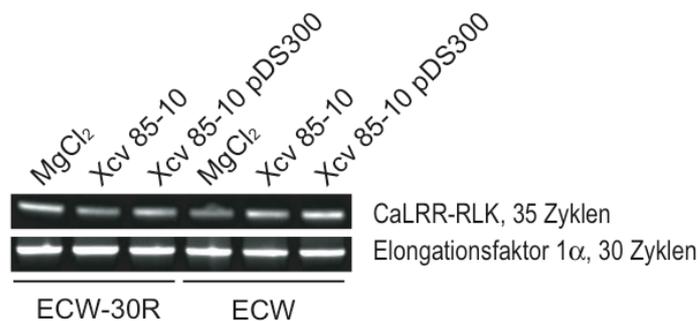
C: Agrobakterienstämme, die die Expression von PIP2A::GFP (pBIN-PM-GFP), GFP::GFP (pGWB6-GFP), oder CaLRR-RLK::GFP (pER10-CaLRR::GFP) vermitteln, wurden mit der OD_{600} 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert. Nach zwei Tagen erfolgte die Zellfraktionierung (siehe 2.5.14) und die anschließende Western Blot-Analyse (siehe 2.5.13) der Proben PIP2A::GFP als Kontrolle für ein zellmembranlokalisiertes Protein (Pm), GFP::GFP (GFP) als Kontrolle für ein zytoplasma-lokalisiertes Protein und CaLRR-RLK::GFP (Ca). CaLRR-RLK::GFP ist nur im Totalextrakt und in der Membran-Fraktion nachweisbar und nicht in der Zytoplasmafraktion. Somit ist CaLRR-RLK::GFP in der Plasmamembran lokalisiert.

CaLRR-RLK wird nicht durch die Expression von avrBs3 induziert

Zunächst sollte analysiert werden, ob der Inhibitor CaLRR-RLK der Bs3-vermittelten HR durch AvrBs3 induziert wird. Dafür wurden sowohl suszeptible als auch Bs3-resistente Paprika-Pflanzen mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 (pDS300) jeweils mit der OD₆₀₀ 0,2 inokuliert. 24 h nach der Inokulation wurde Blattmaterial für eine RNA-Isolation geerntet und cDNA synthetisiert. Im Anschluss wurde ein Bereich des *CaLRR-RLK*-Gens amplifiziert. Als Negativkontrolle diente die Inokulation mit Infiltrationsmedium.

Als Kontrolle für die gleiche Menge an Ausgangs-RNA diente die Amplifizierung des Elongationsfaktors 1 α . Wie in Abb. 3.15 zu erkennen ist, wird die Transkription des *CaLRR-RLK*-Gens nicht durch AvrBs3 induziert.

Abb. 3.15: Die Expression von *avrBs3* hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des *CaLRR-RLK*



Mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 2.5.11) wurde die Transkriptmenge des *CaLRR-RLK* etwa 24 hpi nach Inokulation verschiedener *Xanthomonas*-Stämme (OD₆₀₀ 0,2) miteinander verglichen. Der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor 1 α diente als Kontrolle für etwa gleiche RNA-Mengen. Die Transkriptmenge der *CaLRR-RLK* wird durch die Inokulation mit *Xcv* 85-10 reduziert, aber nicht zusätzlich durch die Expression von *avrBs3* (*Xcv* 85-10 (pDS300)) verändert.

Das CaLRR-RLK Protein beeinflusst die Expression von Bs3 nicht

Da *CaLRR-RLK* die Bs3-vermittelte HR verzögert, auch wenn Bs3 unter der Kontrolle des 35S *CaMV* Promotors coexprimiert wird, kann vermutet werden, dass *CaLRR-RLK* keinen Einfluss auf die Promotoraktivierung von *Bs3* hat. Dies sollte mit einer semiquantitativen RT-PCR bestätigt werden. Dafür wurde *GFP* oder *CaLRR-RLK::GFP* zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* transient in *N. benthamiana* Agrobakterium-vermittelt exprimiert (pER10-*CaLRR::GFP*, pVS300, pGWB16-*Bs3*).

Nach 24 Stunden wurde Blattmaterial für die RNA-Isolation geerntet und cDNA synthetisiert.

Im Vergleich der beiden Proben ist zu sehen, dass in beiden etwa die gleiche Menge *Bs3*-cDNA vorhanden ist (Abb. 3.16). Als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen diente der Elongationsfaktor 1α .

CaLRR-RLK hat somit keinen Einfluss auf die Promotoraktivierung von *Bs3*.

Eine weitere Möglichkeit, die *Bs3*-vermittelte HR zu unterdrücken, wäre eine Destabilisierung des *Bs3*-Proteins und somit zu einem erhöhten Abbau beizutragen. Um diese Hypothese zu testen, wurden *GFP* oder *CaLRR-RLK::GFP* zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* transient in *N. benthamiana* Agrobakterium-vermittelt exprimiert (pER10-CaLRR::GFP, pVS300, pK7360PBs3-TIA). Nach 48 Stunden wurden Proben für einen Western Blot geerntet und analysiert. Als Kontrolle dafür, dass die beobachtete Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR nicht auf einem Silencing-Effekt des CaLRR-RLK beruht, wurde die Mutante CaLRR-RLK_{c.1delA} mitgeführt.

Dabei wurde in allen drei Proben die gleiche Menge an *Bs3* detektiert (siehe Abb. 3.7). Somit beeinflusst CaLRR-RLK nicht die Menge des translatierten *Bs3* und greift demzufolge erst später in den Signalweg von der Expression des *Bs3*-Proteins bis zur Ausprägung einer HR ein.



Abb. 3.16: CaLRR-RLK hat keinen Einfluss auf die Promotoraktivierung von *Bs3*

Mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 2.5.11) wurde die Transkriptmenge des *Bs3* etwa 24 hpi nach Inokulation verschiedener Agrobakterienstämme miteinander verglichen. Der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor 1α diente als Kontrolle für etwa gleiche RNA-Mengen. Die Transkriptmenge des *Bs3* wird nicht verändert durch die Expression von CaLRR-RLK.

Mock: inokuliert mit AIM; K : GFP + AvrBs3 + *Bs3*; CaLRR: CaLRR-RLK + AvrBs3 + *Bs3*

Eine Interaktion von CaLRR-RLK mit Bs3 ist nicht nachweisbar

Da CaLRR-RLK die *Bs3*-vermittelte HR inhibiert, sollte untersucht werden, ob dies über eine direkte Interaktion der beiden Proteine geschieht. Um eine potentielle

Ergebnisse

direkte Interaktion von Bs3 mit CaLRR-RLK nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen eine Co-Immunopräzipitation und zum anderen eine Hefe-Dihybridanalyse.

Für die Co-Immunopräzipitation wurde *CaLRR-RLK::GFP* (pER10-CaLRR::GFP) und *Bs3::myc* (pK7360PBs3-TIA) mit *avrBs3* (pVS300) Agrobakterium-vermittelt in *N. benthamiana* coexprimiert. Als Positivkontrolle diente die Interaktion von Bs4 mit LePP5 wie bei Strauß (2010) beschrieben. Das Experiment wurde fünfmal durchgeführt, jedes Mal wurden sowohl Bs3::myc als auch CaLRR-RLK::GFP immobilisiert und versucht den jeweiligen Partner nachzuweisen. Im Totalextrakt waren beide Proteine nachweisbar, in der Co-IP nur das immobilisierte Protein aber nicht der potentielle Interaktionspartner. Die Positivkontrolle zeigte das erwartete Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

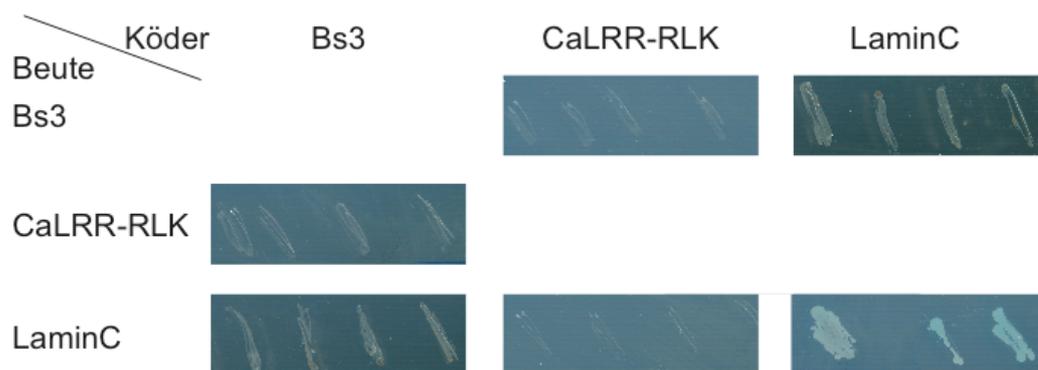


Abb. 3.17: Hefe-Dihybridanalyse zur Interaktion von Bs3 mit CaLRR-RLK

Die Positivkontrolle, Coexpression von AD::LaminC (pGADT7-LamC, AD- Aktivierungsdomäne) mit BD::LaminC (pGBST7-LamC, BD- Bindedomäne) gibt blaue, wachsende Kolonien, die beiden Proteine interagieren miteinander. Weder für die Kontrollen AD::CaLRR-RLK (pGADT7-CaLRR) mit BD::LaminC oder für *Bs3* (pGADT7-Bs3m bzw. pGBST7-Bs3m) mit *LaminC* (pGBST7-LamC bzw. pGADT7-LamC) noch für die Coexpression von AD::CaLRR-RLK mit BD::Bs3 bzw. BD::CaLRR-RLK (pGBST7-CaLRR) mit AD::Bs3 ist eine Interaktion nachweisbar. Einige Klone wachsen scheinbar, aber sie sind rot, was auf einen Adenosinmangel und somit keine Interaktion hindeutet. Bild: 6 Tage nach Überstreichen

Für die Hefe-Dihybridanalyse wurde eine nicht-funktionale Bs3-Mutante (c.116G>C = p.G39A; Müglitz und Lahaye, unveröffentlicht) eingesetzt, da das WT-Bs3 auch im Hefestamm THY.AP4 eine Zelltodreaktion auslöst (Müglitz und Lahaye, unveröffentlicht) und es somit fraglich war, ob *WT-Bs3* exprimierende Hefezellen des Stammes AH109 überleben. Die Analyse wurde in beide Richtungen durchgeführt, d. h. sowohl Bs3_{G39A} als auch CaLRR-RLK wurden als Köderprotein eingesetzt und

mit dem jeweils anderen Protein getestet. Als Negativkontrolle diente jeweils der Test mit LaminC und als Positivkontrolle LaminC mit LaminC. Wie Abb. 3.17 zeigt, konnte keine Interaktion zwischen Bs3 und CaLRR-RLK nachgewiesen werden. Die Expression der Proteine wurde mittels einer Western Blot Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Der Inhibitor CaLRR-RLK ist nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR

Die nächste Frage war, ob CaLRR-RLK ein genereller Zelltod-Suppressor ist. Dafür wurde *CaLRR-RLK* (pER10-CaLRR::GFP) oder *GFP* (pGWB6) in *N. benthamiana* zusammen mit *Rx* (pBIN61-Rx) und dem *Coatprotein* des Virus PVX (pBIN35S-TK), *Bs4* (pGWB20-Bs4) und *avrBs4* (pVSF-avrBs4), *avrB* (pVR220), *xopJ* (pGWB2-XopJ) oder *BAX* (pK7FWG2-BAX) Agrobakterium-vermittelt coexprimiert.

In Abb. 3.18 ist zu sehen, dass die von Rx und Coatprotein ausgelöste HR-Reaktion durch CaLRR-RLK um etwa 6 h verzögert wird. Inokuliert man die *Rx* und *Coatprotein* exprimierenden Agrobakterienstämme dagegen mit einer höheren Zelldichte ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Auch für die AvrB-, XopJ- und die BAX-vermittelte HR ist eine Verzögerung der Zelltodreaktion zu beobachten. Dieser Effekt ist auch zu beobachten, wenn die entsprechenden Agrobakterienstämme im Verhältnis 1 zu 1 inokuliert werden. Für die Bs4-vermittelte HR ist nur ein sehr schwacher Unterschied zu der Coexpression mit GFP zu beobachten.

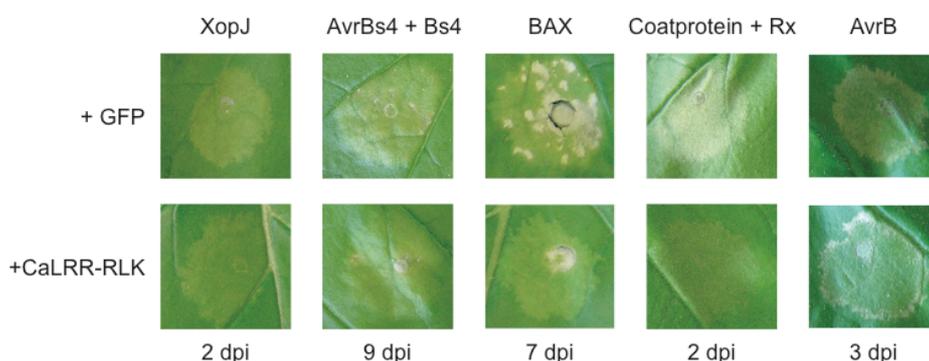


Abb. 3.18: CaLRR-RLK ist nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR

Verschiedene HR-Elicitoren wurden zusammen mit *GFP* oder *CaLRR-RLK* in *N. benthamiana* Agrobakterium-vermittelt coexprimiert. CaLRR-RLK verzögert alle getesteten Zelltodreaktionen (XopJ, Bs4, Rx, AvrB und BAX) Der Effekt ist verschieden stark ausgeprägt, am deutlichsten bei BAX und Bs3 (Vgl. Abb 3.12A).

Tab. 3.1: Spezifitätstest

exprimiertes Gen	OD ₆₀₀
<i>avrB</i>	0,6
<i>avrBs4</i>	1,0
<i>BAX</i>	0,8
<i>Bs4</i>	1,0
<i>Coatprotein</i>	0,2
<i>Rx</i>	0,2
<i>xopJ</i>	0,2
<i>CaLRR-RLK</i>	4x
<i>GFP</i>	4x

OD₆₀₀ für die getesteten HR- Elicitoren, Resistenzgene sowie GFP und CaLRR-RLK

Somit ließ sich zeigen, dass CaLRR-RLK eher ein genereller Zelltod-Inhibitor ist, da ein Suppressionseffekt bei verschiedenen HR-Elicitoren zu beobachten ist.

CaLRR-RLK supprimiert den Bs3-vermittelten Zelltod in Hefe nicht

Es sollte untersucht werden, ob der Suppressor CaLRR-RLK den Bs3-vermittelten Zelltod auch in Hefe unterdrücken kann. Dafür wurden kompetente THY.AP4 Hefezellen mit Galaktose-induzierbaren Plasmiden cotransformiert, die entweder *Bs3* (pYes-Dest52-Bs3) oder *CaLRR-RLK* (pYR-CaLRR) exprimieren. Als Kontrolle diente *LaminC* (pYes-Dest52-LamC bzw. pGADT7-LamC).

Wie in der Abb. 3.19 gezeigt ist, waren die mit *Bs3* und *LaminC* cotransformierten Hefezellen auf der induzierenden Galaktose-Platte in ihrem Wachstum eingeschränkt. Im Gegensatz dazu konnten die Kontroll-transformierten Hefezellen (*LaminC* mit *LaminC* oder *CaLRR-RLK* mit *LaminC*) bis zur Verdünnung 10⁻⁵ wachsen. Die Cotransformation von *CaLRR-RLK* mit *Bs3* verhielt sich wie *LaminC* mit *Bs3*, es waren nur bis zur 10⁻¹ Verdünnung Kolonien zu beobachten. Es wurden wahrscheinlich zu wenige Zellen eingesetzt, um die Expression der Proteine *LaminC* und *CaLRR-RLK* mittels Western Blot nachweisen zu können. Allerdings wurde *Bs3* eindeutig exprimiert und es wurden die gleichen Vektoren für die Expression der anderen Gene genutzt.

Es scheint unwahrscheinlich, dass alle 20 analysierten Klone, die aus drei verschiedenen Cotransformationen stammen, zwar *Bs3* aber nicht *CaLRR-RLK* exprimieren.

Somit wirkt CaLRR-RLK wahrscheinlich nicht als Suppressor der Bs3-vermittelten HR im Hefestamm THY.AP4.

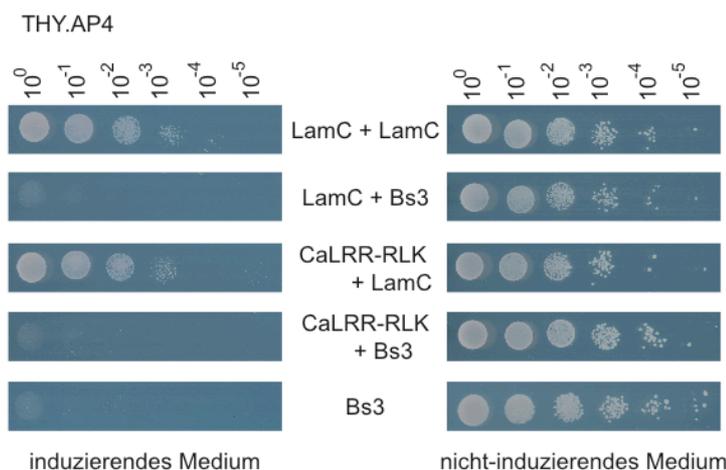


Abb. 3.19: CaLRR-RLK supprimiert den Bs3-vermittelten Zelltod in Hefe nicht

Cotransformation der für die angegebenen Proteine codierenden Galaktose-induzierbaren Plasmide. Klone wurden in flüssigem selektiven nicht-induzierendem Medium über Nacht angezogen und in Wasser auf die OD_{600} 0,4 eingestellt und anschließend jeweils 20 μ l der angegebenen Verdünnungen auf selektive, induzierende und nicht-induzierende Platten getropft. Die Platten wurden vier Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend dokumentiert. Das Ergebnis konnte mit jeweils 20 Klonen aus drei unabhängigen Cotransformationen bestätigt werden. Die Cotransformanten von Bs3 und CaLRR-RLK sind nicht in der Lage auf induzierendem Medium zu wachsen. Somit kann CaLRR-RLK den Bs3-vermittelten Zelltod im Hefestamm THY.AP4 nicht supprimieren.

3.2 Generierung transgener Arabidopsis-Linien für eine mutationsbasierte Sichtung

Weil das Genom von *A. thaliana* vollständig sequenziert ist und Arabidopsis eine Bs3-vermittelte HR mittels transienter Expression von *avrBs3* und *Bs3* erlaubt (Römer und Lahaye, unveröffentlicht), sollte eine mutagenese-basierte ‚knockout‘ Sichtung in *A. thaliana* durchgeführt werden, um positive Regulatoren der Bs3-Resistenz zu identifizieren.

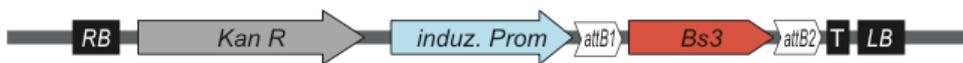
Zur Identifizierung positiver Regulatoren der Bs3-Resistenz sollten drei verschiedene Konstrukte bzw. transgene Linien erstellt werden (siehe Abb. 3.20):

- i) Ein Konstrukt, in dem die codierende Region des *Bs3*-Gens unter transkriptioneller Kontrolle eines induzierbaren Promotors ist. Da die Expression von *Bs3* für die Pflanze toxisch ist, kann dieses Konstrukt nach Mutagenese genutzt werden, Gene zu identifizieren, die für die Ausführung des Bs3-vermittelten Zelltodprogramms notwendig sind.
- ii) Des Weiteren sollen Linien generiert werden, in denen sowohl Gene, die für die Bs3-vermittelte Zelltodreaktion notwendig sind, als auch Komponenten der *AvrBs3*-vermittelten Transkriptionsaktivierung

identifiziert werden können. Dazu wurde ein Konstrukt erstellt, das sowohl *avrBs3* unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors als auch *Bs3* unter der Kontrolle seines nativen 343 bp Promotorfragmentes enthält.

- iii) Eine dritte Möglichkeit soll die Quantifizierung des Einflusses von Genen auf die Transkriptaktivierung erlauben. Dieses Konstrukt beinhaltet *avrBs3* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors und einen quantifizierbaren Reporter unter Kontrolle des 343 bp langen *Bs3*-Promotors.

i) Expression eines induzierbaren *Bs3*



ii) Expression eines induzierbaren *avrBs3*, welches die *Bs3*-Transkription aktiviert



iii) Expression eines induzierbaren *avrBs3*, welches die Transkription eines Reporters aktiviert



Abb. 3.20: Schematische Darstellung der T-DNAs für die drei Sichtungsmöglichkeiten

Die T-DNAs brauchen einen Selektionsmarker, beispielhaft ist *neomycin phosphotransferase II* (Kan R) gezeigt. Um die Klonierungsarbeiten zu vereinfachen, soll für die induzierbare Expression eine GATEWAY-kompatible Kassette vorhanden sein, die am Ende das zu induzierende Gen zwischen den att-sites (attB1 und attB2) enthält.

- i) Expression eines induzierbaren *Bs3*. Dieses Konstrukt erlaubt nur die Identifizierung von Signalwegkomponenten, die nach der *Bs3*-Expression in diesen Signalweg eingreifen
- ii) Expression eines induzierbaren *avrBs3*, welches an den *Bs3*-Promotor bindet und die Transkription von *Bs3* aktiviert. Mit diesem Konstrukt sind sowohl Regulatoren der *Bs3*-Promotor-Aktivierung als auch nachfolgende Signalwegkomponenten zu identifizieren.
- iii) Expression eines induzierbaren *avrBs3*, welches an den *Bs3*-Promotor bindet und die Transkription eines quantifizierbaren Reporters aktiviert. Mit diesem Konstrukt sind nur Regulatoren der *Bs3*-Promotor-Aktivierung identifizierbar.

3.2.1 Analyse zweier induzierbarer Systeme hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens

Für die Generierung oben genannter Konstrukte ist ein induzierbares System notwendig. pJCGLox vermittelt eine doppelt induzierbare Expression: Das induzierbare System basiert auf einer Dexamethason (DEX)-abhängigen Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors steht. Der Hitzeschock induziert die Transkriptbildung der Cre-Rekombinase. Wenn die Cre-Rekombinase DEX gebunden hat, wird sie in den Zellkern transportiert und kann dann das *eGFP* aus der T-DNA entfernen und somit den 35S CaMV Promotor in

unmittelbare Nähe der GATEWAY-Kassette bringen, so dass das darin enthalte Gen exprimiert wird (Joubes *et al.*, 2004).

Der Vektor pJCGLox sollte auf seine Eignung untersucht werden. Dafür wurde *Bs4* bzw. *avrBs4* in pJCGLox kloniert (pJCGLox-*Bs4* bzw. pJCGLox-256). Agrobakterienstämme, die je eines dieser beiden Plasmide tragen, wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und in *N. benthamiana* inokuliert. Nach einem Tag wurde je ein Blatt mit DEX besprüht bzw. eines dem 37 °C Hitzeschock für 2 h ausgesetzt und ein Blatt wurde doppelt induziert. Als Kontrollen dienten die transienten konstitutiven Expressionen von *Bs4* (pGWB20-*Bs4*) mit *avrBs4* (pVSF-*avrBs4*) und je ein P_{35S} Konstrukt mit dem korrespondierenden induzierbaren Konstrukt. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Blätter und die Inokulation eines Agrobakterienstammes, der induzierbar die Expression von *avrBs4* vermittelt (pJCGLox-256).

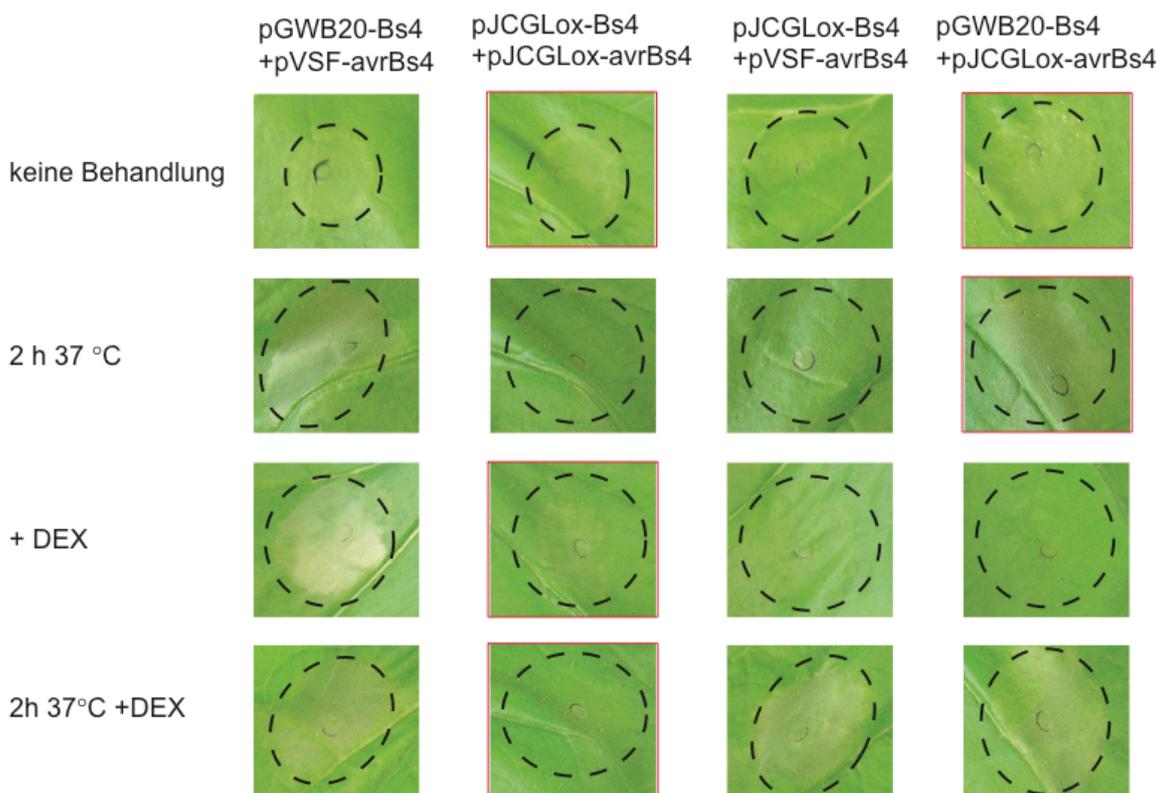


Abb. 3.21: Analyse des induzierbaren Systems pJCGLox

Der Vektor pJCGLox wurde mit *Bs4* und *avrBs4* transient Agrobakterium-vermittelt in *N. benthamiana* getestet. Die Negativkontrolle pJCGLox-256 (induzierbare *avrBs4*-Expression) konnte nie eine HR auslösen und ist hier nicht gezeigt. Erwartet wurde, dass die Positivkontrolle konstitutive Expression von *Bs4* und *avrBs4* immer eine HR von vergleichbarer Intensität auslöst ebenso wie die doppelte Induktion (2 h 37°C + DEX). In den anderen Inokulationen sollte keine HR zu beobachten sein. Fotos 6dpi, rotumrandet: Phänotypen, die von der Erwartung abwichen.

Diese Untersuchung wurde dreimal mit verschiedenen Pflanzenchargen wiederholt und zeigte jedes Mal ein anderes Ergebnis. In Abb. 3.21 ist exemplarisch ein Experiment dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unabhängig von der Induktion durch die pJCGLox-vermittelte Expression eine HR ausgelöst wurde, es aber auch vorkam, dass die doppelt induzierten Inokulationsstellen keine HR zeigten. Einzige Konstanz war in der Negativ- und Positivkontrolle zu beobachten. Diese entsprachen immer den Erwartungen. Somit ist dieses induzierbare System nicht als Basis für die Generierung induzierbarer *Bs3*- bzw. *avrBs3*- Konstrukte nutzbar.

pER10attR ist ein Derivat des Vektors pER10 (Zuo *et al.*, 2000), in dessen *Multiple cloning site* eine GATEWAY-Kassette über die Schnittstellen *SpeI* und *XhoI* kloniert wurde (Kay und Bonas, unveröffentlichte Daten). Das Plasmid exprimiert konstitutiv einen Transkriptionsfaktor, der nur in den Zellkern importiert wird, wenn er Estradiol gebunden hat, und dort den Estradiol-induzierbaren Promotor aktiviert und somit die Transkription des nachgeschalteten Gens induziert.

In pER10attR wurde *hax4* kloniert (pER10/H4, Kay und Bonas, unveröffentlichte Daten), und sollte bei Coexpression und Induktion mit *Bs4* zusammen eine HR auslösen. Es wurden Agrobakterienstämme, die entweder die konstitutive Expression von *Bs4* (pGWB20-*Bs4*) oder die induzierbare Expression von *hax4* vermittelten, im Verhältnis 1 : 1 gemischt und in *N. benthamiana* inokuliert. Ein Blatt wurde nicht behandelt, ein weiteres Blatt einen Tag nach Inokulation mit 50 µM Estradiol besprüht. Dieses Experiment wurde dreimal mit verschiedenen Pflanzenchargen wiederholt. Es konnte nur in der Coinokulation von *Bs4* mit dem induzierbaren *hax4* nach Estradiol-Induktion eine HR beobachtet werden, jedoch nicht bei unbehandelten Blättern.

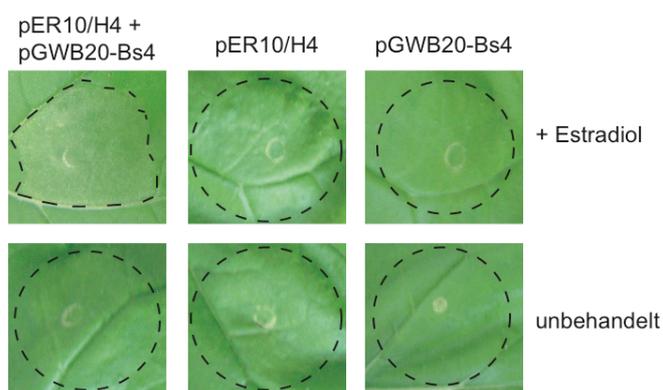


Abb. 3.22: Analyse des induzierbaren Systems pER10attR

Es wurden Agrobakterienstämme, die die Expression von *hax4* (induzierbar, pER10/H4) oder *Bs4* (konstitutiv, pGWB20-*Bs4*) vermitteln, mit der OD₆₀₀ 0,8 in *N. benthamiana* inokuliert und einen Tag später induziert. Nur nach Induktion und bei Coexpression von *hax4* und *Bs4* ist eine HR zu beobachten. Fotos 6 Tage nach Induktion

Die Negativkontrollen (Inokulation mit einem Agrobakteriumstamm, der entweder die konstitutive Expression von *Bs4* oder die induzierbare Expression von *hax4* vermittelte) lösten in keinem Fall eine HR aus (Abb. 3.22).

Somit ist pER10attR als Basis für die Generierung *avrBs3*- bzw. *Bs3*-induzierbarer Konstrukte nutzbar.

3.2.2 Vorbereitende Klonierungen für die Generierung *Bs3* und *avrBs3* induzierbarer Konstrukte

Generierung eines avrBs3-Gens mit PCR-amplifizierbaren repeats

Wie bereits erwähnt, sollen Arabidopsis-Mutanten im *Bs3*-Signalweg isoliert werden. Bei den potentiellen Kandidatenlinien muss das Transgen auf Fehler untersucht werden, um zu bestätigen, dass diese Kandidaten ein funktionales *Bs3* exprimieren. Dies soll mittels PCR und anschließender Sequenzierung geschehen. Ein Problem dabei stellt das *avrBs3*-Gen dar: aufgrund der 17,5 *repeats*, die auf Proteinebene zu 95,8 % identisch sind und eine vergleichbar hohe Sequenzidentität auf DNA-Ebene haben, ist *avrBs3* nicht fehlerfrei zu amplifizieren.

Deswegen wurde ein semisynthetisches *avrBs3*-Gen (Sequenz siehe Anhang 5) generiert, welches auf DNA-Ebene keine Sequenzwiederholungen aufweist aber die ursprüngliche Aminosäuresequenz codiert. Bei der Firma Genscript wurde die *repeat*-Sequenz zwischen den Schnittstellen *StuI* und *AgeI* synthetisiert und in pUC57 ligiert (Zielplasmid heißt pUC57-rep300). Dieses synthetische Fragment wurde über die Schnittstellen *StuI* und *AgeI* mit dem gleichen Fragment des Plasmids pENTR-T-356 ausgetauscht und somit das Plasmid pENTR-356* erhalten, das die nativen Sequenzen vom Start-ATG bis zur *StuI* Schnittstelle und von der *AgeI* Schnittstelle bis zum 3'Ende enthält, sowie das synthetische Fragment für die Sequenzwiederholungen. Bei der Sequenzierung wurde festgestellt, dass das *avrBs3* im Plasmid pENTR-356* die Mutation c.2770_2771insC aufwies, wodurch ein *Frameshift* verursacht wird. Dieser Fehler wurde mittels site-directed-Mutagenesis und den Primern ‚avrBs3_correct_fwd‘ und ‚avrBs3_correct_rev‘ behoben. Das fehlerfreie Plasmid heißt pENTR-356*K.

Das semisynthetische *avrBs3*-Gen wurde auf seine Funktionalität *in planta* getestet, indem es nach LR-Rekombination in den Vektor pGWB2 (konstitutive Expression mittels 35S CaMV Promotor) transient in Paprika exprimiert wurde. Dabei konnte

gezeigt werden, dass das Protein 356* in *C. annuum* cv. ECW keine HR auslöst, während es in *C. annuum* cv. ECW-30R wie das ursprüngliche *avrBs3*-Gen eine HR auslöst (siehe Abb. 3.23).

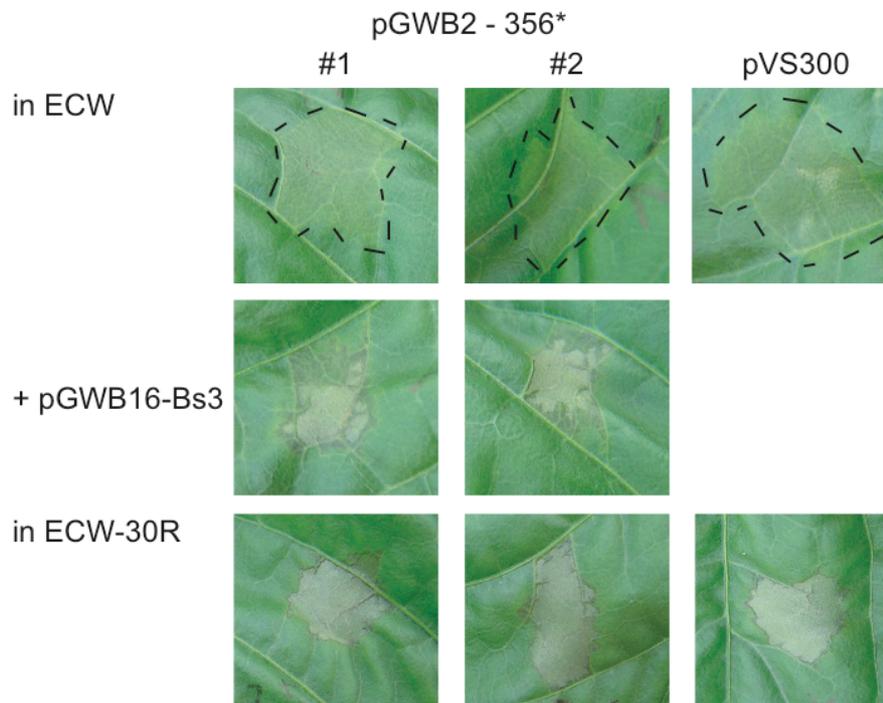


Abb. 3.23: Test des semisynthetischen *avrBs3*-Gens auf seine Funktionalität

Es wurden *C. annuum* cv. ECW und ECW-30R-Pflanzen mit Agrobakterienstämmen jeweils mit der OD_{600} 0,2 inokuliert, die entweder das semisynthetische *avrBs3* (pGWB2-356*) oder aber das WT *avrBs3* -Gen (pVS300) aus *Xcv* 85-10 exprimieren. Zusätzlich wurde die Coexpression von *avrBs3* mit *Bs3* (pGWB16-Bs3) analysiert. In den ECW-30R-Pflanzen war immer eine HR zu beobachten, während in den ECW-Pflanzen nur bei den Coinokulationen eine HR zu beobachten war und nie, wenn *avrBs3* alleine exprimiert wurde. Fotos 4 dpi.

Generierung eines Binärvektors mit MCS und TIA-Epitoptag

Für die Generierung neuer Binärvektoren in dieser Arbeitsgruppe wurde eine MCS mit einem so genannten TIA-Epitoptag (4x c-myc, 6x His, 3C und TEV Protease Schnittstelle, 3x HA, 2x strep) und Terminator synthetisiert und von der Firma Genscript in das Plasmid pUC57-SMCSTIA2 ligiert (Sequenz siehe Anhang 5). Dieses Fragment wurde in den Vektor pK7FWG2 über die Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III hinein kloniert. Das so entstandene Plasmid pK7SMCS TIA2 beinhaltet in seiner T-DNA die ursprünglich bereits vorhandene Kanamycinresistenz-Kassette, die neue MCS mit dem TIA-Epitoptag und einen Terminator. pK7SMCS TIA2 diente für weitere Klonierungen als Ausgangsvektor (Vektorkarte im Anhang 3).

Anschließend wurde über eine *Xho*I Restriktion der TIA-Epitoptag deletiert. Dieses neue Plasmid pK7SMCS-tag diente als Ausgangskonstrukt für weitere Klonierungen in dieser Arbeit (Abschnitt 3.2.3).

3.2.3 Generierung von Plasmiden mit induzierbarer Expression von *Bs3* oder *avrBs3*

Generierung des Plasmids pER10-Bs3::GFP

Mit pER10-Bs3::GFP transgenen Arabidopsispflanzen sollen mutagenese-basiert Mutanten identifiziert werden, die die induzierbare *Bs3*-Expression überleben. Dazu benötigt pER10-Bs3::GFP auf der T-DNA neben dem Selektionsmarker ein induzierbares *Bs3*. Dieses sollte an GFP fusioniert sein, um die Expression mittels Fluoreszenz-Mikroskopie überprüfen zu können.

Um einen solchen Vektor zu generieren, wurde als erstes eine SOE-PCR durchgeführt. Als Template diente cDNA von *C. annuum* cv. ECW-30R, um mit den Primern ‚Bs3A forw‘ und ‚Bs3Crew‘ den ORF von *Bs3* zu amplifizieren, sowie das Plasmid pJCGLox um das *eGFP*-Gen mit den Primern ‚forw SOE GFP‘ und ‚GFP rew‘ zu amplifizieren. Im zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte als Template genutzt, um mit den Primern ‚Bs3A forw‘ und ‚GFP rew‘ die Fusion *Bs3::GFP* zu erhalten. Dieses PCR-Produkt wurde als Template in einer topo-Reaktion mit dem Vektor pENTR™/D topo® benutzt, um das Plasmid pENTR-Bs3::GFP zu erhalten.

Mittels einer LR-Rekombination wurde die *Bs3::GFP*-Fusion in den binären Vektor pER10attR transferiert, der eine GATEWAY-Kassette unter der Kontrolle eines Estradiol induzierbaren Promotors besitzt (Klonierungsschema siehe Anhang 4).

Anschließend wurde das Plasmid in einem analytischen Verdau mit *Bsr*GI überprüft. Wie erwartet zeigte pER10-Bs3::GFP folgende Fragmente: 8800 bp, 2400 bp, 1700 bp und 200 bp, wobei das 1700 bp Fragment *Bs3::GFP* enthält. Im Vergleich dazu hat der ursprüngliche Vektor pER10attR statt des 1700 bp Fragments zwei Fragmente, 1300 bp und 400 bp, die charakteristisch für eine GATEWAY-Kassette mit dem *ccdB*-Gen und dem *Chloramphenicolresistenzgen* sind (siehe Abb. 3.24).

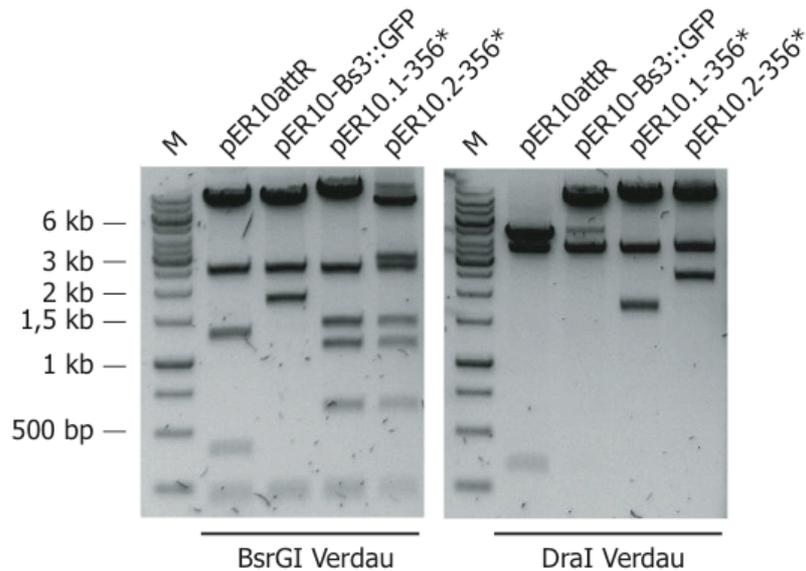


Abb. 3.24: Kontrollverdau der modifizierten pER10attR-Plasmide

Die Plasmide pER10attR, pER10-Bs3::GFP, pER10.1-356* und pER10.2-356* wurden jeweils mit dem Enzym *BsrGI* bzw. *DraI* geschnitten und die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. In dem *BsrGI*-Verdau erkennt man die Sequenz zwischen den att-sites: die GATEWAY-Kassette zeigt die Fragmente 1300 bp und 400 bp, das Fragment *Bs3::GFP* 1700 bp und das Fragment *avrBs3* Fragmente der Größe 580 bp, 1100 bp und 1400 bp. Der *DraI*-Verdau zeigt, welche Fragmente in die *PmeI*-site des Vektors pER10attR kloniert wurden.

M – 1 kb DNA ladder von Fermentas

Außerdem wurde pER10-Bs3::GFP auf seine Funktionalität *in planta* getestet. Das heißt, *Bs3::GFP* wurde transient in *N. benthamiana* nach Induktion Agrobakterium-vermittelt exprimiert. In nicht induzierten Blättern konnte weder eine GFP-Fluoreszenz noch das Ausbilden einer HR beobachtet werden. In induzierten Blättern dagegen, wurde nach 2 Tagen eine GFP-Fluoreszenz und nach drei Tagen eine HR beobachtet (siehe Abb. 3.25B und C).

*Generierung des Plasmids pER10.1-356**

Das Plasmid pER10.1-356* soll die Suche nach Kandidatengen ermöglichen, die sowohl nach der Expression von *Bs3* in die Signalkaskade eingreifen, als auch nach Kandidaten, die bei der Transkriptaktivierung von *Bs3* durch *AvrBs3* eine Rolle spielen. Deswegen braucht dieses Plasmid ein induzierbares *avrBs3*-Gen und den *Bs3*-ORF unter der Kontrolle seines nativen 343 bp Promotorfragmentes auf seiner T-DNA.

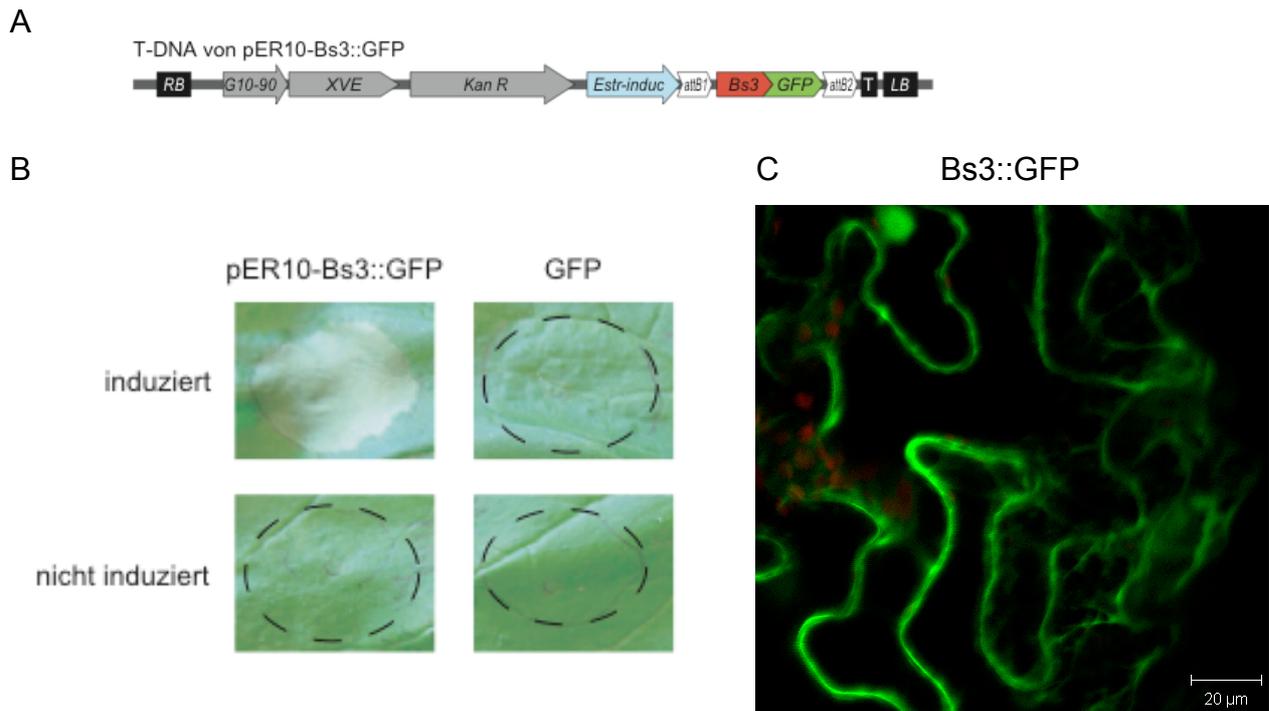


Abb. 3.25: Das Plasmid pER10-Bs3::GFP erfüllt die Erwartungen bzgl. seiner Funktion

A: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pER10-Bs3::GFP. Zwischen der Rechten und Linken Grenze (RB, LB) befinden sich G10-90, ein synthetischer konstitutiver Promotor, XVE, der ORF des estradiolabhängigen Transkriptionsfaktors, KanR, ein *NPTII*-Gen unter der Kontrolle des Nos-Promotors, Estr-induc, der durch XVE und Estradiol induzierbare Promotor, attB1 und attB2, die Rekombinations-sites der GATEWAY-Kassette, die translationale Fusion aus *Bs3* und *GFP* sowie ein *rbcS3A* poly(A)-Signal als Terminator (T), modifiziert nach Zuo *et al.*, 2000

B: Es wurden Agrobakterienstämme, die die Expression von *GFP* (pGWB6) oder *Bs3::GFP* (induzierbar, pER10-Bs3::GFP) vermitteln, mit der OD₆₀₀ 0,4 in *N. benthamiana* inokuliert. Einen Tag später erfolgte die Induktion mit Estradiol. Drei Tage nach Induktion hatte *Bs3::GFP* eine HR ausgelöst.

C: cLSM Bild des induzierten Inokulationsbereiches von pER10-Bs3::GFP, 2 dpi

Um die Expression von *Bs3* schnell nachweisen zu können, sollte es als translationale *GFP*-Fusion exprimiert werden.

Zuerst wurde mittels SOE-PCR der 343 bp Promotor von *Bs3* an den ORF von *Bs3* fusioniert. Dabei dienten in den ersten PCRs cDNA von *C. annuum* cv. ECW-30R als Template für die Amplifikation des *Bs3*-ORFs mit den Primern ‚SOE-PcDNA_forw‘ und ‚Bs3C rew‘, sowie genomische DNA von *C. annuum* cv. ECW-30R als Template für den Promotor mit den Primern ‚Prom-Xba-Pme-360 bp‘ und ‚SOE-PcDNA_rew‘.

Anschließend wurde die zweite PCR mit den Primern ‚Prom-Xba-Pme-360 bp‘ und ‚Bs3Crew‘ und den ersten beiden PCR-Produkten als Templates durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wurde anschließend in einer TOPO®-Reaktion in den Vektor pCRtopo bluntII eingebracht. Das erhaltene Plasmid wurde pBPcDNA genannt.

Im Anschluss wurde dieses Fragment in den Vektor pK7SMCS-tag über einen *EcoRV*- Verdau des Zielvektors bzw. *Ecl136*- mit *PmeI*- Verdau des Fragments eingebracht. Das entstandene Plasmid heißt pK7PcDNA. Von diesem Plasmid wurde mittels PCR die Elemente *Bs3*-Promotor, *Bs3*-ORF und Terminator mit den Primern '360bp-Pme-Swa-pK7' und ,pK7ins rew Sac-PmeI' amplifiziert und mittels einer TOPO®-Reaktion in den pCRtopo bluntII Vektor kloniert. Dieses Plasmid wurde pBPcDNAT genannt.

Danach wurde eine GFP-Fusion des *Bs3*-ORFs generiert, indem das *GFP*-Gen aus dem Vektor pK7FWG2 mit den Primern ,GFP T forw' und ,GFP Nhe rew' amplifiziert und in den Vektor pBGFP mittels einer TOPO®-Reaktion zwischenkloniert wurde. Anschließend wurde das *GFP*-Gen über einen *NheI* Verdau mit anschließender Ligation in den Vektor pBPcDNAT eingefügt. Das so entstandene Plasmid mit einer translationalen *Bs3::GFP*-Fusion heißt pBPcDNA::GFPT.

Im Anschluss wurde das Fragment PcDNA::GFPT von dem Plasmid pBPcDNA::GFPT mit den Primern ,rekombPcDNAT forw' und ,rekombPcDNAT rew' amplifiziert und mit Hilfe des ,dry in Fusion'-Kits in den via *PmeI*-Verdau linearisierten Vektor pER10attR hinein rekombiniert. Das daraus resultierende Plasmid heißt pER10.1

Zum Schluss wurde eine LR-Rekombination mit den Vektoren pER10.1 und pENTR-356*K durchgeführt, um das Plasmid pER10.1-356* zu erhalten (Klonierungsschema siehe Anhang 4).

Der analytische Verdau zeigt den Erfolg der Klonierung: Nach *BsrGI*-Verdau sind statt der beiden GATEWAY-Kassette-spezifischen Fragmente (1300bp und 400 bp) die für das semisynthetische *avrBs3* spezifischen Fragmente der Größe 580 bp, 1100 bp und 1700 bp zu sehen bzw. nach einem *DraI* Verdau das zusätzliche Fragment bei 2,3 kb, welches den *Bs3*-Promotor, die *Bs3::GFP* Fusion und den Terminator beinhaltet (siehe Abb. 3.24). Danach wurde pER10.1-356* transient in *N. benthamiana* auf seine Funktionalität getestet. Bei nicht induzierten Blättern war weder eine GFP-Fluoreszenz noch eine HR zu beobachten. Während induzierte Blätter bereits nach zwei Tagen GFP-Fluoreszenz im Zellkern und Zytoplasma und nach drei Tagen eine HR im inokulierten Bereich zeigten (Abb. 3.26). Als Kontrolle diente die Coinokulation eines Agrobakterienstammes, der die konstitutive *avrBs3*-Expression vermittelt (pVS300), mit *Agrobacterium* GV3101 (pER10.1-356*). Das

konstitutiv exprimierte *avrBs3* aktiviert die *Bs3::GFP* Expression unabhängig von der Induktion und löst eine Bs3-vermittelte HR aus.

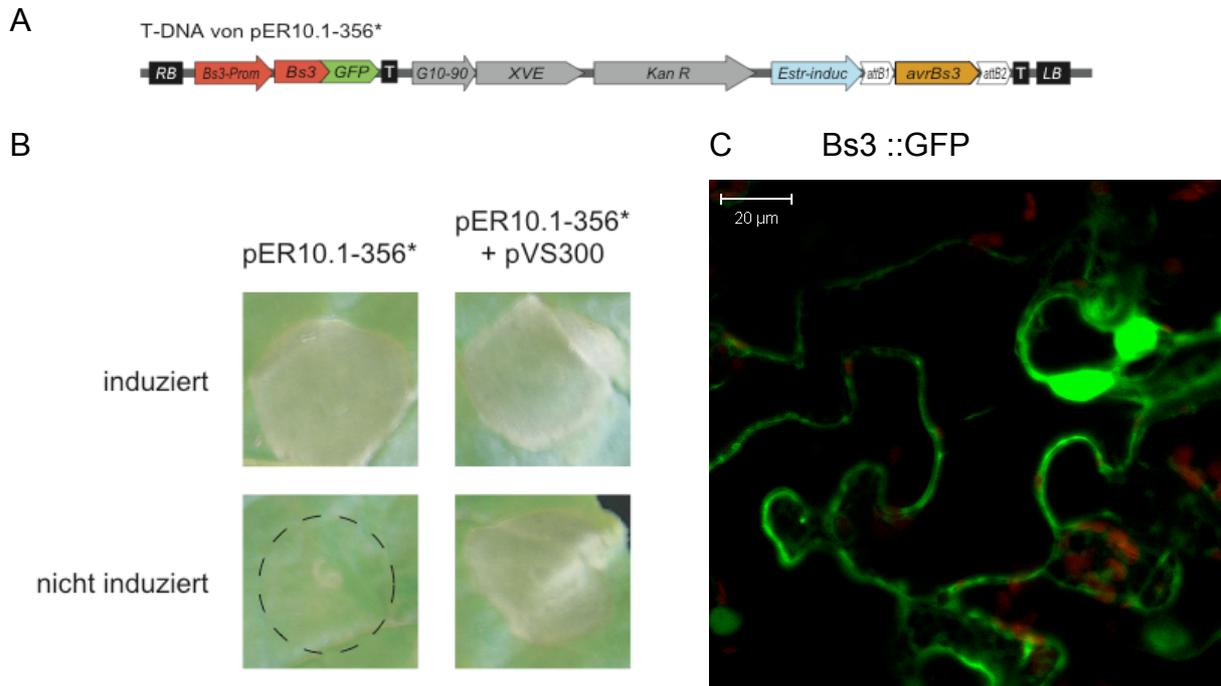


Abb. 3.26: Das Plasmid pER10.1-356* funktioniert wie erwartet

A: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pER10.1-356*. Neben den in Abb. 3.25A beschriebenen Elementen beinhaltet diese T-DNA das semisynthetische *avrBs3*-Gen und die translationale *Bs3::GFP* Fusion unter Kontrolle des 343 bp langen *Bs3*-Promotors (*Bs3*-Prom). Abbildung modifiziert nach Zuo *et al.*, 2000

B: Es wurden in *N. benthamiana*-Blätter *Agrobacterium* GV3101 (pER10.1-356*) mit der OD₆₀₀ 0,4 inokuliert und einen Tag später mit Estradiol induziert. Nur die Induktion führte zu einer HR nach 3 Tagen. Als Kontrolle wurde *Agrobacterium* GV3101 (pER10.1-356*) mit *Agrobacterium* GV3101 (pVS300) jeweils mit der OD₆₀₀ 0,4 coinokuliert. Das konstitutiv exprimierte *avrBs3* aktiviert den *Bs3*-Promotor unabhängig von der Estradiol-Induktion und induziert eine Bs3-vermittelte HR.

C: cLSM Bild des induzierten Inokulationsbereiches von *Agrobacterium* GV3101 (pER10.1-356*), 2 dpi

Generierung des Plasmids pER10.2-356*

pER10.2-356* transgene Arabidopsislinien sollen nach Mutagenese eine Sichtung gestatten, die eine Quantifizierung des Einflusses von Kandidatengenen ermöglicht. Da kein Bs3 anwesend ist, können nur Kandidaten gefunden werden, die bei der *Bs3*-Promotoraktivierung eine Rolle spielen. Als Reporter wurde *Luciferase* unter Kontrolle des 343 bp *Bs3*-Promotors gewählt.

Das *Luciferase*-Gen wurde aus dem Vektor pSPLuc+ über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III in den Vektor pK7SMCS-tag umkloniert. Das entstandene Plasmid heißt pK7Luc.

Anschließend wurde der 343 bp Promotor von *Bs3* von genomischer DNA aus *C. annuum* cv. ECW-30R mit den Primern ‚SOE shProm rew‘ und ‚360bp-Pme-SwapK7‘ amplifiziert und mittels SOE-PCR mit dem Fragment LucT aus dem Vektor pK7Luc (Primer: ‚SOELuc forw‘ und ‚pK7 ins rew‘) fusioniert. Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pCRtopo bluntII zwischenkloniert. Das entstandene Plasmid heißt pBPLucT.

Danach wurde von dem Plasmid pBPLucT das Fragment mit dem *Bs3*-Promotor, der *Luciferase* und dem Terminator mit den Primern ‚rekombPcDNAT forw‘ und ‚rekombPcDNAT rew‘ amplifiziert und mittels Rekombination in den via *PmeI*-Verdau linearisierten Vektor pER10attR überführt. Das so entstandene Plasmid wurde pER10.2 genannt.

Zum Schluss wurde das semisynthetische *avrBs3* mit Hilfe einer LR-Rekombination von dem Vektor pENTR-356*K in den Vektor pER10.2 überführt und somit das Plasmid pER10.2-356* erhalten (Klonierungsschema im Anhang 4).

Zur Kontrolle wurde sowohl ein *DraI*- als auch ein *BsrGI*-Verdau durchgeführt. Der *DraI*-Verdau zeigt das zusätzlich erwartete Fragment bei etwa 2300 bp. Während im *BsrGI*-Verdau die GATEWAY-Kassetten-spezifischen Fragmente (1300 bp und 400 bp) durch die für das semisynthetische *avrBs3* charakteristischen Fragmente der Größe 580 bp, 1100 bp und 1700 bp ersetzt wurden. Außerdem ist zu beobachten, dass zwei der pER10attR-Banden in pER10.2-356* größer sind, sowie ein zusätzliches Fragment zu beobachten ist, weil mit dem Fragment PLucT eine zusätzliche *BsrGI*-Schnittstelle eingefügt wurde (siehe Abb. 3.24).

Danach wurde pER10.2-356* auf seine Funktionalität getestet. Dafür wurden *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2) und *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2-356*) mit der OD₆₀₀ 0,8 in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert und einen Tag später mit Estradiol induziert. Als Negativkontrolle diente ein nicht-induziertes Blatt. Zwei Tage nach der Induktion wurden die Blätter mit Luminol-Lösung, dem Substrat der Luciferase, besprüht und mit Hilfe einer CCD-Kamera analysiert. Die mit *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2-356*) inokulierten Blattbereiche des induzierten Blattes gaben Photonen ab, während sowohl die nicht-induzierte Kontrolle als auch Kontrollinokulation, die keine *Luciferase*-Expression vermitteln, keine Photonen emittierten (siehe Abb. 3.27).

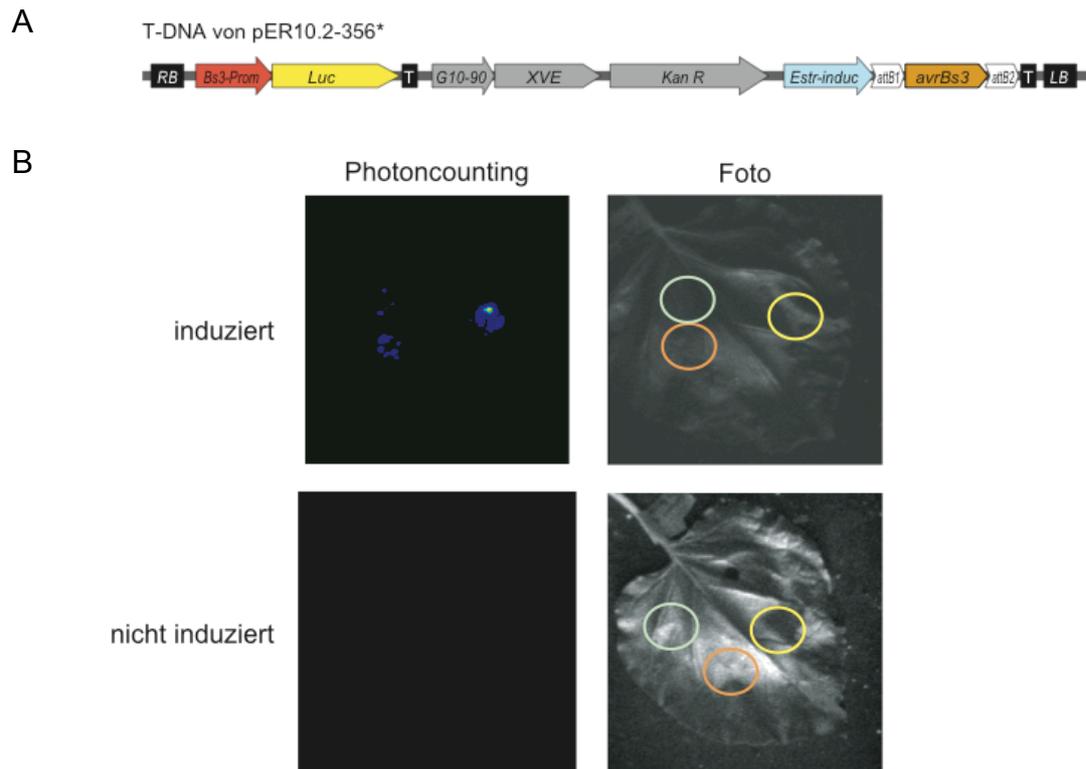


Abb. 3.27: Die Funktionalität des Plasmids pER10.2-356* entspricht den Erwartungen

A: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pER10.2-356*. Neben den in Abb.3.25A beschriebenen Elementen beinhaltet diese T-DNA das semisynthetische *avrBs3*-Gen und den *Luciferase*-ORF unter der Kontrolle des 343 bp langen *Bs3*-Promotors (*Bs3*-Prom). Abbildung modifiziert nach Zuo *et al.*, 2000

B: *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2-356*) und *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2) wurden jeweils mit der OD₆₀₀ 0,8 inokuliert und einen Tag später mit Estradiol induziert. Zwei Tage nach der Induktion erfolgte die Detektion der Luciferase-Aktivität nach Zugabe des Substrates Luminol mit einer CCD-Kamera. Nur *Agrobacterium* GV3101 (pER10.2-356*) kann nach Induktion *avrBs3* und *Luciferase* exprimieren.

hellgrün: pER10.2, orange und gelb: zwei verschiedene Klone mit pER10.2-356*

3.2.4 Beschreibung der erhaltenen T₁-Pflanzen

Es wurden jeweils 12 *A. thaliana* cv. Col-0 WT-Pflanzen Agrobakterium-vermittelt mit einem der drei Konstrukte (pER10-Bs3::GFP, pER10.1-356*, pER10.2-356*) transformiert (Abschnitt 2.8.2).

Nach etwa drei Wochen wurde das T₁- Saatgut geerntet und jeweils ein Aliquot sterilisiert und auf selektiven MS-Platten ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Keimlinge nach Kanamycin-resistenten Überlebenden durchmustert. Diese Überlebenden sind potentiell transgen. Somit ergaben sich Transformationsraten zwischen 0,1 % und 0,5 %.

Die überlebenden Sämlinge wurden in Erde umgesetzt und weiter kultiviert. Insgesamt wurden 190 Pflanzen untersucht.

Ergebnisse

Etwa acht Wochen alte Pflanzen wurden mittels PCR auf die Anwesenheit des Transgens untersucht, wobei das Actin-Fragment als Kontrolle dafür diente, dass die isolierte DNA in ausreichender Qualität vorlag. In Abb. 3.28 sind für jedes Konstrukt drei positive Beispiele gezeigt. In der Tab. 3.2 sind die Ergebnisse für die T₁-Generation zusammengefasst und im Anhang 8 ist im Detail aufgeführt, welche Linie nach dem PCR-Test transgen ist.

Tab. 3.2: Anzahl der Kanamycin-resistenten bzw. PCR-positiven Arabidopsis-Linien

Konstrukt	Kan-resistent	PCR-positiv	PCR-negativ	Tod vor 8. Woche
pER10-Bs3::GFP	34	25	6	3
pER10.1-356*	59	45	13	1
pER10.2-356*	40	27	9	4
pER10attR	21	16	4	1
pER10.1	18	14	2	2
pER10.2	18	16	2	0

Die Tabelle gibt die Anzahl der die Kanamycinselektion (Kan-resistent) überlebenden Arabidopsis-Linien in der T₁ an, sowie die Anzahl der Linien aus dieser Gruppe, die nach PCR-Analyse das Transgen vollständig (PCR-positiv) oder unvollständig bzw. nicht (PCR-negativ) enthielten und die Anzahl der Linien, die das Umsetzen in Erde nicht überlebten (Tod vor 8. Woche). Die mit pER10attR, pER10.1 bzw. pER10.2 transformierten Linien sollen als Kontrolle dafür dienen, dass die T-DNA keinen Effekt auf die Pflanzen hat.

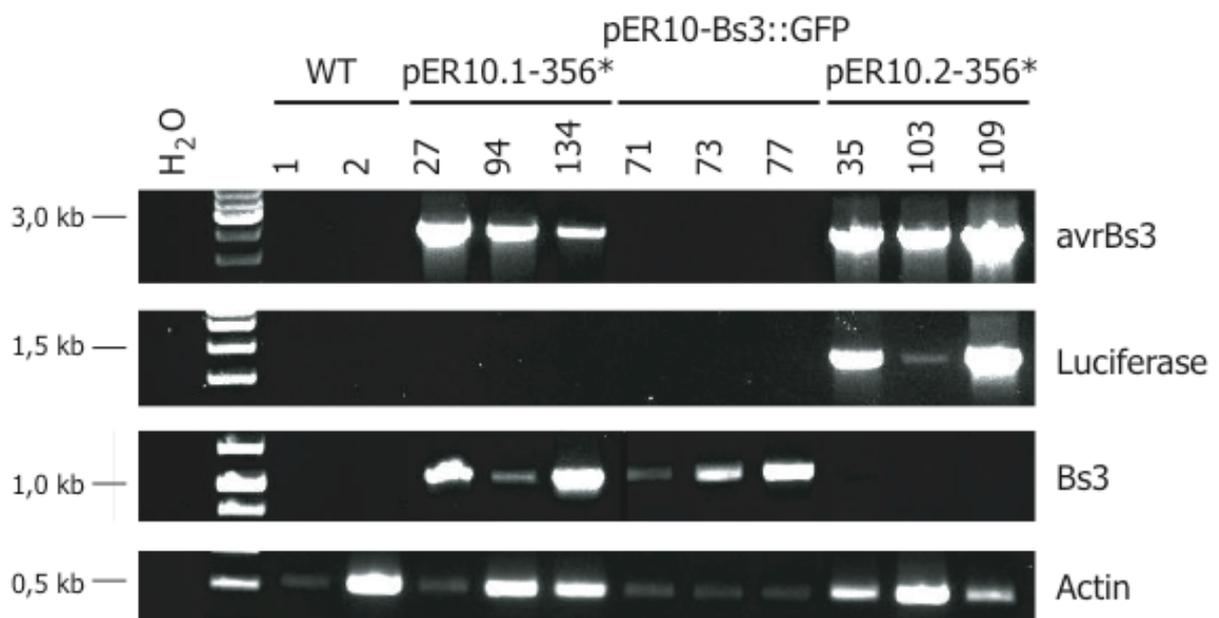


Abb. 3.28: PCR-Test auf Anwesenheit des Transgens in der T₁ der transformierten *A. thaliana* cv. Col-0

Es wurde von den angegebenen T₁-Pflanzen genomische DNA isoliert (Abschnitt 2.8.3). Diese diente als Template für die PCR, um zu zeigen, welches Transgen die Pflanzen tragen. Actin dient dabei als Kontrolle für die Qualität der eingesetzten DNA, nicht transformierte Pflanzen (WT) als Negativkontrolle.

3.2.5 Identifizierung von Linien mit nur einer Kopie des jeweiligen Transgens

Die in der T₁ mittels PCR positiv auf das Transgen getesteten Pflanzen wurden geselbstet und von dem T₂-Saatgut jeweils ein Aliquot sterilisiert und auf selektiven MS-Platten ausgesät, mit Ausnahme der drei Kontrollkonstrukte von denen nur jeweils zwei Linien getestet wurden.

Es wurde eine Segregation der Kanamycinresistenz nach Mendel beobachtet. Das heißt: bei nur einer Kopie des Transgens ist ein Aufsplitten der Kanamycinresistenten zu Kanamycinsensitiven von 3 zu 1 zu erwarten. Bei zwei Kopien, die segregieren, sollte dieses Verhältnis 15 zu 1 betragen usw. Deswegen wurde als erstes das Verhältnis der kanamycinsensitiven zu den kanamycinresistenten Pflanzen bestimmt, um schnell Linien mit mehr als einer Kopie zu identifizieren und von der weiteren Analyse auszuschließen. Anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt, um das Segregationsergebnis der Kandidaten mit nur einer Kopie zu bestätigen.

In Tab. 3.3 sind die Ergebnisse der Segregations- und der Southern Blot-Analysen zusammengefasst. Nur bei einer Linie gibt es einen Widerspruch zwischen der Segregations- und der Southern Blot Analyse. Bei vier Linien, für die die Segregationsanalyse nicht eindeutig war, konnte mittels Southern Blot die Kopienzahl bestimmt werden.

Die Abb. 3.29 zeigt ein Beispiel für die durchgeführten Southern Blot Analysen. Die Anhänge 9 und 10 zeigen im Detail die Ergebnisse der Segregations- und der Southern Blot Analysen.

Tab. 3.3: Zusammenfassung der Kopienzahl-Bestimmung

Konstrukt	Segregationsanalyse			Southern Blot Analyse		
	1 Kopie	> 1 Kopie	n.e.	1 Kopie	> 1 Kopie	n.d.
pER10-Bs3::GFP	18	2	5	3	4	18
pER10.1-356*	22	4	8	2	3	40
pER10.2-356*	15	4	3	5	3	19

Die Tabelle gibt an, wie viele Linien der einzelnen Konstrukte nach der Segregations- bzw. der Southern Blot-Analyse nur eine Kopie oder mehrere Kopien aufwiesen. n.e. nicht eindeutig bestimmbar, das Verhältnis der Kanamycinsensitiven zu den Kanamycinresistenten liegt zwischen den erwarteten Verhältnissen für eine oder zwei Kopien. Nicht für alle Linien wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. n.d. bisher kein Ergebnis.

Die Ergebnisse für die einzelnen Linien sind im Anhang 9 aufgelistet. Eine kurze Zusammenfassung ist in Tab. 3.4 gegeben. Für jedes Konstrukt gab es Linien, die den erwarteten Phänotyp nach der Induktion zeigten und die nur eine Kopie des jeweiligen Transgens besitzen. Für einige dieser Linien konnte die Kopienzahl bisher nur mittels Segregationsanalyse bestimmt werden.

3.2.7 Analyse der Funktionalität des Transgens und Bestimmung des Genotyps in der T₃

Zur Gewinnung der T₃ wurden für jedes Konstrukt mindestens zwei T₂-Linien ausgewählt und zwischen 10 und 20 Tochterlinien generiert. Jeweils ein Aliquot des T₃-Saatgutes wurde sterilisiert und auf selektiven MS-Platten mit und ohne Estradiol ausgesät.

Auf den estradiolhaltigen Platten soll der Phänotyp analysiert werden, mit der estradiolfreien Platte der Genotyp bestimmt werden. Wenn der Elter bereits homozygot für das Transgen war, so sollte die T₃-Tochterlinie ebenfalls homozygot sein und alle Pflanzen kanamycinresistent. War der Elter dagegen heterozygot für das Transgen, so wird es in der T₃-Tochterlinie WT-Pflanzen ohne Transgen geben, die kanamycinsensitiv sind (siehe Abb. 3.31).

Unter den zwei getesteten Linien (77 und 31) für das Konstrukt pER10-Bs3::GFP starben alle Pflanzen durch die Estradiolinduktion und bei beiden Linien gab es jeweils 9 bzw. 10 homozygote Tochterlinien.

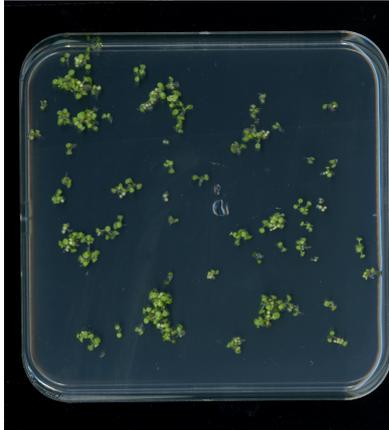
Für das Konstrukt pER10.1-356* wurden sieben Linien analysiert. Es gab jeweils zwischen 0 % und 22 % homozygote Tochterlinien. Bisher konnte keine Linie identifiziert werden, die auch in der T₃ den gesuchten Phänotyp (Zelltod nach Induktion) aufweist. Deswegen wurden weitere T₁-Pflanzen ausgesät, um weitere Linien zu generieren.

Für das Konstrukt pER10.2-356* wurden die Linien 35 und 103 analysiert. Es gab jeweils 7 bzw. 4 homozygote Tochterlinien. Alle Tochterlinien der Linie 35 emittierten Photonen nach der Induktion und der Substratzugabe. Bei der Linie 103 zeigte nur die Tochterlinie 10 diesen Effekt.

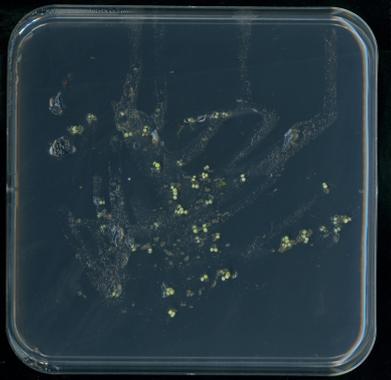
Insgesamt konnten jeweils zwei Linien für zwei der drei Konstrukte identifiziert werden, die für eine Mutagenese geeignet sind. Für das Konstrukt pER10.1-356* konnte bisher keine Linie identifiziert werden, die für eine Mutagenese geeignet ist.

Ergebnisse

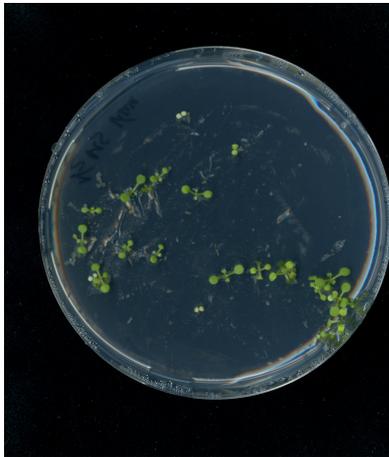
pER10-Bs3::GFP Linie 77
ohne Estradiol



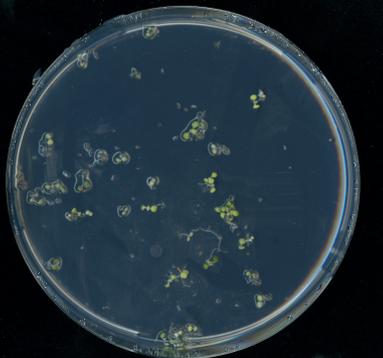
+ 50 μ M Estradiol



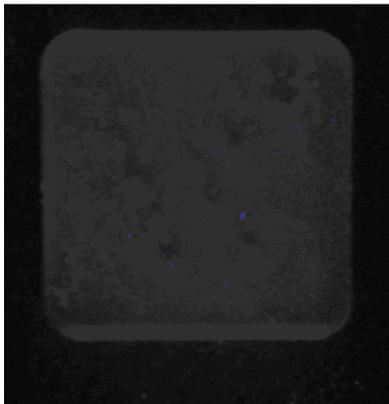
pER10.1-356* Linie 101
ohne Estradiol



+ 50 μ M Estradiol



pER10.2-356* Linie 34
ohne Estradiol



+ 50 μ M Estradiol

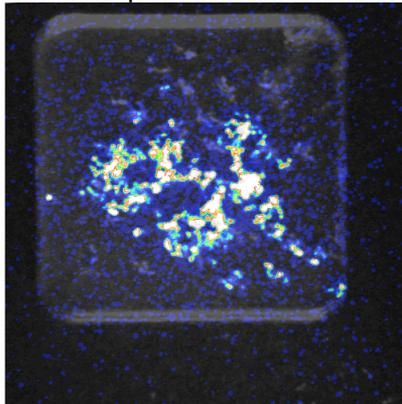


Abb. 3.30: Beispiele für positiv getestete Linien in der T₂

Die angegebenen Linien der zweiten Generation nach Transformation von *A. thaliana* cv. Col-0 wurden auf induzierenden und nicht-induzierenden, selektiven MS-Platten nach der Oberflächensterilisation des Saatgutes ausgesät.

pER10-Bs3::GFP Linie 77 und pER10.1-356* Linie 101: 11 Tage nach Aussaat gibt es auf der induzierenden Platte keine Überlebenden; pER10.2-356* Linie 34: auf der induzierenden Platte wird *Luciferase* exprimiert, die Luminol umsetzt und dabei Licht emittiert, die Bilder wurden 11 Tage nach der Aussaat mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

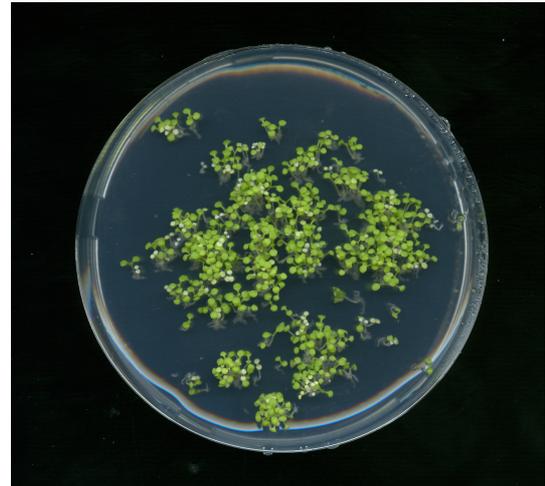
T₃ pER10-Bs3::GFP Linie 77

Tochterlinie 1



homozygot

Tochterlinie 4



heterozygoter Elter

Abb. 3.31: Identifizierung homozygoter Tochterlinien in der T₃

Zur Bestimmung des Genotyps der transgenen *A. thaliana*-Tochterlinien wurde jeweils ein Aliquot des oberflächensterilisierten T₃-Saatgutes auf selektivem Medium ausgesät. Als Beispiel sind zwei Tochterlinien der Linie 77 des Konstruktes pER10-Bs3::GFP gezeigt. Tochterlinie 1 zeigt keine Kanamycinsensitiven (weiße Keimlinge) und ist demzufolge homozygot, die Tochterlinie 4 weist zu etwa 25 % Kanamycinsensitive auf und demzufolge ist der Elter heterozygot. Die Bilder wurden 12 Tage nach Aussaat aufgenommen

3.2.8 Bestimmung des Integrationsortes der T-DNA in ausgewählten transgenen *A. thaliana* Linien

Für vier Linien, die ihren erwünschten Phänotyp auch in der T₃ zeigten und für die in dieser Generation homozygote Tochterlinien identifiziert werden konnten, sollte zunächst der Integrationsort des Transgens bestimmt werden und anschließend eine Mutagenese durchgeführt werden.

Tab. 3.5: Integrationsorte des Transgens für die transgenen *A. thaliana*-Linien 31, 35, 77 und 103

Konstrukt	Linie	Integrationsort	Chromosom
pER10-Bs3::GFP	77	BAC Klon T6K12, Pos. 22.674	3
	31	BAC Klon T2G17, Pos. 60.401	2
pER10.2-356*	35	BAC Klon T6K12, Pos. 23.011	3
	103	BAC Klon MAH20, Pos. 25.937	5

Die iPCR-Produkte der genomischen DNA der jeweiligen Linie wurden analysiert und mittels BLAST einem Arabidopsis-Lokus zugeordnet. Zufällig sind alle vier Integrationsorte intergenisch und über einen BAC-Klon definiert.

Um den Integrationsort des Transgens zu bestimmen, wurde eine inverse PCR (iPCR; Abschnitt 2.8.5) durchgeführt. Die Sequenzierung des iPCR-Produktes hat für die ausgewählten vier Linien ergeben, dass das Transgen in intergenischen Bereichen inseriert wurde und somit keine *loss-of-function*-Mutation eines Gens entstanden ist (Details siehe Tab. 3.5).

Um diesen Integrationsort zu bestätigen wurden Primer abgeleitet, die etwa 500 bp neben der Integrationsstelle liegen. Im WT-Genom ist bei einer PCR mit diesen Primern ein ca. 1 kb langes Produkt zu erwarten. Für die transgene Linie ist dagegen ein 10,2 kb Fragment zu erwarten, welches nicht amplifiziert werden kann aufgrund der kurzen Elongationszeit im PCR-Zyklus.

Eine weitere Möglichkeit ist eine PCR mit dem transgenspezifischen Primer LB2 und einem der Primer, die neben der Integrationsstelle liegen. Diesmal kann es kein PCR-Produkt für den WT geben, aber ein etwa 600 bp Produkt für die transgene Linie.

In Abb. 3.32 ist dies beispielhaft für die Linie 31 gezeigt. Für die anderen drei transgenen Linien konnte auf die gleiche Weise der Integrationsort bestätigt werden.

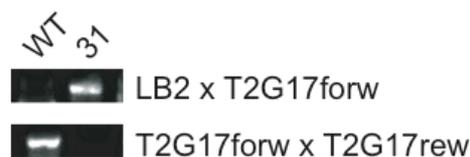


Abb. 3.32: Kontroll-PCRs für den Integrationsort der transgenen *A. thaliana*-Linie 31

Wie im Abschnitt 2.8.5 beschrieben wurden Primer für die Kontroll-PCRs abgeleitet und die entstandenen Fragmente analysiert. Wie zu erwarten war, konnte nur in der Linie 31, aber nicht im WT das Fragment für den transgenspezifischen Primer (LB2) und dem integrationsortspezifischen Primer (T2G17forw) nachgewiesen werden, während das Fragment mit den integrationsortspezifischen Primern (T2G17forw, T2G17rew) nur im WT und nicht in der Linie 31 nachgewiesen werden konnte.

3.3 EMS-vermittelte Mutagenese

Um Mutanten im Bs3-vermittelten Zelltod-Signalweg zu erhalten, wurden vier transgene *A. thaliana*-Linien mit EMS mutagenisiert (Abschnitt 2.8.6), die zu zwei verschiedenen Konstrukten gehören. Die Linien 35 und 103 sind pER10.2-356* transgen und die Linien 31 und 77 tragen die T-DNA des Vektors pER10-Bs3::GFP. Nach der Mutagenese wurden die jeweils ca. 8000 Samen in 50 Pools ausgesät und bis zur Blüte gebracht. Aufgrund der nicht gleichmäßigen Verteilung des mutierten

Saatgutes, wurden einige Pools vereinigt. Nach ca. drei Monaten wurde die M_2 in diesen Pools geerntet. Für die Linien 35, 103, 31 und 77 gibt es 50, 31, 50 bzw. 43 Pools.

Da die Sichtung für die pER10.2-356* transgenen Linien arbeitsintensiver ist, wurde entschieden, zuerst die Linie 77 (pER10-Bs3::GFP) zu analysieren.

3.3.1 Einschätzung der Mutageneserate für eine ausgewählte Linie

Zur Einschätzung der Mutageneserate in der Linie 77 für das Konstrukt pER10-Bs3::GFP wurde jeweils ein Aliquot aus acht Pools sterilisiert und auf selektiven MS-Platten ausgesät. Nach 24 Tagen wurden insgesamt 16 weiße Sämlinge gefunden, was bei insgesamt 30.200 ausgesäten Samen 0,53 ‰ entspricht. Außerdem wiesen ca. 1,5 % der Pflanzen einen chlorotischen Phänotyp auf (siehe Abb. 3.33).

Abb. 3.33: Sichtbare phänotypische Veränderungen in der M_2



Zur Einschätzung der Mutageneserate der *A. thaliana*-Linie 77 (pER10-Bs3::GFP) wurde aus acht Pools der M_2 jeweils ein Aliquot des Saatgutes oberflächen-sterilisiert und auf selektivem Medium ausgesät. Als Beispiel ist der Pool 11 gezeigt. Bild 24 Tage nach Aussaat.

roter Pfeil: 1 weißer Sämling
blauer Pfeil: chlorotisches Blatt

3.3.2 Sichtung der ausgewählten Linie 77 in der M_2

Um Mutanten des Bs3-vermittelten Zelltod-Signalweges zu identifizieren, wurde aus 43 Pools Saatgut sterilisiert und auf induzierenden, selektiven MS-Platten ausgesät. Nach 24 Tagen wurde nach Überlebenden gesucht und diese pikiert. Bei neun Pools hat wahrscheinlich die Estradiol-Induktion nicht funktioniert, da alle Pflanzen überlebten. Somit wurden insgesamt ca. 130.400 Sämlinge aus den anderen Pools gesichtet und es konnten jeweils zwischen 0 und 40 potentielle Kandidatenpflanzen identifiziert werden.

Diese wurden nach ca. sechs Wochen erneut induziert und ein Blatt der Überlebenden mikroskopiert. Von den 423 potentiellen Kandidatenpflanzen haben 422 erneut die Induktion des *Bs3::GFPs* überlebt. Bei 252 potentiellen

Kandidatenpflanzen konnte die GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass es bei diesen Kandidaten keine *Frameshift*- oder vorzeitige Stopp-Mutationen im *Bs3*-Gen gegeben hat. Bei den anderen 170 Kandidatenpflanzen hat es vermutlich eine Mutation im *GFP*, im *Bs3*, im Transkriptionsfaktor *XVE* oder im Estradiol-induzierbaren Promotor gegeben.

Von den GFP exprimierenden, überlebenden Kandidaten wurde genomische DNA isoliert und das *Bs3*-Gen sequenziert. Bei einer Kandidatenpflanze (77-10-5) konnten zwei Mutationen im *Bs3*-Gen nachgewiesen werden. Für 20 Kandidaten konnte keine Sequenzierung durchgeführt werden, weil die Qualität der isolierten DNA nicht ausreichte. Bei den anderen 231 Kandidaten konnte keine Mutation im *Bs3*-Gen nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese eine Mutation außerhalb des Transgens tragen, die für das Überleben nach der *Bs3*-Induktion verantwortlich ist (Details siehe Anhang 12).

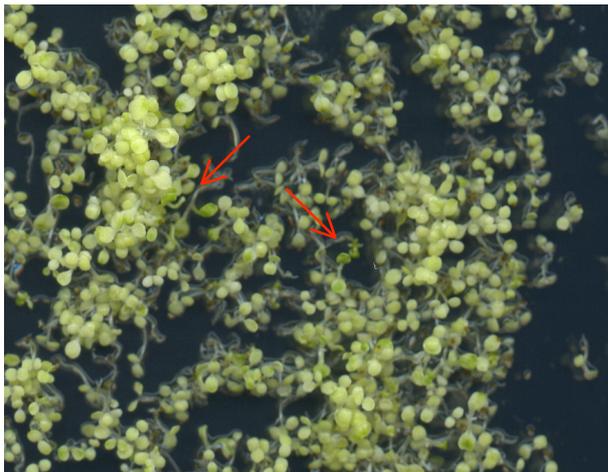


Abb. 3.34: Kandidatenpflanzen des Pools 4
Oberflächensterilisiertes Saatgut aus dem Pool 4 der mutagenisierten *A. thaliana*-Linie 77 (pER10-*Bs3*::GFP) wurde auf induzierenden, selektiven Medium ausgesät. 24 Tage nach Aussaat wurden die Sämlinge nach Überlebenden (rote Pfeile) durchmustert.

3.3.3 Zwei Mutationen im *Bs3*-Gen verhindern den Zelltod

Die mutierte Kandidatenlinie 77-10-5 trägt zwei Mutationen im *Bs3*-Gen (c.509A>G und c.511A>G, entspricht im Protein: p.Glu170Gly und p.Met171Val). Daher stellt sich die Frage, ob diese beiden Mutationen dafür verantwortlich sind, dass das *Bs3*-Protein keinen Zelltod auslöst.

Dies wurde überprüft, indem aus der genomischen DNA dieser Kandidatenlinie das *Bs3*::GFP-Gen in einen *entry*-Vektor (pENTR-*Bs3*::GFP10-5) kloniert wurde. Dieses Plasmid erlaubt rekombinationsbasiert einen Transfer des mutierten *Bs3*::GFP in einen Expressionsvektor (pGWB2). Anschließend wurde das mutierte *Bs3*::GFP-Gen transient in *N. benthamiana* mittels Agrobakterium-vermittelter Expression analysiert.

Als Kontrolle diente ein WT-*Bs3*, welches ebenfalls unter der Kontrolle eines 35S CaMV Promotors stand (pGWB2-*Bs3*). Beide Agrobakterienstämme wurden mit der Zelldichte OD₆₀₀ 0,8 inokuliert. Bereits nach 1,5 Tagen zeigte die Kontrollinokulation eine beginnende HR, während das mutierte *Bs3*_{E170G, M171V} auch nach 10 Tagen keine HR zeigte (siehe Abb. 3.35).

Somit sind tatsächlich die beiden Mutationen im *Bs3*-Gen des Kandidaten 77-10-5 für das Überleben verantwortlich und keine *second-site* Mutation.

Abb. 3.35: Die Variante *Bs3*_{E170G,M171V} löst keine HR aus



3.3.4 Gewinnung der M₃ für eine weitere Analyse der Kandidatenlinien

Von den 423 potentiellen Kandidatenpflanzen wurde die nächste Generation (M₃) generiert. Dabei bildeten 61 Kandidatenpflanzen kein Saatgut, trotz Ausbildung der normalen Blütenstände nach makroskopischer Betrachtung. Sieben weitere Kandidatenpflanzen sind in ihrem Wachstum und in ihrer Entwicklung deutlich verzögert, so dass auch nach insgesamt vier Monaten keine Blütenstandentwicklung stattfand.

Für eine weitere Analyse sind nur die 250 Kandidatenlinien interessant, die sowohl die Estradiolinduktion überlebten, als auch *Bs3::GFP* exprimierten und keine Mutation im *Bs3*-Transgen aufwiesen. Aus dieser Gruppe konnte nur von 237 Kandidatenpflanzen M₃-Saatgut gewonnen werden. Diese Kandidaten stammen aus 31 verschiedenen Pools. 18 dieser Kandidaten sind vertrauenswürdiger als die anderen, da hier die *Bs3::GFP*-Expression nicht nur in einzelnen Zellen beobachtet werden konnte wie bei den anderen Kandidaten. Die 18 vertrauenswürdigeren Kandidatenpflanzen stammen aus 12 verschiedenen Pools. Einer dieser Kandidatenpflanzen (77-27-10) bildete kein M₃-Saatgut.

4 Diskussion

4.1 Die Überexpressionssichtung in *N. benthamiana*

Um Komponenten der Bs3-vermittelten HR zu identifizieren, wurden einzelne Paprika-cDNA-Fragmente unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors zusammen mit *avrBs3* und *Bs3* Agrobakterium-vermittelt *in planta* exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden etwa 5.800 cDNA-Klone analysiert, von denen 14 ein reproduzierbares Abweichen von der Positivkontrolle zeigten (Abschnitt 3.1.1). Im Folgenden sollen die Ergebnisse für drei dieser cDNA-Klone diskutiert werden.

4.1.1 Das Ubiquitin-Homologe beeinflusst die Bs3-vermittelte HR nicht

Bei dem Klon 17F10 handelt es sich um ein Polyubiquitin-Homologes, da das Insert von 17F10 zu 100 % mit der 4.4 Polyubiquitin mRNA aus *C. annuum* cv. *Nockkwang* (AY489136) übereinstimmt. Der Klon 17F10 löste innerhalb von sechs Tagen eine HR-ähnliche Reaktion aus (Abb. 3.3A). Dieses Ergebnis ist überraschend, da bisher ein solcher Effekt nur für die Überexpression von Ubiquitin-Mutanten beschrieben wurde (Shang *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2008). Für die Überexpression von Ubiquitin selbst ist bisher nur bekannt, dass es Cycloheximid-Resistenz vermittelt (Hanna *et al.*, 2003).

Dass die Überexpression von Ubiquitin die Bs3-vermittelte HR nicht beeinflusst (Abschnitt 3.1.2), stimmt mit der Aussage überein, dass SGT1, ein positiver Regulator der Bs3-vermittelten HR (Abschnitt 1.2.2 und 1.7), wahrscheinlich unabhängig vom Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau in Resistenzmechanismen involviert ist (Azevedo *et al.*, 2006).

4.1.2 Das partielle Bs3 stört die Aktivität eines oligomeren Bs3-Komplexes

Bei der Sichtung wurde eine cDNA identifiziert, die das erste Exon von *Bs3* und einen Teil des *Bs3*-Promotors beinhaltet (Abschnitt 3.1.4). Dies ist unerwartet, weil in der Bibliothek nur cDNA-Fragmente vorhanden sein sollten. Entweder enthielt die verwendete RNA auch DNA oder es gibt eine überlappende mRNA vom gleichen Strang, die außer dem ersten Exon von *Bs3* auch dessen Promotor beinhaltet.

Allerdings enthält der 1kb-Abschnitt vor dem Startcodon des *Bs3*-Gens so viele Stoppcodone, dass der längste Leserahmen nur etwa 110 bp lang wäre. Wahrscheinlich war die verwendete RNA mit DNA kontaminiert.

Das partielle *Bs3* ist nicht in der Lage, allein exprimiert, eine HR auszulösen. Dennoch verzögert es die *Bs3*-vermittelte HR bei Coexpression mit *avrBs3* und *Bs3* unter der Kontrolle des nativen Promotors, aber nicht bei Coexpression mit einem konstitutiv exprimierten *Bs3* (Abb. 3.6). Dafür gibt es drei mögliche Erklärungen:

- a) Das AvrBs3-Protein bindet an beide Promotoren, sowohl den im Bibliotheksklon als auch dem Promotor des P_{Bs3} -*Bs3* und wird quasi austitriert, da der Bibliotheksklon im vierfachen Überschuss eingesetzt wurde. Durch die Bindung des AvrBs3 am *Bs3*-Promotor im Bibliotheksklon wird weniger Transkript des nativen *Bs3* gebildet, weil weniger AvrBs3 für dessen Promotor zur Verfügung steht.
- b) *Bs3* ist nicht als Monomer aktiv, sondern als Oligomer, d. h. bei Coexpression des verkürzten *Bs3* zusammen mit dem nativen *Bs3* entstehen zufällig Proteinkomplexe, die nur aus dem nativen *Bs3*, nur aus dem verkürzten *Bs3* oder gemischt aus beiden Proteinvarianten bestehen. Erwartungsgemäß sind nur die Proteinkomplexe funktional, die aus dem nativen *Bs3* bestehen. Diese sind bei der Coexpression mit dem verkürzten *Bs3* deutlich seltener als bei Coexpression von *Bs3* mit z. B. *GFP*. Diese Überlegung wird durch die Resultate eines einfachen Experimentes bestätigt (Müglitz und Lahaye, unveröffentlichte Daten). Dabei wurden natives *Bs3* und eine nicht-funktionale *Bs3*-Punktmutante in verschiedenen Verhältnissen zueinander coexprimiert. Die HR-Reaktion war deutlich verzögert im Vergleich zu einer Coexpression von nativen *Bs3* mit *GFP* im gleichen Verhältnis. Der zeitliche Unterschied war größer je mehr von der *Bs3*-Mutante exprimiert wurde. Aufgrund dieses Experimentes ist die These a) eher unwahrscheinlich, da hier *Bs3* unter der Kontrolle des konstitutiven 35S CaMV Promotors exprimiert wurde, und keine Bindung von AvrBs3 an dem nativen *Bs3*-Promotor notwendig war. Die Beobachtung, dass die durch die konstitutive Expression von *Bs3* vermittelte HR nicht durch die Coexpression des verkürzten *Bs3* beeinflusst wird, widerspricht dem nicht völlig, da nur die letzten 1,5 Tage beobachtet wurden. Vielleicht gibt es eine geringe Verzögerung der *Bs3*-vermittelten HR bei Coexpression mit dem verkürzten *Bs3*, die nicht auffällig genug war.

- c) Es herrscht Substratkonkurrenz zwischen dem WT-Bs3 und der verkürzten Variante, die ebenfalls alle charakteristischen Motive einer FMO besitzt. Es wäre denkbar, dass es zumindest das gleiche Substrat wie Bs3 binden kann, dieses aber nicht mehr oder deutlich langsamer umsetzt. Das unter b) beschriebene Ergebnis von Müglitz und Lahaye kann mit dieser Theorie ebenfalls erklärt werden.

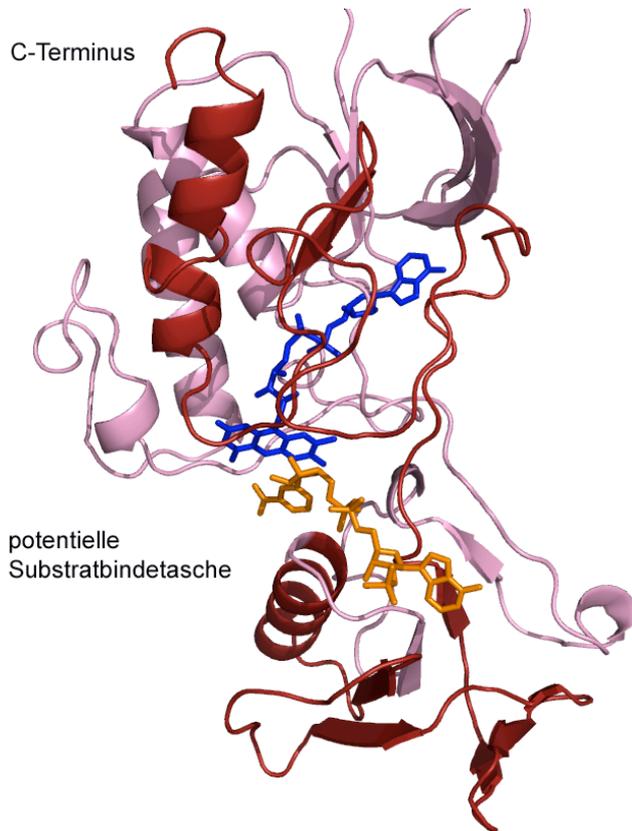


Abb. 4.1: Modell der 3D-Struktur des Bs3-Proteins mit den Cofaktoren NADP und FAD

Dargestellt ist die 3D Struktur von Bs3 (magenta und weinrot) mit den Cofaktoren FAD (blau) und NADP (orange). Dabei handelt es sich um eine Modellstruktur auf der Grundlage der Kristallstruktur einer bakteriellen FMO (rscb: 2VQ7)

Der weinrote Bereich fehlt in der verkürzten Bs3-Variante.

Der unstrukturierte N-Terminus fehlt in der gewählten Darstellung.

Abbildung modifiziert nach Jaenecke und Schornack, 2010, unveröffentlicht

S. Schornack hat ein Modell zur 3D-Struktur von Bs3 aufgrund der Kristallstruktur der bakteriellen FMO aus *Methylophaga* Stamm SK1 (GI: 185177625; rscb-Nr.:2VQ7) mit den gebundenen Cofaktoren FAD und NADP und dem Programm ‚Modeller‘ erstellt. In diesem 3D-Modell ist deutlich die 2-Domänenstruktur, die typisch für FMOs ist, zu erkennen. In einer *surface*-Darstellung (Anhang 7) lässt sich erkennen, dass die Substratbindetasche wahrscheinlich im markierten Bereich zwischen diesen beiden Domänen lokalisiert ist, da sonst kein Platz in der Nähe des potentiellen katalytischen Zentrums ist. Außerdem ist zu erkennen, dass bei Fehlen des weinrot gefärbten Bereiches, die dargestellte Struktur wahrscheinlich nicht ausgebildet werden kann, da dieser Teil des Proteins an der Ausbildung beider Domänen, speziell der drei Bindetaschen (FAD, NADP und potentielle Substratbindetasche) beteiligt ist. Die verkürzte Bs3-Variante wird, sofern dieses Modell annähernd der Realität entspricht, weder ein Substrat

binden noch es umsetzen können. Somit ist die These der Substratkonkurrenz zwischen dem WT-Bs3-Protein und der genannten verkürzten Bs3-Variante wahrscheinlich abzulehnen.

Von den drei betrachteten Erklärungsmöglichkeiten ist die Idee, dass Bs3 in oligomerer Form aktiv ist, aufgrund der bisher bekannten Daten am plausibelsten.

4.1.3 Die unvollständige Kinase und CaLRR-RLK sind wahrscheinlich negative Regulatoren der Bs3-vermittelten HR

Als Inhibitor der Bs3-vermittelten HR wurde in der Überexpressionssichtung eine unvollständige Kinase identifiziert (Abschnitt 3.1.5). Weil die unvollständige Kinase bei Coexpression mit konstitutiv exprimierten *Bs3* ebenfalls die Bs3-vermittelte HR verzögert, ist sie sehr wahrscheinlich nicht an der Aktivierung des *Bs3*-Promotors beteiligt (Abb. 3.8).

Für die Kinasedomäne, ohne Protonenakzeptor-Motiv, des SRF9 (SUB) aus *A. thaliana* ist nachgewiesen, dass sie keine Kinaseaktivität hat (Eyüboğlu *et al.*, 2007). Man könnte spekulieren, dass die unvollständige Kinase des Klons 9A4 ebenfalls inaktiv ist, da sie weder ein Motiv für einen Protonenakzeptor noch eine Nukleotidbindestelle besitzt. Von den zwölf Subdomänen einer Kinase sind nur die Subdomänen VIb bis XI sowie partiell die Subdomäne VIa in der Sequenz präsent. Eine solche inaktive Kinase kann ein Signal weiterleiten, nachdem sie durch eine andere Kinase phosphoryliert wurde (Kroiber *et al.*, 2001). Da die Kinase (9A4) unvollständig ist, fehlt eventuell das Erkennungsmotiv für diese zweite Kinase und dadurch kann keine HR mehr ausgelöst werden. Da wahrscheinlich noch ein Homologes in *N. benthamiana* bzw. das vollständige Protein in *C. annuum* existiert, wird die Bs3-vermittelte HR nicht völlig unterdrückt, sondern nur verzögert.

Man könnte auch spekulieren, dass die unvollständige Kinase als negativer Regulator der Signalkaskade zur Bs3-vermittelten HR wirkt, um diese Reaktion in ihrer Stärke einzudämmen. Durch die Überexpression wird dieser Effekt verstärkt und führt zu einer verzögerten Bs3-vermittelten HR.

Diese Spekulationen können ebenso auf CaLRR-RLK zutreffen, da dessen Kinasedomäne ebenfalls das Protonenakzeptor-Motiv fehlt. Allerdings sollte in CaLRR-RLK das Erkennungsmotiv für eine zweite Kinase vorhanden und somit eine Signalweiterleitung möglich sein. Dies schließt aus, dass die Signalweiterleitung aufgrund eines fehlenden Erkennungsmotivs für einen Reaktionspartner

unterbrochen wird. Somit ist es wahrscheinlicher, dass CaLRR-RLK und die unvollständige Kinase als negative Regulatoren des Signalweges zur Bs3-vermittelten HR wirken.

Homologe Proteine folgen oft dem gleichen Mechanismus, wenn sie die gleiche Funktion ausüben. Das Membranlokalisierte Paprika-Protein CaRLK1 wurde als negativer Regulator des programmierten Zelltodes durch die Akkumulation von Superoxid-Anionen beschrieben (Yi *et al.*, 2010). Allerdings sind CaRLK1 und CaLRR-RLK nur zu 20 % identisch, wobei sich diese Identität hauptsächlich in der Kinasedomäne findet. Ihre extrazellulären Domänen (ECD) unterscheiden sich. CaLRR-RLK besitzt in der ECD fünf imperfekte LRRs, während CaRLK1 trotz vieler Leucinreste keine typischen LRRs aufweist. Deswegen ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass diese beiden Proteine auf verschiedene Weise in Zelltodreaktionen involviert sind.

4.1.4 CaLRR-RLK ist nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR

Auch für das identifizierte Volllängen-Gen *CaLRR-RLK* konnte gezeigt werden, dass sein Gen-Produkt die Bs3-vermittelte HR verzögert, sowohl in *N. benthamiana* als auch in *C. annuum* (Abb. 3.12A und 3.13A). Silencing des *CaLRR-RLK*-Gens als Ursache für den beobachteten Effekt kann vermutlich ausgeschlossen werden, weil die Coinokulation mit der Mutante *CaLRR-RLK_{c.1delA}* keine Reduzierung oder zeitliche Verzögerung der HR zeigte (Abb. 3.12B). Die Mutante *CaLRR-RLK_{c.1delA}* bildet ein fast identisches Transkript, bei dem nur das A des Translationstarts deletiert ist. Wenn ab dem nächsten ATG translatiert wird, entsteht ein 21 Aminosäuren langes Peptid aus einem anderen Leseraster. Somit ist der beobachtete Effekt wahrscheinlich auf eine Überexpression von CaLRR-RLK zurückzuführen.

Interessant ist dabei, dass die CaLRR-RLK-Expression nicht durch die Inokulation mit AvrBs3 exprimierenden *Xanthomonas*-Stämmen induziert wird, sondern, dass es konstitutiv exprimiert wird (Abb. 3.15), was darauf hindeutet, dass das *CaLRR-RLK*-Gen nicht durch AvrBs3 induziert wird und daher nicht spezifisch für die Bs3-vermittelte HR sein könnte.

Ein weiterer Indiz ist, dass die Coexpression von *CaLRR-RLK* die Expression von *Bs3* nicht beeinträchtigt: Weder in Western-Blot-, noch in semiquantitativen RT-Analysen konnte ein Unterschied zur Coexpression von *Bs3* mit *GFP* festgestellt

werden (Abb. 3.7 und 3.16). Somit ist CaLRR-RLK nicht an den ersten Schritten der AvrBs3-Erkennung beteiligt.

Dass keine direkte Interaktion von Bs3 mit CaLRR-RLK nachweisbar war, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass CaLRR-RLK nicht am Anfang der Signalkaskade involviert ist. Allerdings zeigen beide Experimente nur ein unvollständiges Bild (Abb. 3.17). Die Co-Immunopräzipitation ist ein *in vitro*-Experiment. Es ist durchaus vorstellbar, dass in der Pflanzenzelle Bedingungen existieren unter denen eine direkte Interaktion zwischen Bs3 und CaLRR-RLK möglich ist. Bei dem gewählten Hefe-Dihybrid-Assay soll das membranlokalisierte CaLRR-RLK in den Zellkern transportiert werden. Es ist fraglich wie gut dieser Transport funktioniert und ob das membranlokalisierte Protein im Zellkern die gleiche Faltungsstruktur einnimmt wie in der Membran. Ein Split-Ubiquitin-Assay wäre die aussagekräftigere Alternative gewesen. Somit ist die Aussage, dass CaLRR-RLK und Bs3 nicht miteinander interagieren, zwar wahrscheinlich, aber durch weitere Experimente wie z. B. einen Split-YFP-Assay zu belegen.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass CaLRR-RLK unspezifisch in den Signalweg zur Bs3-vermittelten HR eingreift, ist die Tatsache, dass die Überexpression von *CaLRR-RLK* auch die Zelltodreaktionen von Rx und BAX deutlich verzögert, sowie die HR-Reaktionen von Bs4, AvrB und XopJ minimal verzögert (Abb. 3.18). Bs3 ist eine FMO (Römer *et al.*, 2007), Bs4 und Rx sind TIR- bzw. CC-NB-LRR-Proteine (Park und Paek, 2007), BAX ist ein Apoptose-Regulator der Bcl-2 Familie (Ganesan und Colombini, 2010) und AvrB wird von RPM1, ebenfalls ein CC-NB-LRR-Protein erkannt (Tammeling und Takken, 2008). Die pflanzlichen Proteine, die nach XopJ-Erkennung eine HR auslösen sind noch unbekannt. Somit scheint CaLRR-RLK ein negativer Regulator einer Apoptose-Signalkaskade zu sein, die von all diesen HR-Elicitoren genutzt wird.

4.1.5 Die Kinase-Domäne ist ausreichend für die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR

Das Protein CaLRR-RLK und die unvollständige Kinase (9A4) verhalten sich ähnlich. Beide verzögern die Bs3-vermittelte HR und greifen dabei vermutlich erst nach der Transkriptinduktion von *Bs3* in diesen Signalweg ein. Die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR ist für das Vollängen-Protein deutlicher ausgeprägt als für die unvollständige Kinase, weil für die unvollständige Kinase mehrfach Abweichungen

(Supprimierung oder keine Verzögerung der Bs3-vermittelten HR) beobachtet werden konnten (Abschnitt 3.1.5, Abb. 3.8 und 3.12). Diese Abweichungen gibt es bei dem vollständigen CaLRR-RLK nicht. Das deutet darauf hin, dass wahrscheinlich die Kinasedomäne alleine für die Verzögerung der Bs3-vermittelten HR ausreicht und der Rest des Proteins nur für die Regulierung dieser Aktivität notwendig ist. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Kinasedomäne nicht in der Lage ist, andere getestete HRs zu verzögern (Daten nicht gezeigt), während das Volllängen-Protein alle getesteten HRs (BAX, RX, Bs4, XopJ und AvrB; Abb. 3.18) beeinflusst.

4.1.6 Mögliche Funktionen des CaLRR-RLK-Proteins

LRR-RLKs sind im Pflanzenreich weit verbreitet und haben eine Vielzahl von Funktionen: Sie sind an der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organe beteiligt, können aber auch Hormone erkennen und somit Signale weiterleiten (Diévert und Clark, 2004). Außerdem sind einige LRR-RLKs, wie z. B. FLS2 aus *Arabidopsis* und Xa21 aus Reis an der Initiierung von Resistenzmechanismen durch die Erkennung von PAMPs bzw. Effektoren beteiligt (Diévert und Clark, 2004).

Aufgrund der Domänenstruktur der CaLRR-RLK ist zu vermuten, dass das Protein in die Familie der SRF(*STRUBBELIG-receptor like family*)-Proteine (Klasse V der LRR-RLKs) gehört (Abb. 3.9B und 3.11). Das Protein mit der höchsten Homologie außerhalb der *Solanaceae* ist das SRF3 aus *A. thaliana*. Mit diesem ist es zu 60 % identisch. Betrachtet man nur die SUB(*STRUBBELIG*)-Domäne und die Kinase-Domäne, sind SRF3 und CaLRR-RLK sogar zu 79,5 % identisch (siehe Abb. 4.2).

Die neun bekannten Mitglieder der SRF-Familie in *Arabidopsis* haben verschiedene Funktionen, so ist SRF9 an der Eizellenentwicklung beteiligt (Chevalier *et al.*, 2005), während SRF4 die Blattgröße reguliert (Eyüboğlu *et al.*, 2007). *SRF3*-Überexpression führt zu einem physiologisch veränderten Pollen und somit zu Sterilität im *Arabidopsis*-Kultivar *Landsberg erecta* (Eyüboğlu *et al.*, 2007). Somit könnte man vermuten, dass CaLRR-RLK und SRF3 eventuell an der Entwicklung des Pollens beteiligt sind und gleichzeitig in Resistenzmechanismen eingreifen (CaLRR-RLK: Abb. 3.18).

Allerdings ist eine solche Schlussfolgerung mit Vorsicht zu betrachten, da für SRF4 und SRF5, die zu 58 % identisch sind und einen eigenen Cluster bilden innerhalb der SRF-Familie, nachgewiesen wurde, dass eine Mutation in SRF4 nicht mit SRF5 komplementiert werden kann (Eyüboğlu *et al.*, 2007). Somit besteht zwar die

Möglichkeit, dass SRF3 und CaLRR-RLK eine vergleichbare Funktion besitzen, aber es ist ebenso möglich, dass sie völlig verschiedene Funktionen wahrnehmen.

Deswegen könnte man zuerst analysieren, wann und in welchem Gewebe *CaLRR-RLK* in Paprika exprimiert wird. Sollte das Expressionsmuster mit dem von SRF3 vergleichbar sein, dann könnte man z. B. in stabil transgenen SRF3- oder CaLRR-RLK-Arabidopsispflanzen diese Proteine überexprimieren und die Phänotypen, vor allem die Morphologie der Pollen, miteinander vergleichen. Man könnte auch T-DNA-Insertionslinien in SRF3 phänotypisch analysieren und testen, ob die Überexpression von CaLRR-RLK den Phänotyp komplementiert.

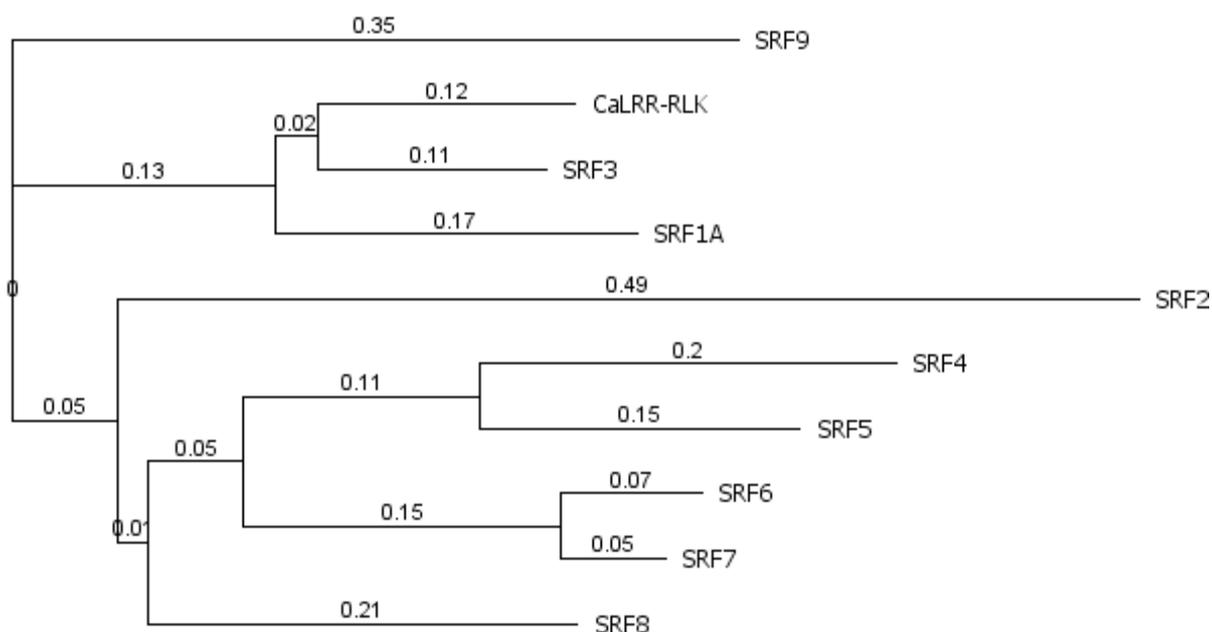


Abb. 4.2: Phylogenetischer Stammbaum der SRF-Proteinfamilie und CaLRR-RLK

Für das Alignment wurden nur die SUB- und Kinasedomäne genutzt. Der Stammbaum wurde mit Geneious erstellt, berechnet mit der Maximum likelihood Methode. Die Beschriftung der Äste gibt die Anzahl der Substitutionen pro Aminosäure an. Innerhalb der SRF-Familie ist SRF3 das Protein mit höchster Homologie zu CaLRR-RLK.

4.1.7 Maximal ein Siebentel des Paprikagenoms wurde analysiert

Um die Sättigung der durchgeführten Sichtung zur Identifizierung von Regulatoren der Bs3-vermittelten HR abschätzen zu können, muss zunächst bestimmt werden, wie viele Gene zum Zeitpunkt der Materialernte exprimiert waren. Anschließend muss man abschätzen wie viele verschiedene cDNAs tatsächlich analysiert wurden.

Das Tomatengenom umfasst in etwa 35.000 Gene (Van der Hoeven *et al.*, 2002). Aufgrund der hohen Syntänie zwischen Paprika- und Tomatengenom (Wu *et al.*, 2009) kann man davon ausgehen, dass auch in *C. annuum* etwa 30.000 bis 40.000 Gene vorhanden sind. Es ist zu bedenken, dass zum Zeitpunkt der Materialernte für

die cDNA-Bibliothek nicht alle Gene exprimiert sind, wie z. B. Gene für die Embryonalentwicklung.

Andere Gene haben dagegen verschiedene Splicing- Varianten, so dass aus einem Gen verschiedene mRNAs entstehen (Matlin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Wahrscheinlich kann man davon ausgehen, dass ca. 35.000 verschiedene mRNAs zum Zeitpunkt der Materialernte vorlagen.

Für die Sichtung wurden die Plasmide der cDNA-Bibliothek aus *E. coli* in *A. tumefaciens* mittels Konjugation transferiert (2.7.2). Für die drei verschiedenen Poolkonjugationen gilt, dass ein *E. coli*-Klon sein Plasmid an mehrere Agrobakterien weitergeben kann. Für den Pool 2 gilt, dass 4.000 *E. coli*-Klone eingesetzt wurden und insgesamt 16.000 Agrobakterien-Klone erhalten wurden (Tab. 2.3). Statistisch ist somit jeder *E. coli*-Klon viermal in der Agrobakterium-Bibliothek vertreten. Im ungünstigsten Fall enthalten die 950 analysierten Agrobakterium-Klone aus diesem Pool nur 280 (=950/4) verschiedene cDNAs. Analog lässt sich die Mindestanzahl der analysierten verschiedenen cDNAs für die anderen beiden Pools berechnen. Somit kommt man auf 3712 voneinander verschiedene analysierte cDNAs (Pool1 95, Pool2 280, Pool3 365, einzeln konjugiert 2972).

Allerdings wurde bei diesen Überlegungen nicht berücksichtigt, dass bereits die einzelnen *E. coli*-Klone die gleiche cDNA auf ihrem Plasmid tragen können, da 35.000 verschiedene cDNAs in 46×10^6 cfu der *E.coli*-Expressionsbibliothek vertreten sind. Hinzukommt, dass diese 35.000 cDNAs nicht gleich oft vertreten sein müssen. Zum einen ist der Normalisierungsprozess für eine solche Bibliothek nicht vollständig, d.h. die Transkriptmenge von abundanten Genen wird reduziert, aber für jedes verschieden stark. Somit kann das abundante Gen A genauso häufig vorkommen, wie jedes nicht abundante Gen, aber das abundante Gen B ist drei- oder auch sechsmal so oft vorhanden (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Services/Molecular-Biology-Services/Library-Construction/Normalized-Subtracted.html>).

Der Transfer von der *entry*-Bibliothek in den Expressionsvektor ist nicht für alle cDNA-Spezies gleich effizient, da die durchschnittliche Insertgröße in den beiden Bibliotheken von 1,70 kb (*entry*-Bibliothek) auf 1,68 kb (Expressionsbibliothek) gesunken ist und somit besonders lange cDNAs entweder verloren gegangen sind oder zumindest in reduzierter Anzahl vorliegen.

Außerdem gibt es Einschränkungen für die gepoolten Konjugationen: die *E. coli*-Klone wurden zwischenvermehrt und als Kolonien in die Konjugation eingesetzt. Da die *E. coli*-Kolonien verschieden groß waren, bedeutet dies, dass mit verschiedenen Bakterienzahlen gearbeitet wurde.

Ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Redundanz in den verschiedenen Pools verschieden hoch war, ist die Anzahl an sequenzierten Klonen je Pool: der Klon 9A4 wurde in der Gruppe der Einzelklon-Konjugation nur einmal gefunden, genauso wie der Klon 69F8 in dem Pool 3. Im Gegensatz dazu wurden in dem Pool 2 zehn sequenzidentische Klone identifiziert (37D1 bis 37D10). Dies deutet daraufhin, dass in den Einzelklonkonjugationen und im Pool 3 die Redundanz eher niedrig ist und wahrscheinlich 2972 bzw. 1520 verschiedene cDNAs analysiert wurden. Für den Pool 2 ist die Redundanz deutlich erhöht, da eine bestimmte cDNA zehnmal identifiziert wurde. Somit sind in den 950 analysierten Klonen dieses Pools eventuell nur 95 verschiedene cDNAs vertreten. Für den Pool 1 kann keine Aussage gemacht werden, da keiner der analysierten Klone sequenziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass höchstwahrscheinlich zwischen 4500 und 5000 verschiedene cDNAs analysiert wurden und somit fast ein Siebentel der zum Zeitpunkt der Materialernte exprimierten mRNAs des Paprikagenoms.

Um weitere Komponenten der Bs3-vermittelten Resistenzreaktion zu identifizieren, sollte die Sichtung fortgesetzt werden. Zukünftig sollte die Konjugation jedoch mit einzelnen *E. coli*-Klonen erfolgen und nicht in Pools, um die Redundanz zu senken.

4.2 Erzeugung und Isolation von Mutanten für Komponenten des Bs3-Signalweges

Ziel war es, Signalwegkomponenten zu identifizieren, die am Auslösen der Bs3-vermittelten HR beteiligt sind, durch die Isolation von Mutanten dieses Signalweges. Eine geeignete Methode ist eine konditionale Letalsichtung in transgenen *A. thaliana*, die induzierbar *Bs3* exprimieren.

4.2.1 Identifizierung von vier transgenen Linien, die für eine Mutagenese geeignet sind

Es wurden drei Konstrukte generiert, die die induzierbare Expression von *Bs3* bzw. *avrBs3* und *Bs3* oder *avrBs3* und *Luciferase* ermöglichen (Abb. 3.25, 3.26 bzw.

3.27). Mit diesen Konstrukten wurden jeweils 12 *A. thaliana* cv. Col-0 Pflanzen Agrobakterium-vermittelt transformiert. Die Transformationsraten lagen mit 0,1 % bis 0,5 % im erwarteten Bereich. So konnte Hofmann (2004) Transformationsraten zwischen 0,1 % und 1,0 % erreichen, während Clough und Bent (1998) zwischen 0,06 % und 1,8 % Transformanten unter ähnlichen Transformationsbedingungen erhielten.

Die Auswahl der für eine Mutagenese geeigneten transgenen Linien erfolgte zunächst nach der Analyse des Phänotyps (Induzierbarkeit von *Bs3* bzw. *Luciferase*) und anschließend nach der Bestimmung der Kopienzahl des Transgens (genau eine Kopie).

Es ist bekannt, dass ein Transgen transkriptionell in verschiedenem Ausmaß von der Pflanze in den nachfolgenden Generationen stillgelegt werden kann, abhängig davon, ob die Expression des Transgens den normalen Zellstoffwechsel behindert (Jorgensen *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 2004). Außerdem ist die Expressionsrate des Transgens abhängig vom Integrationsort des Transgens (Allshire *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2008).

Somit war davon auszugehen, dass viele Linien nicht dem erwarteten Phänotyp entsprechen bzw. diesen in späteren Generationen wieder verlieren würden. Erschwerend kommt hinzu, dass der Phänotyp in der T₁ nicht getestet werden konnte, da es sich zumindest für zwei der drei Konstrukte um eine konditional letale Sichtung handelt und somit die T₁-Pflanzen mit dem erwarteten Phänotyp (Zelltod nach Induktion) nicht mehr zur Verfügung stehen für die Generierung der nachfolgenden Generationen. Deswegen wurde mit vergleichsweise vielen T₁-Pflanzen weiter gearbeitet, um aus einer möglichst großen T₂-Population wählen zu können.

Die Anzahl der verwendbaren transgenen Arabidopsis-Linien reduzierte sich von der ersten zur zweiten Generation für das Konstrukt pER10.1-356* auf 17,8 %, während für die Konstrukte pER10-Bs3::GFP und pER10.2-356* noch 36 % bzw. 85,2 % der analysierten Linien den erwarteten Phänotyp zeigten (Tab. 3.2 und Tab.3.3). Für das Konstrukt pER10.1-356* wurde für sieben Linien die dritte Generation generiert, von denen keine den erwarteten Phänotyp (Tod nach Induktion) zeigte (Abschnitt 3.2.7). Die einzigen Komponenten, die konstitutiv exprimiert werden, sind der Transkriptionsfaktor *XVE* und das *NPTII*-Gen, die ebenfalls in den anderen beiden

Konstrukten vorliegen. Somit ist wahrscheinlich auszuschließen, dass das posttranskriptionelle Gen-Silencing des Transgens für das Konstrukt pER10.1-356* erhöht ist im Vergleich zu den anderen beiden Konstrukten.

Mehrere Kopien eines Transgens beeinflussen sich gegenseitig und können zu Silencing führen (Mittelsten Scheid *et al.*, 1991). Dies ist der Hauptgrund, die Kopienzahl des Transgens auf genau eine festzulegen. Hinzu kommen Probleme bei der Segregation einer Rückkreuzung mit einem anderen Kultivar, wenn mehrere unabhängige T-DNA-Insertionen vorliegen. Ein weiteres Problem ist die Sequenzierung des Transgens zum Nachweis, dass dieses fehlerfrei vorliegt. Bei mehreren Kopien kann in einer einfachen Sequenzierung nicht unterschieden werden, welche Kopie fehlerfrei ist und ob diese diejenige ist, welche exprimiert wird oder nur diejenige, welche den identifizierten Fehler trägt.

Die Kopienzahl des Transgens wurde zunächst mit einer Segregationsanalyse festgestellt und anschließend mit einer Southern Blot Analyse bestätigt, um auch die Linien mit mehreren Kopien, die nicht segregieren, identifizieren zu können. Für nicht segregierende mehrfache Kopien gibt es zwei Möglichkeiten: zum einen eine mehrfache Insertion in verschiedenen Loci in geringem Abstand zueinander, was sehr selten vorkommt. Und zum anderen eine tandem-Insertion an einem Locus, bei der sich mehrere T-DNAs bereits vor dem Integrationsereignis aneinander lagern (Tzfira *et al.*, 2004).

Dabei ist zu beachten, dass zwei Kopien des Transgens in Tandem-Anordnung zwei Fragmente mit dem Bereich, an dem die Sonde hybridisiert, ergeben, wenn das gewählte Restriktionsenzym einmal zwischen beiden Kopien schneidet. Schneidet das gewählte Restriktionsenzym dagegen nur am Rand, weil die beiden Kopien invers zueinander orientiert sind, ist auch in diesem Fall nur ein detektierbares Fragment zu erwarten. Dieses entspricht zweimal der Größe von der Restriktions-Schnittstelle bis zum Rand der T-DNA über den Bereich hinweg, an dem die gewählte Sonde hybridisiert (Abb. 4.3, De Neve *et al.*, 1997, De Buck *et al.*, 1999, Filipenko *et al.*, 2009).

Somit sollte für die sechs Linien (31, 50, 75, 80, 134 und K33; siehe Anhang 9 bzw. Abb. 3.29), bei denen nur eine Kopie nachweisbar war, aber die Größe des detektierten Fragmentes zwei Kopien in inverser Tandem-Anordnung entsprechen könnte, eine weitere Southern Blot Analyse durchgeführt werden, bei der das

gewählte Restriktionsenzym auf der anderen Seite des Hybridisierungsbereiches der Sonde schneidet (Vergleich Abb. 4.3). Bei den Linien 50 und 134, die beide pER10.1-356* transgen sind, ist dies nicht notwendig, da der erwartete Phänotyp (Zelltod nach Induktion) in der T₃ nicht zu beobachten war und diese Linien somit für einen mutagenese-basierten Ansatz nicht zu verwenden sind. Bei den Linien 75 und 80, die pER10-Bs3::GFP transgen sind, ist diese Frage nur dann von Belang, wenn für dieses Konstrukt weitere Linien für eine Mutagenese benötigt werden. Für die Linie 31 wurde der Integrationsort bestimmt. Die zum genannten Integrationspunkt nächstgelegenen *Xho*I-Schnittstellen befinden sich in einem Abstand von 2416 bp bzw. 3973 bp, addiert man das Fragment der T-DNA (rund 4,2 kb) hinzu, wird ein Fragment von 6,6 kb oder 8,2 kb erwartet. Dies deutet darauf hin, dass diese Linie ebenfalls nur eine Kopie des Transgens besitzt.

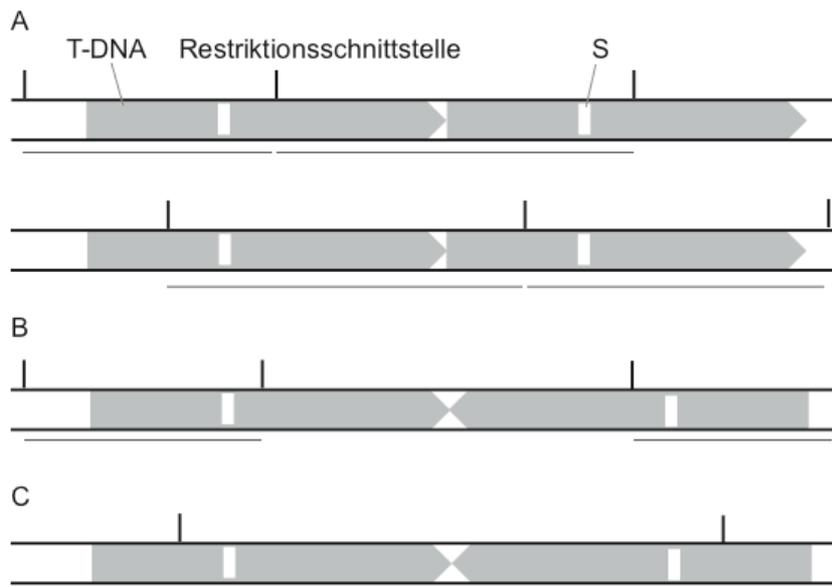


Abb. 4.3: Schematische Darstellung möglicher Tandem-Anordnungen zweier nicht-segregierender T-DNA-Kopien

A: in gleicher Orientierung, das Restriktionsenzym schneidet *up-* oder *downstream* des gewählten zur Sonde komplementären Bereichs, somit entstehen zwei Fragmente, die diesen Bereich beinhalten

B: in inverser Orientierung und das Restriktionsenzym schneidet innerhalb der beiden Bereiche, die komplementär zur Sonde sind. Somit entstehen zwei Fragmente, die detektiert werden können

C: in inverser Orientierung, das Restriktionsenzym schneidet am Rand, dadurch entsteht nur ein Fragment, an dem die Sonde hybridisieren kann.

S = Bereich an dem die Sonde hybridisiert; Abb. modifiziert nach De Buck *et al.*, 1999

Somit sind die Linien 31 und 77 für das Konstrukt pER10-Bs3::GFP und die Linien 35 und 103 für das Konstrukt pER10.2-356* für eine mutagenese-basierte Sichtung

geeignet. Für das Konstrukt pER10.1-356* konnte bisher keine für die mutagenesebasierte Sichtung geeignete Linie identifiziert werden. Für dieses Konstrukt sollten deswegen neue T₁-Linien generiert werden und diese bis zur T₃ weiter analysiert werden.

Da die Sichtung für das Konstrukt pER10.2-356* arbeitsaufwendiger ist, wurde zunächst mit der Linie 77 (pER10-Bs3::GFP) begonnen.

4.2.2 Einschätzung der Mutageneserate für die gewählte Linie 77

Die Linie 77 pER10-Bs3::GFP wurde ausgewählt, um die Sichtung nach Überlebenden nach Bs3-Induktion durchzuführen. Vorher wurde eine Einschätzung der Mutationsrate vorgenommen, da eine zu hohe Mutationsrate zu infertilen Pflanzen führt.

Für die Linie 77 wurden in der M₂ 0,53 ‰ weiße Sämlinge identifiziert, sowie 1,5 ‰ Pflanzen mit chlorotischen Blättern. Bereits bei Leyser und Furner (1992) wird beschrieben, dass für eine ausreichende Mutageneserate 0,5-3 ‰ der M₁-Pflanzen eine Chlorophyll-Defizienz segregierend an ihre Nachkommen vererben. Davon ausgehend, dass alle Pflanzen eines M₁-Pools etwa gleich viele Nachkommen produziert haben und somit alle M₁-Pflanzen eines Pools durch gleich viele Nachkommen in der M₂ repräsentiert werden, können nur 0,125-0,75 ‰ der M₂-Individuen diesen Phänotyp zeigen. Maple und Moller (2007) dagegen haben beschrieben, dass 2-10 ‰ der M₂-Pflanzen eine veränderte Pigmentierung aufweisen sollten.

Der in dieser Sichtung beobachtete Anteil an chlorotischen Pflanzen liegt zwischen diesen beiden Literaturangaben, daher ist davon auszugehen, dass eine ausreichende, aber nicht zu hohe Mutationsrate erzielt wurde.

4.2.3 Die Bs3-Mutante (p.E170G,M171V) kann keine Bs3-vermittelte HR auslösen

Bei einer Kandidatenpflanze (77-10-5) konnten zwei Mutationen im Bs3-Gen nachgewiesen werden, die Mutationen c.509A>G und c.511A>G, welche in den Aminosäuresubstitutionen p.Glu170Gly und p.Met171Val resultieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Bs3-Mutante keine HR mehr auslösen kann (Abb. 3.35). Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Befund in der Diplomarbeit von T. Strauß (2008), dass die Bs3-Mutante Nr. 92 mit den Mutationen c.21T>C, c.509A>G und

c.511A>T, die in den Aminosäureaustauschen p.Phe 7 (stumme Mutation), p.Glu170Gly und p.Met171Leu resultieren, ebenfalls keine HR mehr auslösen kann. Höchstwahrscheinlich ist die Mutation c.509A>G für diesen Funktionsverlust verantwortlich, da eine weitere *Bs3*-Mutante (Nr. 148) im Rahmen oben genannter Diplomarbeit identifiziert wurde, die ebenfalls die Mutation p.Met171Val (c.511A>G) ausbildet, aber trotzdem eine HR in *N. benthamiana* auslöst.

Alle anderen 231 potentiellen Kandidaten, die sowohl *Bs3::GFP* exprimierten, als auch keine Mutation im *Bs3*-Gen tragen, müssen eine ‚second site‘-Mutation außerhalb des Transgens haben, die für das Überleben des Kandidaten nach der Induktion verantwortlich ist.

4.2.4 Vergleichende Betrachtung der Mutationshäufigkeit im *R*-Gen

Überraschend ist, dass nur ein Kandidat mit Mutationen im *Bs3*-Gen identifiziert werden konnte. Tornero (2002) hat ebenfalls eine konditional letale Sichtung durchgeführt. Er konnte 95 verschiedene *rpm1* Allele identifizieren, die nicht mehr funktional waren, sowie 15 weitere Mutationen in fünf anderen Loci. Dies entspricht einer Häufigkeit von 86,3 % Mutationen im *R*-Gen. Ebenso konnten Torp und Jorgensen 1986 mehr als 20 *m1a12* Allele und nur 3 Mutationen an zwei anderen Loci identifizieren – dies entspricht einer Häufigkeit von mehr als 86,9 % Mutationen im *R*-Gen. Selbst wenn in jeder der 21 nicht sequenzierten Kandidatenpflanzen eine nicht-funktionale *Bs3*-Mutation vorläge, ist die Häufigkeit einer Mutation im *R*-Gen in dieser Sichtung deutlich geringer (<8,7 %).

Eine mögliche Ursache ist die Länge des *R*-Gens: der ORF von *Bs3* ist 1029 bp lang, der von *Rpm1* dagegen 2778 bp (also 2,7mal so lang) und der ORF von *M1a12* 2883 bp (also 2,8mal so lang). Rein statistisch würde man somit bei vergleichbaren Mutationsraten etwa 1/3 an Mutationen im *R*-Gen *Bs3* erwarten wie in *Rpm1* oder *M1a12*.

Weitere Erklärungen sind, dass in den genannten Beispielen das *R*-Gen nicht Teil des Transgens ist, sondern endogen in Arabidopsis bzw. Gerste vorkommt und andere induzierbare Systeme für die Expression des *avr*-Gens genutzt wurden.

In einem endogen vorkommenden mutiertem *R*-Gen kann *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) stattfinden und somit werden kaum verkürzte R-Proteine synthetisiert, die vielleicht zumindest partiell funktional sind. In der hier beschriebenen Sichtung wurde das *R*-Gen *Bs3* nicht nur als Transgen eingeführt,

sondern auch als cDNA, d. h. es besitzt keine Introns und somit kann kein NMD stattfinden (Hori und Watanabe, 2007; Filichkin *et al.*, 2010). Somit ist die Wahrscheinlichkeit für einen sichtbaren Effekt durch das fehlende R-Protein geringer. Tornero (2002) argumentiert außerdem, dass ein DEX-induzierbares System einem Estradiol-induzierbaren vorzuziehen sei, weil DEX sich aufgrund seiner Membrangängigkeit systemisch in der Pflanze verbreitet und somit nur starke *loss-of-function* Mutationen identifizierbar sind, während Estradiol sich nicht systemisch in der Pflanze verbreitet und somit schwache und intermediäre Phänotypen ebenfalls überleben könnten. Dies kann man aber auch als Vorteil betrachten, da in einer abgeschwächten Sichtung mehrere verschiedene Kandidaten zu erwarten sind, während in einer Sichtung, die nur auf starke *loss-of-function* Mutationen aus ist, durchaus nur wenige Kandidaten-Loci identifiziert werden können.

Außerdem würde Torneros (2002) Aussage bedeuten, dass Mutationen, die zu einer verzögerten Zelltodreaktion führen, in dieser Sichtung überleben, weil nach Abbau des Estradiols kein Bs3 mehr nachsynthetisiert wird bzw. dieses vielleicht nur in den Wurzeln induziert wurde. Dagegen spricht, dass nur bei einem Kandidaten im Retest (6 Wochen alte Pflanzen wurden erneut induziert, Abschnitt 3.3.2) ein Absterben einzelner Gewebeabschnitte beobachtet werden konnte.

4.2.5 Ausblick zur Identifizierung der Arabidopsismutationen, die den Bs3-vermittelten Zelltod verhindern

Um in den potentiellen Kandidatenlinien die *second-site* Mutation zu identifizieren, die für das Überleben der Kandidatenpflanze verantwortlich ist, bieten sich zwei Experimente an: Zum einen sollten durch Kreuzen einzelner Kandidatenlinien Kopplungsgruppen aufgestellt werden. Da bei den Mitgliedern einer Kopplungsgruppe zwar verschiedene Mutationen vorliegen können, aber diese sich im gleichen Locus befinden, lässt sich somit die Anzahl der zu analysierenden Kandidatenlinien reduzieren. Zum anderen sollten die Kandidatenlinien mit einem nicht-transgenen anderen Arabidopsiskultivar, wie z. B. *Landsberg erecta* gekreuzt werden, um durch Markeranalysen und korrelierende Phänotypen in der F₂ den verantwortlichen mutierten Locus zu identifizieren. Es empfiehlt sich mit den 18 Kandidaten zu beginnen, die vertrauenswürdiger sind als die anderen, da bei diesen eine weiter verbreitete GFP-Fluoreszenz beobachtet wurde (Anhang 12).

5 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E., & Martin, G. B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2851-2856.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. *San Diego: Elsevier Academic Press*.
- Allshire, R. C., Javerzat, J. P., Redhead, N. J., & Cranston, G. (1994). Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell*, 76(1), 157-169.
- Antony, G., Yang, B., & White, F. F. (2009). The alternate major effector AvrXa7 in bacterial blight of rice evades host resistance by targeting an alternate major host susceptibility gene. *Phytopathology*, 99(6), S5-S5.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., & Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 295(5562), 2073-2076.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., & Shirasu, K. (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J.*, 25(9), 2007-2016.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T., & Bonas, U. (2001). Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14(5), 629-638.
- Bechtold, N., Ellis, J., & Pelletier, G. (1993). In-planta *Agrobacterium*-mediated gene-transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 316(10), 1194-1199.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., & Baulcombe, D. C. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, 11(5), 781-791.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., & Baulcombe, D. C. (2000). *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.*, 21(1), 73-81.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA-binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 1178811.
- Bonas, U., Stall, R. E., & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, 218(1), 127-136.
- Bonas, U., Conradsstrauch, J., & Balbo, I. (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific Avirulence Gene AvrBs3. *Mol. Gen. Genet.*, 238(1-2), 261-269.

- Boyer, H. W., & Roulland-Dussoix. (1969). A complementation analysis of restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 41(3), 459-&.
- Brandstädter, J., Rossbach, C., & Theres, K. (1994). The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta*, 192(1), 69-74.
- Breathnach, R., & Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes- coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 349-383.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(2), 193-200.
- Chandler, J. W. (2009). Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays*, 31(1), 60-70.
- Chevalier, D., Batoux, M., Fulton, L., Pfister, K., Yadav, R. K., Schellenberg, M., & Schneitz, K. (2005). STRUBBELIG defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 9074-9079.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The 2-hybrid system - a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9578-9582.
- Choi, H. W., Lee, D. H., & Hwang, B. K. (2009). The pepper calmodulin gene *CaCaM1* is involved in reactive oxygen species and nitric oxide generation required for cell death and the defense response. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22(11), 1389-1400.
- Chu, Z. H., Yuan, M., Yao, L. L., Ge, X. J., Yuan, B., Xu, C. G., Li, X. H., Fu, B. Y., Li, Z. K., Bennetzen, J. L., Zhang, Q. F., & Wang, S. P. (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev*, 20(10), 1250-1255.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16(6), 735-743.
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., & Depicker, A. (1999). The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J.*, 20(3), 295-304.
- den Dunnen, J. T., & Antonarakis, E. (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human Genetics*, 109(1), 121-124.
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., & Depicker, A. (1997). T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J.*, 11(1), 15-29.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, L., Genin, S., & Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 8024-8029.
- Diévar, A., & Clark, S. E. (2004). LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131(2), 251-261.

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., & Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-Negative bacteria - construction of a gene bank of *Rhizobium-melliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77(12), 7347-7351.
- Dixon, R. A., & Harrison, M. J. (1990). Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. genet.*, 28, 165-234.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B., & Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8888-8893.
- Doidge, E. (1921). A tomato canker. *Ann. Appl. Biol.*, 7, 407-430.
- Dye, D. (1978). Genus IX. *Xanthomonas*. In M. Young & D. Dye & F. Bradbury & C. Panagopoulos & C. Robbs (Eds.), *A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria* (pp. 153-177): Dowson 1939.
- Eyüboğlu, B., Pfister, K., Haberer, G., Chevalier, D., Fuchs, A., Mayer, K. F. X., & Schneitz, K. (2007). Molecular characterisation of the STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY of genes encoding putative leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Plant Biology*, 7.
- Figuerski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid Rk2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1648-1652.
- Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R. K., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W. K., & Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, 20(1), 45-58.
- Filipenko, E. A., Deineko, E. V., & Shumnyi, V. K. (2009). Specific features of T-DNA insertion regions in transgenic plants. *Russian Journal of Genetics*, 45(11), 1289-1301.
- Flor, H. H. (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. genet.*, 8, 29-54.
- Gabriel, D. W., & Rolfe, B. G. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28, 365-391.
- Gabriels, S., Vossen, J. H., Ekengren, S. K., van Ooijen, G., Abd-El-Haliem, A. M., van den Berg, G. C. M., Rainey, D. Y., Martin, G. B., Takken, F. L. W., de Wit, P., & Joosten, M. (2007). An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. *Plant J.*, 50(1), 14-28.
- Ganesan, V., & Colombini, M. (2010). Regulation of ceramide channels by Bcl-2 family proteins. *Febs Letters*, 584(10), 2128-2134.
- Gardner, M., & Kendrick, J. (1921). Bacterial spot of tomato. *J. Agr. Res.*, 21, 123-156.

- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., & Adam, S. A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology*, 14(9), 505-514.
- Gopalan, S., Bauer, D. W., Alfano, J. R., Loniello, A. O., He, S. Y., & Collmer, A. (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell*, 8(7), 1095-1105.
- Gu, K. Y., Yang, B., Tian, D. S., Wu, L. F., Wang, D. J., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z. Q., Wang, G. L., White, F. F., & Yin, Z. C. (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435(7045), 1122-1125.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., & Alfano, J. R. (2009). The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22(9), 1069-1080.
- Gürlebeck, D., Szurek, B., & Bonas, U. (2005). Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.*, 42(2), 175-187.
- Hanna, J., Leggett, D. S., & Finley, D. (2003). Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol. Cell. Biol.*, 23(24), 9251-9261.
- He, P., Shan, L., & Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.*, 9, 1385-1396.
- He, S. Y., Nomura, K., & Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 181-206.
- Herbers, K., Conradsstrauch, J., & Bonas, U. (1992). Race-specificity of plant-resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature*, 356(6365), 172-174.
- Hofmann, I. (2004). Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation: Institut für Genetik. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Hopkins, C. M., White, F. F., Choi, S. H., Guo, A., & Leach, J. E. (1992). Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5(6), 451-459.
- Hori, K., & Watanabe, Y. (2007). Context analysis of termination codons in mRNA that are recognized by plant NMD. *Plant and Cell Physiology*, 48(7), 1072-1078.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 62(2), 379-+.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). transformation of intact yeast-cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153(1), 163-168.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., & Stebbins, C. E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science*, 311(5758), 222-226.

- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., & Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, *21*(11), 947-962.
- Jin, L. Y., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., & Rape, M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, *133*(4), 653-665.
- Jones, J. D. G. (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *4*, 281-287.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*, 323-329.
- Jordan, T. (2005). Genetische und physikalische Limitierung des *Bs3* Resistenzgen-Locus in *Capsicum annuum*. Dissertation: Institut für Genetik. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q. D., & Napoli, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.*, *31*(5), 957-973.
- Joubes, J., De Schutter, K., Verkest, A., Inze, D., & De Veylder, L. (2004). Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J.*, *37*(6), 889-896.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Guerois, R. (2010). NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem. Sci.*, *35*(4), 199-207.
- Karimi, M., Inze, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, *7*(5), 193-195.
- Kay, S., Boch, J., & Bonas, U. (2005). Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *18*(8), 838-848.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, *318*, 648-651.
- Kay, S., & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.*, *12*(1), 37-43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R., & Bonas, U. (2009). Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 Delta rep16. *Plant J.*, *59*(6), 859-871.
- Kim. (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Kim, E., Goren, A., & Ast, G. (2008). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays*, *30*(1), 38-47.
- Klement, Z. (1963). Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonads*. *Nature*, *199*(489), 299-&.

- Knoop, V., Staskawicz, B., & Bonas, U. (1991). Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* Is Not under the Control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.*, 173(22), 7142-7150.
- Kroiher, M., Miller, M. A., & Steele, R. E. (2001). Deceiving appearances: signaling by "dead" and "fractured" receptor protein-tyrosine kinases. *Bio Essays*, 23, 69-76.
- Lam, B. C. H., & Blumwald, E. (2002). Domains as functional building blocks of plant proteins. *Trends Plant Sci.*, 7(12), 544-549.
- Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411(6839), 848-853.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C., Koh, N. H., Seo, J. S., & Go, S. J. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucl. Acids Res.*, 33(2), 577-586.
- Leyser, H. M. O., & Furner, I. J. (1992). Characterization of 3 shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 116(2), 397-&.
- Liu, Y. L., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.*, 31(6), 777-786.
- Livaja, M., Zeidler, D., von Rad, U., & Durner, J. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology*, 213(3-4), 161-171.
- Maple, J., & Moller, S. G. (2007). Mutagenesis in *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol*, 362.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., & Faure, J. D. (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, 56(1), 169-179.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15(7), 637-646.
- Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. J. (2005). Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6(5), 386-398.
- Mettraux, J. P., Jackson, R. W., Schnettler, E., & Goldbach, R. W. (2009). Plant pathogens as suppressors of host defense. *Plant Innate Immunity*, 51, 39-89.
- Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J., & Potrykus, I. (1991). Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 228(1-2), 104-112.
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), 1501-1501.
- Mühlhardt, C. (2006). Herstellen kompetenter Zellen und Transformation, *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* (5. Auflage, pp. 150-156): Spektrum Akademischer Verlag.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-&.

- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., & Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci. Bioeng.*, *104*(1), 34-41.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.*, *198*, 249-266.
- Nürnberger, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.*, *6*(3), 335-345.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J. L., Boles, E., Andre, B., & Frommer, W. B. (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(33), 12242-12247.
- Ochman, H., Gerber, A. S., & Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse Polymerase Chain-Reaction. *Genetics*, *120*(3), 621-623.
- Oparka, K. J. (1994). Plasmolysis - new insights into an old process. *New Phytol.*, *126*(4), 571-591.
- Page, D. R., & Grossniklaus, L. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.*, *3*(2), 124-136.
- Park, J. M., & Paek, K. H. (2007). Recognition and response in plant-pathogen interactions. *J. Plant Biol.*, *50*(2), 132-138.
- Pokalsky, A. R., Hiatt, W. R., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C. M., & Shewmaker, C. K. (1989). Structure and expression of elongation factor 1 α in tomato. *Nucl. Acids Res.*, *17*, 4661-4673.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., & Lahaye, T. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*, *318*(5850), 645-648.
- Römer, P., Recht, S., & Lahaye, T. (2009a). A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20526-20531.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U., & Lahaye, T. (2009b). Recognition of AvrBs3-Like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper *Bs3* alleles. *Plant Physiol.*, *150*(4), 1697-1712.
- Römer, P., Recht, S., Strauß, T., Elsaesser, J., Schornack, S., Boch, J., Wang, S., & Lahaye, T. (2010). Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol.*, 9999(9999).
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, *230*(4732), 1350-1354.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2. Auflage ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Schlaich, N. L. (2007). Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends Plant Sci.*, 12, 412-418.
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Ganai, M., Baker, B., Bonas, U., & Lahaye, T. (2004). The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J.*, 37(1), 46-60.
- Schornack, S. (2006). Struktur, Erkennungsspezifität und Regulationsmechanismus des Resistenzproteins Bs4 aus Tomate. Dissertation: Institut für Genetik. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., & Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.*, 163(3), 256-272.
- Schornack, S., Fuchs, R., Huitema, E., Rothbauer, U., Lipka, V., & Kamoun, S. (2009). Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody. *Plant J.*, 60(4), 744-754.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., & Schmidt, R. (2004). Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell*, 16, 2561-2572.
- Schwessinger, B., & Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11(4), 389-395.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., & van der Hoorn, R. A. L. (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related Cys proteases of tomato. *Plant Cell*, 20(4), 1169-1183.
- Shang, F., Deng, G., Liu, Q., Guo, W., Haas, A. L., Crosas, B., Finley, D., & Taylor, A. (2005). Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J. Biol. Chem.*, 280(21), 20365-20374.
- Shen, Q. H., & Schulze-Lefert, P. (2007). Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *EMBO J.*, 26, 4293-4301.
- Shirasu, K. (2009). The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 139-164.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98(3), 503-&.
- Strauß, A. (2010). Identifizierung und funktionale Charakterisierung von Komponenten der Bs4-vermittelten Resistenz. Dissertation: Institut für Genetik. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

- Strauß, T. (2008). Mutationsanalyse des Resistenzgens *Bs3* aus Paprika. Diplomarbeit: Institut für Biochemie. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Swings, J., L., V., & Kersters, K. (1993). The bacterium *Xanthomonas*. In J. Swings & E. Civerolo (Eds.), *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall.
- Szczesny, R. (2009). Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation: Institut für Genetik. M.-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., & Van den Ackerveken, G. (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, 26(5), 523-534.
- Takken, F. L. W., & Tameling, W. I. L. (2009). To nibble at plant resistance proteins. *Science*, 324(5928), 744-746.
- Tameling, W. I. L., & Takken, F. L. W. (2008). Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121(3), 243-255.
- Töpfer, R., Gronenborn, B., Schell, J., & Steinbiss, H. H. (1989). Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant Cell*, 1(1), 133-139.
- Tornero, P., Chao, R. A., Luthin, W. N., Goff, S. A., & Dangl, J. L. (2002). Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell*, 14(2), 435-450.
- Torp, J., & Jorgensen, J. H. (1986). Modification of barley powdery mildew resistance gene *Ml-a12* by induced mutation. *Can. J. Gen. Cytol.*, 28(5), 725-731.
- Tzfira, T., Li, J. X., Lacroix, B., & Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.*, 20(8), 375-383.
- Underwood, W., Zhang, S. Q., & He, S. Y. (2007). The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 52, 658-672.
- Valverde, R., Edwards, L., & Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *Febs Journal*, 275(11), 2712-2726.
- van den Ackerveken, G., Marois, E., & Bonas, U. (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, 87(7), 1307-1316.
- van der Biezen, E. A., & Jones, J. D. G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.*, 23(12), 454-456.
- van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G., & Tanksley, S. (2002). Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*, 14(7), 1441-1456.
- van der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20(8), 2009-2017.

- van Doorn, W. G., & Woltering, E. J. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.*, 10(3), 117-122.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Vandenberghe, S., Zaenen, I., Schilper, R., & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252(5479), 169-170.
- Wan, J., Zhang, X.-C., & Stacey, G. (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal Behav*, 3(10), 831-833.
- Wendehenne, D., Durner, J., & Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(4), 449-455.
- White, F. F., Potnis, N., Jones, J. B., & Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.*, 10(6), 749-766.
- White, F. F., & Yang, B. (2009). Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiol.*, 150(4), 1677-1686.
- Williams, A., Harker, N., Ktistaki, E., Veiga-Fernandes, H., Roderick, K., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., & Kioussis, D. (2008). Position effect variegation and imprinting of transgenes in lymphocytes. *Nucl. Acids Res.*, 36(7), 2320-2329.
- Wu, F. N., Eannetta, N. T., Xu, Y. M., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M. M., & Tanksley, S. D. (2009). A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.*, 118(7), 1279-1293.
- Wu, X. M., Li, Y. R., Zou, L. F., & Chen, G. Y. (2007). Gene-for-gene relationships between rice and diverse avrBs3/pthA avirulence genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, 56(1), 26-34.
- Yang, B., Zhu, W. G., Johnson, L. B., & White, F. F. (2000). The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9807-9812.
- Yang, B., Sugio, A., & White, F. F. (2006). *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10503-10508.
- Yang, H. J., Yang, S. H., Li, Y. Q., & Hua, J. (2007). The *Arabidopsis* *BAP1* and *BAP2* genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol.*, 145(1), 135-146.
- Yeast protocols handbook*. (2008). PT3024-1: Clontech Laboratories, Inc.
- Yi, S. Y., Lee, D. J., Yeom, S.-I., Yoon, J., Kim, Y.-H., Kwon, S.-Y., Choi, D. (2010). A novel pepper (*Capsicum annuum*) receptor-like kinase functions as a negative regulator of plant cell death via accumulation of superoxide anions. *New Phytologist*, 185(3), 701-715
- Yuan, M., Chu, Z. H., Li, X. H., Xu, C. G., & Wang, S. P. (2009). Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor in race-specific bacterial resistance conferred by a recessive R gene *xa13* in rice. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), 947-955.

- Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., Moser, C., & Velasco, R. (2009). Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *Bmc Genomics*, 10.
- Zhou, J. M., & Chai, J. (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11(2), 179-185.
- Zhu, B., Cai, G., Hall, E. O., & Freeman, G. J. (2007). In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *Biotechniques*, 43(3), 354-359.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12(4), 414-420.
- Zuo, J. R., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.*, 24(2), 265-273.

Anhang

Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Zweck	Sequenz 5'--> 3'
360bp-Pme-Swa-pK7	Amplifikation eines Fragmentes mit dem Bs3-Promoter	GGGGGTTTAAACATTTAAATCATAGTCAAGCTAACGAAACTTATGC
765 fwd	Silencing Fragment 1 (KH - containing protein)	CACCATGGCGGAQAGAAACCACACAGTTCCGGC
765_minusOrient_forw	Amplifizierung des KH-domain containing proteins in negativer Orientierung	CACCTCACCTGGAGGCAAGTGTCAAAGGAATC
765_minusOrient_rev	Amplifizierung des KH-domain containing proteins in negativer Orientierung	ATGGCGGAQAGAAACCACACAGTTCGGC
765rew	Silencing Fragment 1 (KH - containing protein)	TCACCTGGAGGCAAGTGC AAAAGGAATC
9A4 GR forw	Amplifikation von 9A4 in RT-PCR	GGGGATCGATATGGCTCTTGGAGCTGCAAGAGC
9A4 GR rev	Amplifikation von 9A4 in RT-PCR	GGGGGTCGACTTCTTCATCGGATCTACTGGGAG
9A4walking1	BAC 129M24 sequenzieren	CATCTTCATCATCAGATGTTTCC
9A4walking2	BAC 129M24 sequenzieren	CATGCTTTGTGCATTTGCCGGG
act2forw	At actin2 als PCR Kontrolle, über letzte Intron hinweg!	GACTACGAGCAGGAGATGGAAAACC
act2rew	At actin2 als PCR Kontrolle, über letzte Intron hinweg!	CTGGACCTGCCTCATCATACTCGG
avrBs3_correct_fwd	Korrektur von pENTR-356*	Pho-GCGATCTAGGAGCGATCGTGCAGTGACCCGGT
avrBs3_correct_rev	Korrektur von pENTR-356*	Pho-TTTTCGAGATGACGCTCGTGTGGTCTCCCTTC
BAPentry-fwd	nur ORF aus pUNI für BAP1	CACCATGATATAATTTTGGTAGATC
BAPentry-rev	nur ORF aus pUNI für BAP1	TTAAAATTGGCGTTGATACAGAC
BONI entry fwd	nur ORF aus pUNI fürBONI	CACCATGGGAAATGTTGCTCCGAT
BONI entry rev	nur ORF aus pUNI fürBONI	TCA TGGAGGAATCGGTTTCA TATTAC
Bs3A forw	Bs3 ab ATG mit der Schnittstelle <i>AseI</i>	GGGGGGCGGCCCATGATGAATCAGAAATTGCTTTAAATTC
Bs3C rev	Bs3 mit den Schnittstellen <i>SacI</i> , <i>NheI</i> , ORF Ende Bs3	GGGGGAGCTCGCTAGCCATTTGTTCTTTCCAAAATTTTGG
Ca-Elo-A02	Elongationsfaktor 1 α , ca1, 1.kb (R. Szeszesny)	TCTATAAGCTTGGCGGTATTGACAAGCGGTG
Ca-Elo-B02	Elongationsfaktor 1 α , ca1, 1.kb (R. Szeszesny)	CTTGTGGGAAATCATCTTTAAACCATGCCAGCA
CaLRRAsc_forw	CaLRR-RLK-Gen mit der <i>AseI</i> -Schnittstelle	GGCGCGCCCAATGGGTTGGAAGAGATCTG
CaLRRHind_rev	CaLRR-RLK-Gen mit der <i>HindIII</i> -Schnittstelle	GAAGCTTTTATCTTCATCGGATCTAC
CaLRR-RLK forw	Generierung eines entry- Vektors für CaLRR-RLK	CACCATGGGTTGGAAGAGATCTG
CaminusOrient_forw	CaLRR-RLK-Gen in negativer Orientierung	CACCTTATCTTTCATCGGATCTACTGGG
dsred forw3	DsRed mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle aus pYM35	GGGGCTAGAGTCGACGGATCCGGAGCAGG
dsred rev	DsRed mit <i>SacI</i> Schnittstelle aus pYM35	GGGGAGCTCCACGTCGTACAGGAACAGGTGGTGG
entry765si_forw	Silencing Fragment 2 (KH - containing protein)	CACCAAGCCCTAATCCTAGTTACC
entry765si_rev	Silencing Fragment 2 (KH - containing protein)	TTAACTCTGAGGTGATGCTTTTGC

Name	Zweck	Sequenz 5'--> 3'
Entry9A4forw	entry-Vektor für den Bibliotheksklon 9A4	CACCATGGCTCTTGGAGCTGCAAGAGC
entry9A4rew	entry-Vektor für den Bibliotheksklon 9A4 und CaLRR-RLK	TTCTTCATCGGATCTACTGGGAG
entryCamut rew	CaLRR-RLK delA vom ATG, nur Vektorsequenz	GGTGAAGGGGGCGGCCGCG
entryCamut_forw	CaLRR-RLK delA vom ATG	TGGGTTGGAAGAGATCTGTATTATG
finalentry 01-fwd	Bs3 zur Generierung eines entry-Vektors (P.Römer)	CACCATGATGAATCAGAAATTGCTTTAAATTCTTGTTT
forw SOE GFP	GFP für die Fusion mit Bs3	TTTGAAAAGAACAATAATGATGGTGAAGCAAGGGCGGAG
GFP NheI rew	GFP mit <i>NheI</i> Schnittstelle	GGGGCTAGCTTACTTTGTACAGCTCGTCCAATGCC
GFP rew	GFP für die Fusion mit Bs3 mit <i>AclI</i> Schnittstelle	GGGGGGCGCGCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAATGCC
GFP-T forw	GFP mit <i>NheI</i> Schnittstelle	GGGGGCTAGCATGGTGAAGCAAGGGCGGAGGAGC
LB i-rew1	iPCR	ATGCATTGAACTTGACGAAACG
LB1	Insertionspunkt bestimmen Spez1	GCGTTACCCAACTTAATCGCCCTTGC
LB2	Insertionspunkt bestimmen Spez2	AGCCTGAATGGCGGGTACCAGC
MAH20forw1	Kontrolle Insertionsort Linie 103	TGAGAGAGAGAGAGAGAGATAGGG
MAH20rew1	Kontrolle Insertionsort Linie 103	TGAAATGGAAAAGAGAGAAAAGG
pCP60Kas-Dral-forw	35S DsredTer- Amplifikation aus pCP60-dsred	GGGGTTAAAAGAGCGGATAAACAATTTACACACAGG
pCP60Kas-Dral-rew	35S DsredTer- Amplifikation aus pCP60-dsred	GGGGTTAAAAGCGGATAAAGTTGGTTAACGCCA
pK7FWG2-35S_fwd	Sequenzierung des Bibliotheksklones vom 5'	CATTTCATTTGGAGAGGACTGCAGGACG
pK7FWG2-GFP-R	Sequenzierung des Bibliotheksklones vom 3'	GACACGCTGAACCTTGTGGCCGTTTACG
pK7ins rew Sac-PmeI	Amplifikation eines Fragmentes pK7mod	GGGGAGCTCGTTTAAAACCAACCGTAAAACCGGCTTGTCC
Prom-Xba-Pme-360 bp	Xbal-PmeI-360bpPromoter Bs3	GGGGTCTAGAGTTTAAACTCATAGTCAAGCTAACGAAACTTATGC
RB i-rew2	iPCR	AAAGCTGGGAGGCCCTGGATCG
rekombGFP fwd	Rekombination von 35SGFPT in Swal von pCDNAT	CACTGATAGTTTAAAATTTAAAATAGGGTTTCCCAGTCACGACG
rekombGFPrew	Rekombination von 35SGFPT in Swal von pCDNAT	GTTAGCTTGACTATGATTTAAAATAGCCCTGCAGGTCAACATGG
rekombpCDNAT forw	Rekombination von P... in pER10	AAACACTGATAGTTTAAAATTTAAAATCATACTCAAGCTAACGAAACTTATGC
rekombpCDNAT rew	Rekombination von P... in pER10	TATGC
S GFP rew	Amplifikation von GFP mit <i>SacI</i> Schnittstelle	TCCCGCCTCAGTTTAAACAAACGTAACCGGCTTGTCC
Screen9A4_forw1	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	GAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAATGC
screen9A4_forw2	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	TAAACAGGCAGAATGTCAATATGACC
Screen9A4_rew1	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	TAAACGTTGTCCGAGTTGATGGC
screen9A4forw3	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	TTATTCATCATCGGATCTACTGGG
screen9A4rew3	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	TAGCTTCACTGATAICATCAGGGTGC
seqBAC1	Screen nach BAC-Klon mit 9A4	TTTCCTTTGAGAGAAAGGATCAACC
	BAC 129M24 sequenzieren	ACATGAGTTCAGTGCACCAAAAAAGC

Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Zweck	Sequenz 5'--> 3'
seqBAC10	BAC 129M24 sequenzieren	AGAGCAACAACCAAGAAGACC
seqBAC11	BAC 129M24 sequenzieren	GGGAATTGCTGAAAGAGATGCG
seqBAC2	BAC 129M24 sequenzieren	AAGAAACAACCTCTCATGGGATACC
seqBAC3	BAC 129M24 sequenzieren	AATCATGGCTTAGCCCTGTCC
seqBAC4	BAC 129M24 sequenzieren	CCAAGCTTGAACCCGTGACC
seqBAC5	BAC 129M24 sequenzieren	TCGAGATGTCAITGGAGATACTCC
seqBAC6	BAC 129M24 sequenzieren	CTTCAACACAATGCAACCACC
seqBAC7	BAC 129M24 sequenzieren	AATATTCTGCAATGAAACTGGC
seqBAC8	BAC 129M24 sequenzieren	TAACAATCACATTTGGCGGAACC
seqBAC9	BAC 129M24 sequenzieren	TATCTACTACGATTTCTCCCTGGAGC
SOE Luc forw	SOE PCR Promoter und Luciferase	CCTAGTTGCACATATAATTTTCATGGAAGACGCCAAAAACAT
SOE shProm rew	SOE PCR Promoter und Luciferase	ATGTTTTTGGCGTCTCCATGAAAATATATGTGCAACTAGG
SOE-PcDNA_forw	cDNA-Fragment für anschl. SOE-PCR	CCTAGTTGCACATATAATTTTCATGATGAATCAGAATTGCTT
SOE-PcDNA_rew	Promoter Fragment für anschl. SOE-PCR	AAGCAAATCTGATTTCATCATGAAAATATATGTGCAACTAGG
T2G17forw	Kontrolle Insertionsort Linie 31	TTACATGGCTTCTTGATCTTGACC
T2G17rew	Kontrolle Insertionsort Linie 31	GTCATCTTCGCATTTTATTTTGG
T6K12forw	Kontrolle Insertionsort Linie 77	ATATAATTCCACTCTAAACACACTTGC
T6K12forw2	Kontrolle Insertionsort Linie 35	GGAGTCCTAACCGCAAGCAGAGAGAGC
T6K12rew	Kontrolle Insertionsort Linie 77	ATGCATAAAATGGATAATTCAGAATAC
T6K12rew2	Kontrolle Insertionsort Linie 35	TACATAACGTGAATTTAGGGGGC

Anhang 2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Konstrukname	Stamm	Referenz
BAC-Bibliothek	<i>E. coli</i> DH10B	Jordan, 2005
pBIN35S-TK	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Bendahmane <i>et al.</i> , 1999; 35S-Coatprotein
pBIN61-Rx	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Bendahmane <i>et al.</i> , 2000; 35S-Rx
pBIN-PM-GFP	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Marion <i>et al.</i> , 2008
pENTR- Bs3 _{G39A}	<i>E. coli</i> Top10	J. Müglitz und T. Lahaye, nicht publiziert
pENTR-GFP	<i>E. coli</i> DH10B	S. Schornack und T. Lahaye, nicht publiziert
pENTR-T-356	<i>E. coli</i> DH5a	Gürlebeck <i>et al.</i> , 2005
pER10/H4	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	S. Kay und U. Bonas, nicht publiziert
pER10attR	<i>E. coli</i> Top10	S. Kay und U. Bonas, nicht publiziert
pER10-GW-GFP	<i>E. coli</i> Top10	S. Recht und T. Lahaye, nicht publiziert
pGADT7	<i>E. coli</i> Top10	Clontech
pGADT7-LamC	<i>E. coli</i> Top10	E. Herzfeld und U. Bonas, nicht publiziert
pGBST7	<i>E. coli</i> Top10	O. Kirchner und U. Bonas, nicht publiziert
pGBST7-LaminC	<i>E. coli</i> Top10	E. Herzfeld und U. Bonas, nicht publiziert
pGWB16-Bs3	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	P. Römer und T. Lahaye, nicht publiziert
pGWB2	<i>E. coli</i> DB3.1	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB6	<i>E. coli</i> DB3.1	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB20	<i>E. coli</i> DB3.1	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB20-Bs4	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Schornack, 2006
pGWB2-Bs3	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	P. Römer und T. Lahaye, nicht publiziert
pGWB2-XopJ	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	R. Szczesny, 2009
pJCGLox	<i>E. coli</i>	Joubes <i>et al.</i> , 2004
pJCGLox-256	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	S. Schornack und T. Lahaye, nicht publiziert
pJCGLox-Bs4	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	S. Schornack und T. Lahaye, nicht publiziert
pK7 360PBS3-TIA	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	T. Strauß und T. Lahaye, nicht publiziert
pK7FWG2	<i>E. coli</i>	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pK7FWG2-BAX	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Schornack <i>et al.</i> , 2009
pK7FWG2-libclones	<i>E. coli</i> DH10B	von Invitrogen in Expressionsvektor transferierte <i>C. annuum</i> cDNA-Bibliothek
pRT100-NPTII	<i>E. coli</i>	Töpfer <i>et al.</i> , 1989
pSPLuc+	<i>E. coli</i>	Promega
pTRV1	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Liu <i>et al.</i> , 2002
pUC57-rep300	<i>E. coli</i> Top10	Genscript
pUC57-SMCSTIA2	<i>E. coli</i> Top10	Genscript

Anhang 2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Konstrukname	Stamm	Referenz
pUNI-BAP1	<i>E. coli</i> PIR1	ABRC TAIR Accession: 1005798791; U60152
pUNI-BON1	<i>E. coli</i> PIR1	ABRC TAIR Accession: 1005956612; U17022
pVR220	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	S. Schornack und T. Lahaye, nicht publiziert; 35S-avrB::HA
pVS300	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996
pVSF-avrBs4	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Ballvora <i>et al.</i> , 2001
pYES-Dest52-Bs3	<i>E. coli</i> Top10	J. Müglitz und T. Lahaye, nicht publiziert
pYes-Dest52-LamC	<i>E. coli</i> Top10	E. Herzfeld und U. Bonas, nicht publiziert
pYR-KTI11	<i>E. coli</i> Top10	R. Zabel und K. Breunig, nicht publiziert

In dieser Arbeit generierte Vektorkonstrukte:

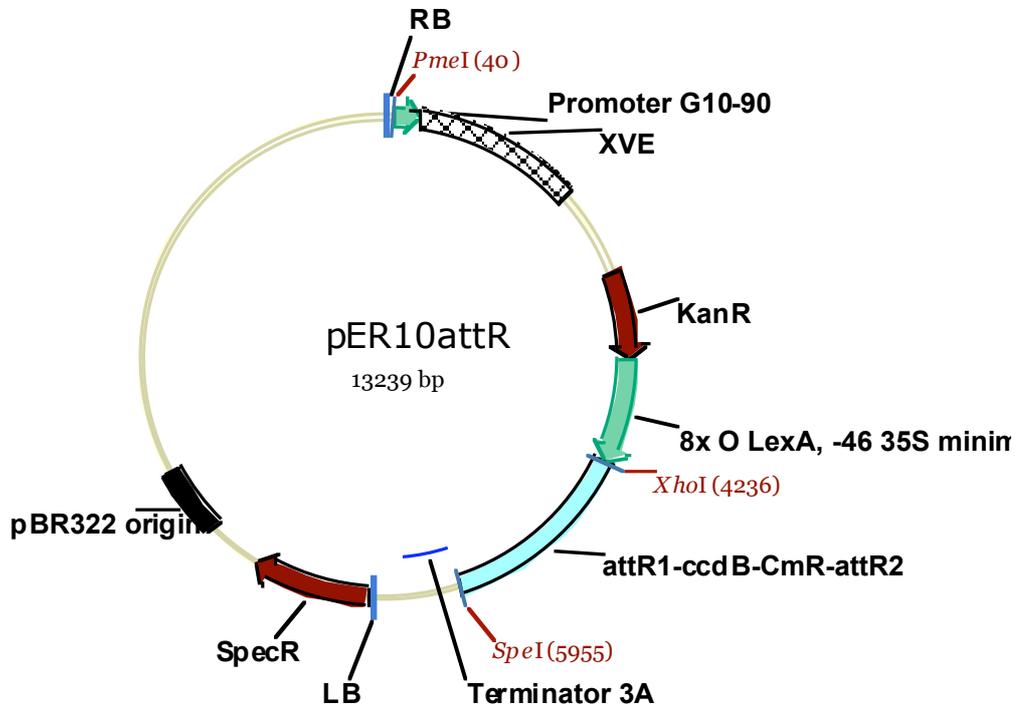
Name	Beschreibung / Zweck
pBPcDNA	topo BluntII-Derivat mit P _{343 bp} und cDNA von Bs3
pBPcDNA::GFPT	topo BluntII-Derivat mit P _{343 bp} und cDNA von Bs3 sowie eGFP und Terminator aus pK7FWG2
pBPcDNAT	topo BluntII-Derivat mit P _{343 bp} und cDNA von Bs3 sowie dem Terminator aus pK7FWG2
pBPLucT	topo BluntII-Derivat mit P _{343 bp} von Bs3, Luciferase und Terminator
pENTR-356*K	modifizierter pENTR-T-356 mit synthetischen <i>repeats</i> von <i>avrBs3</i>
pENTR-BAP1	<i>entry</i> -Vektor für BAP1
pENTR-BON1	<i>entry</i> -Vektor für BON1
pENTR-Bs3::GFP	<i>entry</i> -Vektor für die translationale <i>Bs3-GFP</i> -Fusion
pENTR-Bs3::GFP10-5	<i>entry</i> -Vektor für <i>Bs3::GFP</i> aus mutagenisierter <i>A. thaliana</i> Linie 77-10-5
pENTR-CaLRR	zur Generierung verschiedener Destinationvektoren mit CaLRR-RLK
pER10.1	Derivat von pER10attR mit P _{343 bp} und cDNA von Bs3 sowie eGFP und Terminator
pER10.1-356*	Generierung transgener Pflanzen mit induzierbarer <i>avrBs3</i> - und <i>Bs3</i> -Expression
pER10.2	Derivat von pER10attR mit P _{343 bp} von Bs3, Luciferase und

Anhang 2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Name	Beschreibung / Zweck
	Terminator
pER10.2-356*	Generierung transgener Pflanzen mit induzierbarer <i>avrBs3</i> - und <i>Luciferase</i> -Expression
pER10.3	Derivat von pER10attR mit P _{35S} GFP Terminator und P _{343 bp} sowie cDNA von Bs3 und Terminator
pER10-Bs3::GFP	Generierung transgener Pflanzen mit induzierbarer <i>Bs3</i> -Expression
pER10-CaLRR::GFP	induzierbare Expression einer <i>CaLRR-RLK::GFP</i> Fusion
pGADT7-Bs3m	Expression von <i>AD::Bs3_{39G>A}</i> in Hefe
pGADT7-CaLRR	Expression von <i>AD::CaLRR-RLK</i> in Hefe
pGBST7-Bs3m	Expression von <i>BD::Bs3_{39G>A}</i> in Hefe
pGBST7-CaLRR	Expression von <i>BD::CaLRR-RLK</i> in Hefe
pGWB2-Bs3::GFP10-5	konstitutive Expression von <i>Bs3::GFP</i> aus mutagenisierter <i>A. thaliana</i> Linie 77-10-5
pK7FWG2-BAP1	Expression von <i>BAP1</i> transient <i>in planta</i>
pK7FWG2-BON1	Expression von <i>BON1</i> transient <i>in planta</i>
pK7Luc	pK7SMCS-tag mit Luciferase in der <i>MCS</i>
pK7PcDNA	pK7SMCS-tag mit P _{343 bp} und cDNA von Bs3 in der <i>MCS</i>
pK7SMCS TIA2	Klonierungen, binärer Vektor mit <i>MCS</i> , <i>TIA-tag</i> und Terminator
pK7SMCS-tag	Klonierungen, binärer Vektor mit <i>MCS</i> und Terminator
pTRV2a-765-	Virusinduzierte-Expression des Bibliotheksklones 9G10
pTRV2a-765-1	Silencing Fragment 1 für den Bibliotheksklon 9G10
pTRV2a-765-2	Silencing Fragment 2 für den Bibliotheksklon 9G10
pTRV2a-Ca-	Virusinduzierte Expression des <i>CaLRR-RLK</i>
pTRV2a-CaLRR	Silencing des <i>CaLRR-RLK</i>
pYR-CaLRR	Galaktose induzierbare Expression des <i>CaLRR-RLK</i> in Hefe

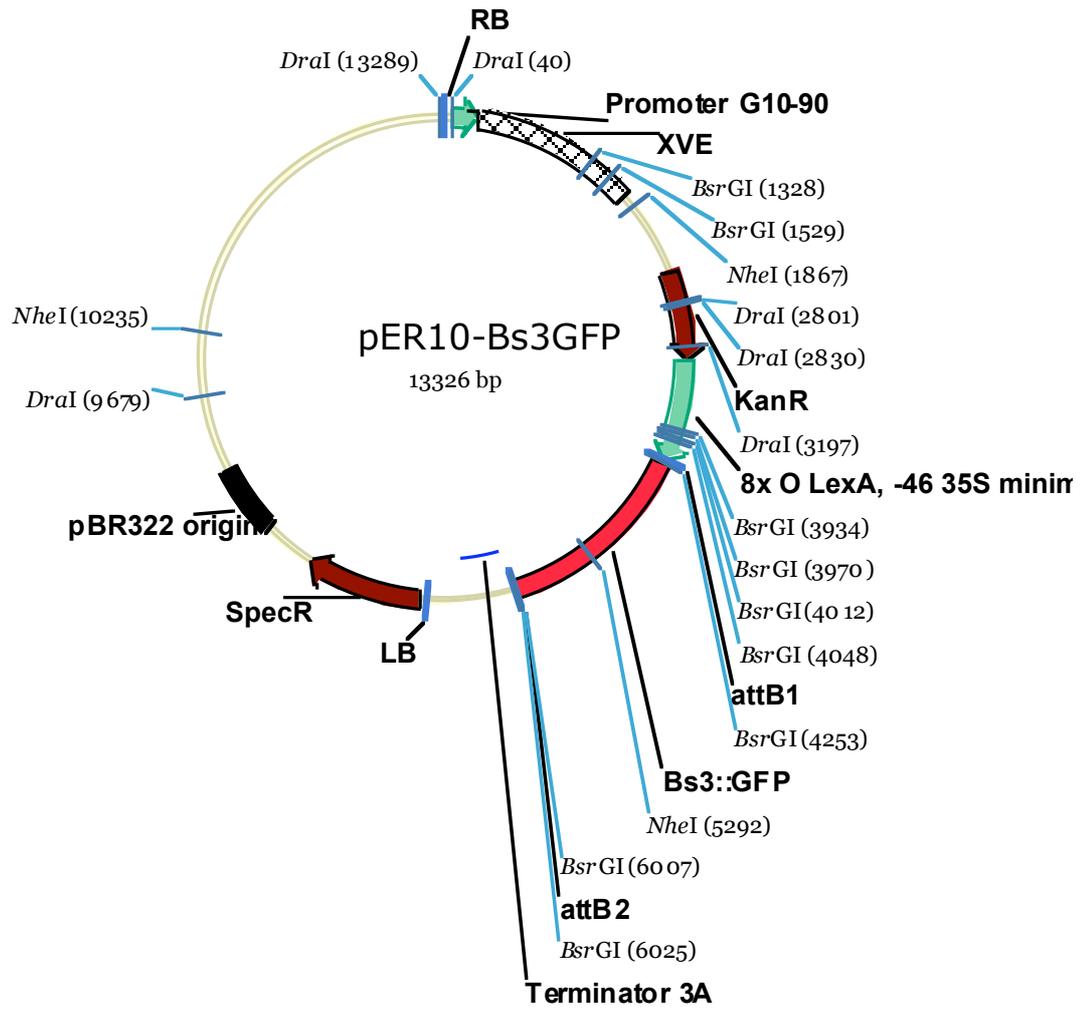
Anhang 3: Vektorkarten

pER10attR

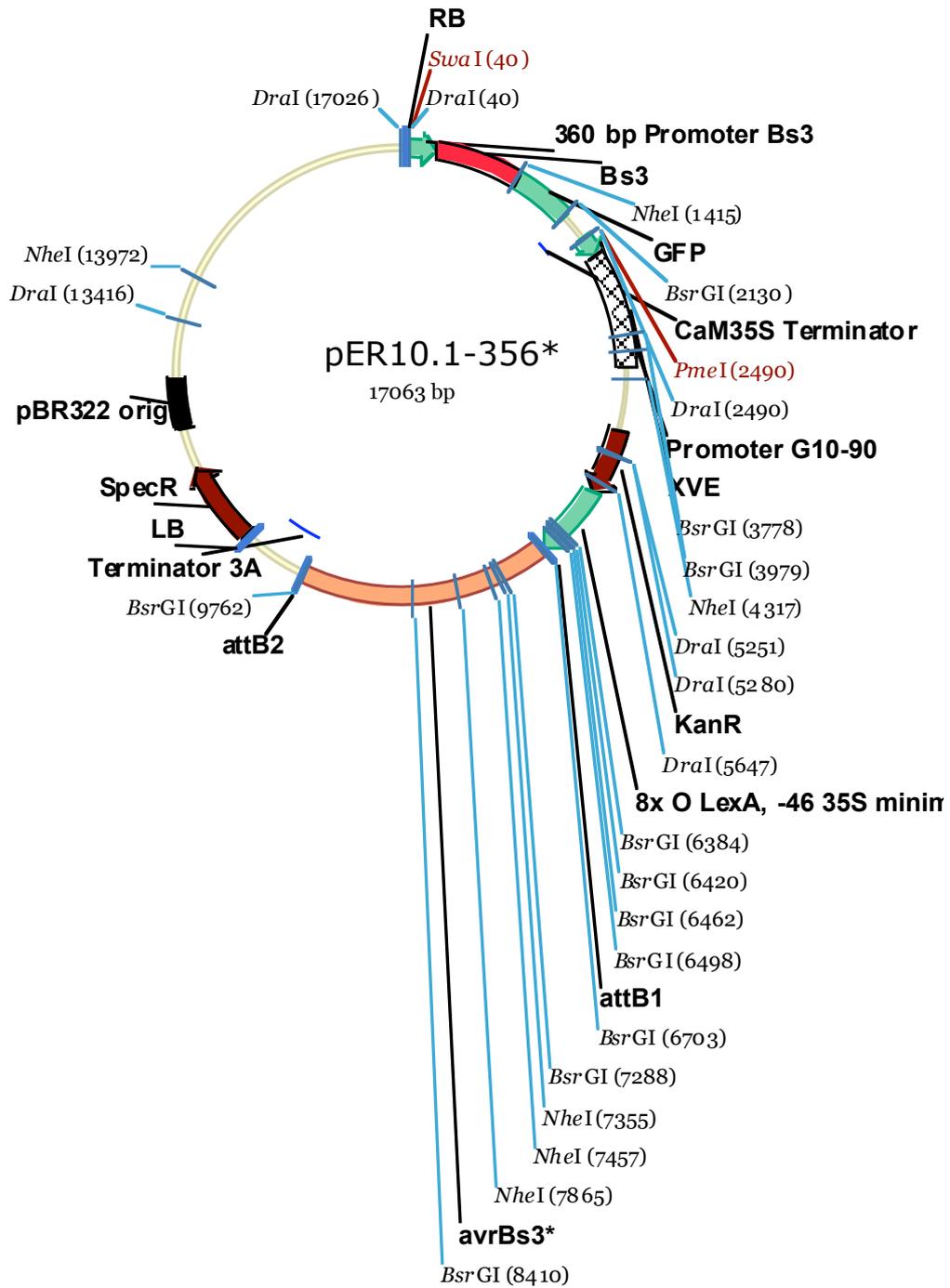


modifiziert nach Zuo *et al.*, 2000 sowie Kay und Bonas, nicht publiziert

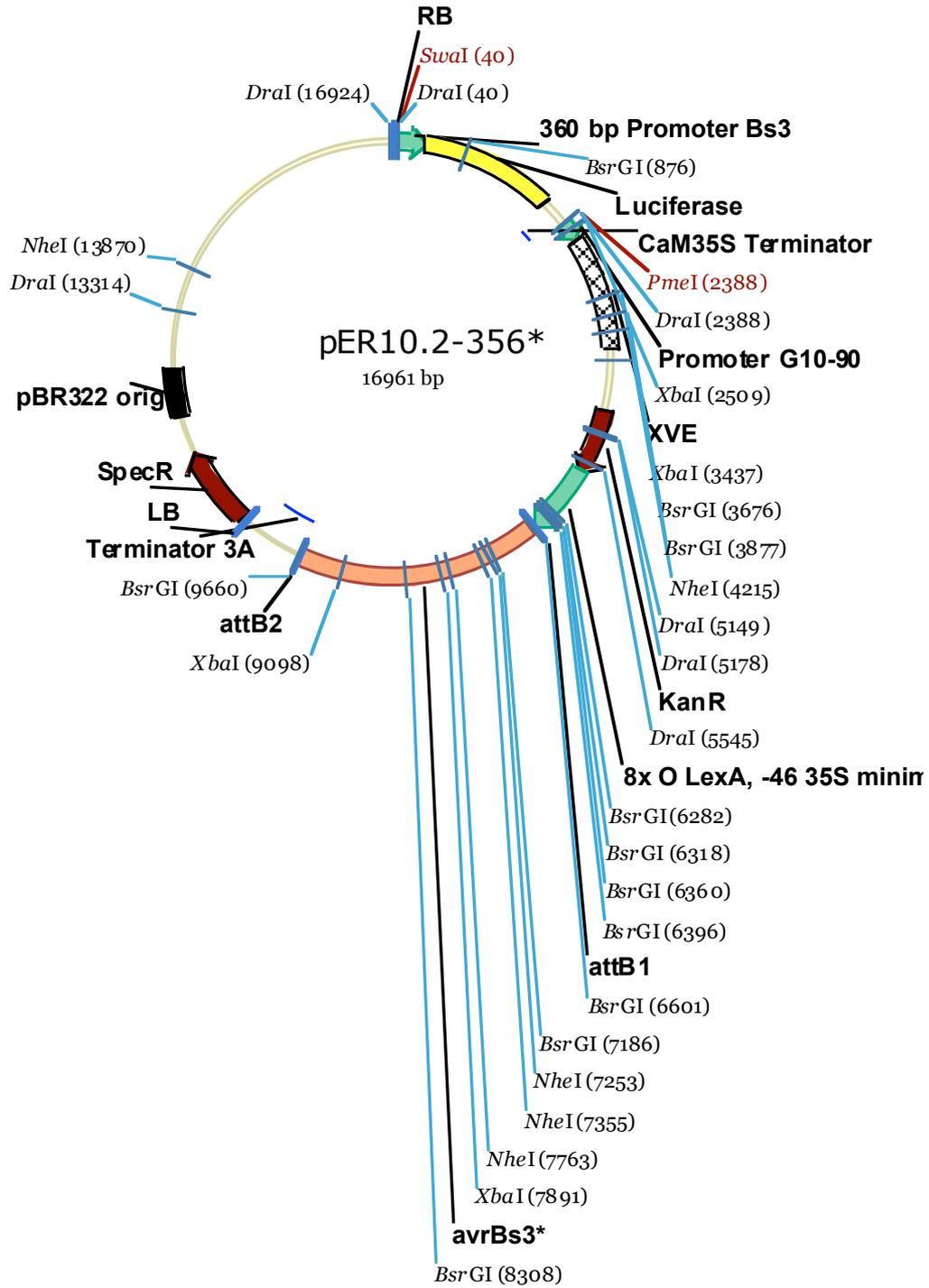
pER10-Bs3::GFP



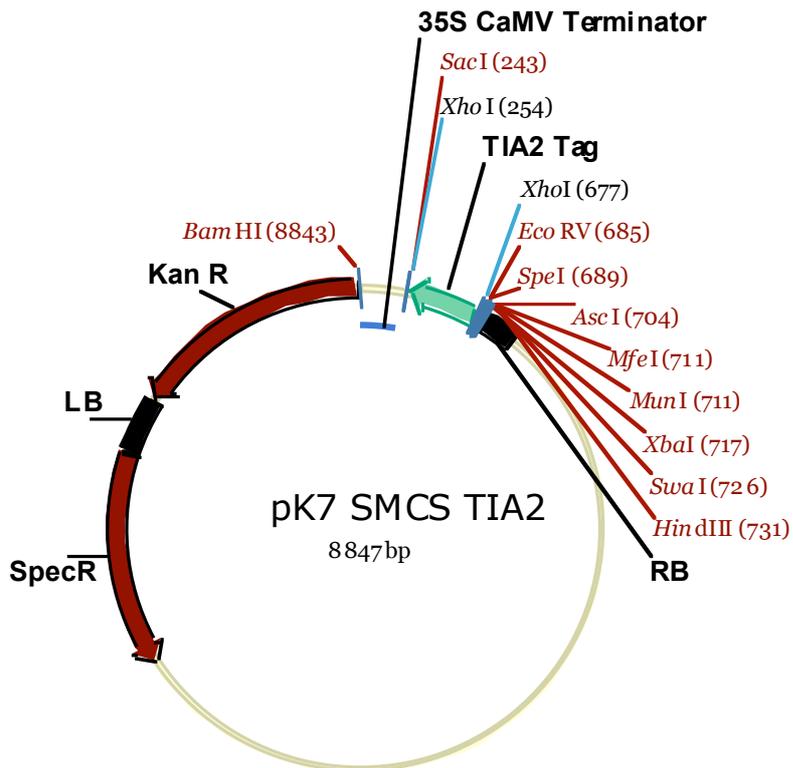
pER10.1-356*



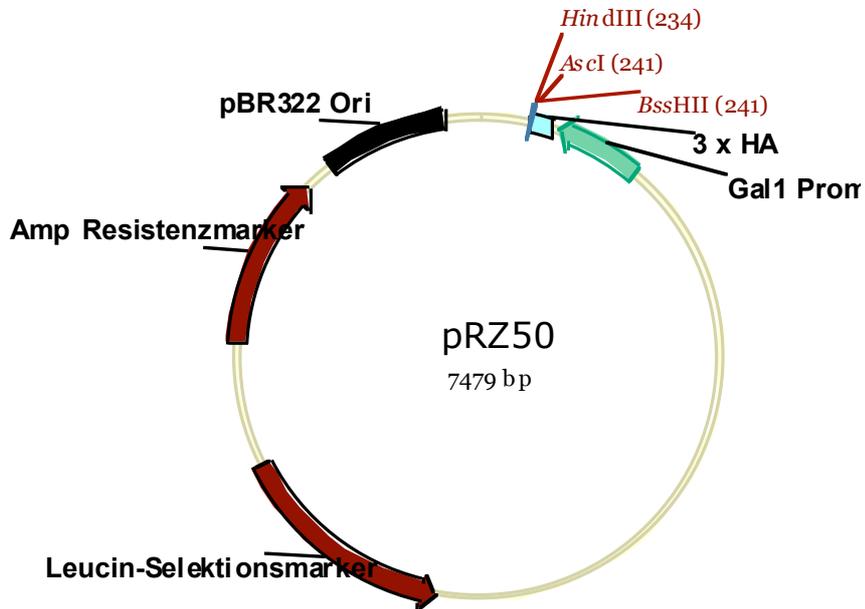
pER10.2-356*



pK7 SMCS TIA2



pRZ50 (Ursprung von pYR-Kti11)



Anhang 4: Klonierungsstrategien

für die Plasmide pER10-Bs3::GFP; pER10.1 und pER10.2

Promotoren sind durch Pfeile gekennzeichnet, ORFs durch spitz zulaufende Kästchen (Ausnahme: Resistenzmarker sind inklusive Promoter und Terminator zu lesen)

einige Schnittstellen wurden abgekürzt: E - *EcoRV*; H - *HindIII*; S - *SacI*; X - *XbaI*

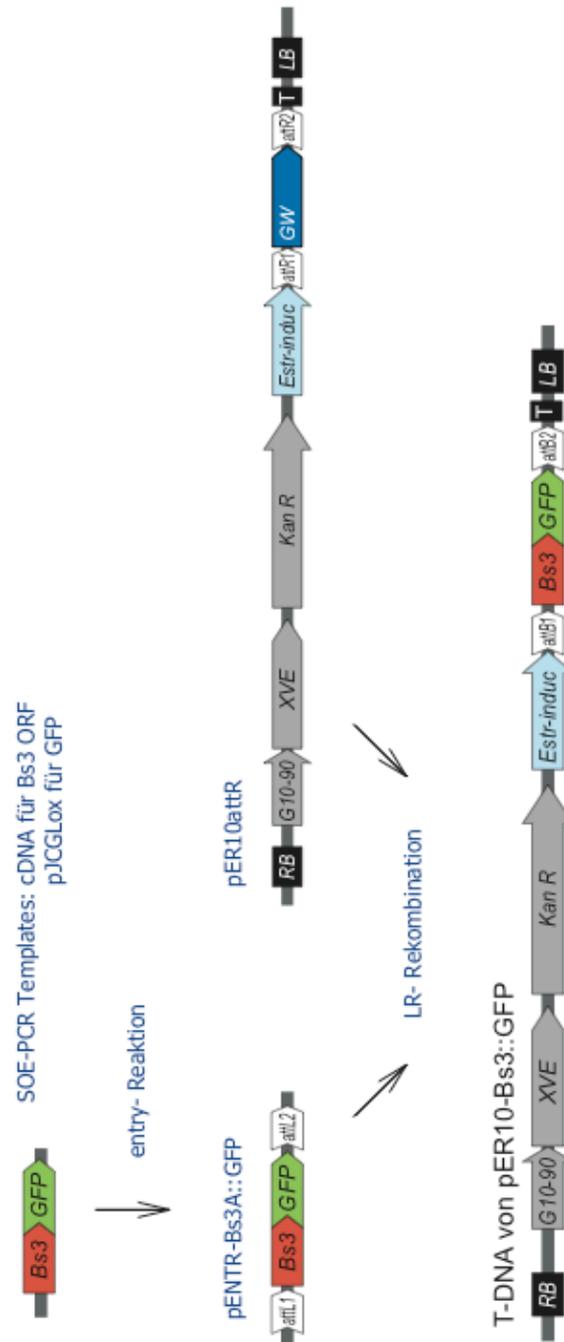
RB-right border; LB-left border; T-Terminator; GW- Selektionsmarker der GATEWAY-Kassette; KanR;

Resistenzmarker gegen Kanamycin; Estr-induc – Estradiol induzierbarer Promotor; XVE- Estradiolabhängiger

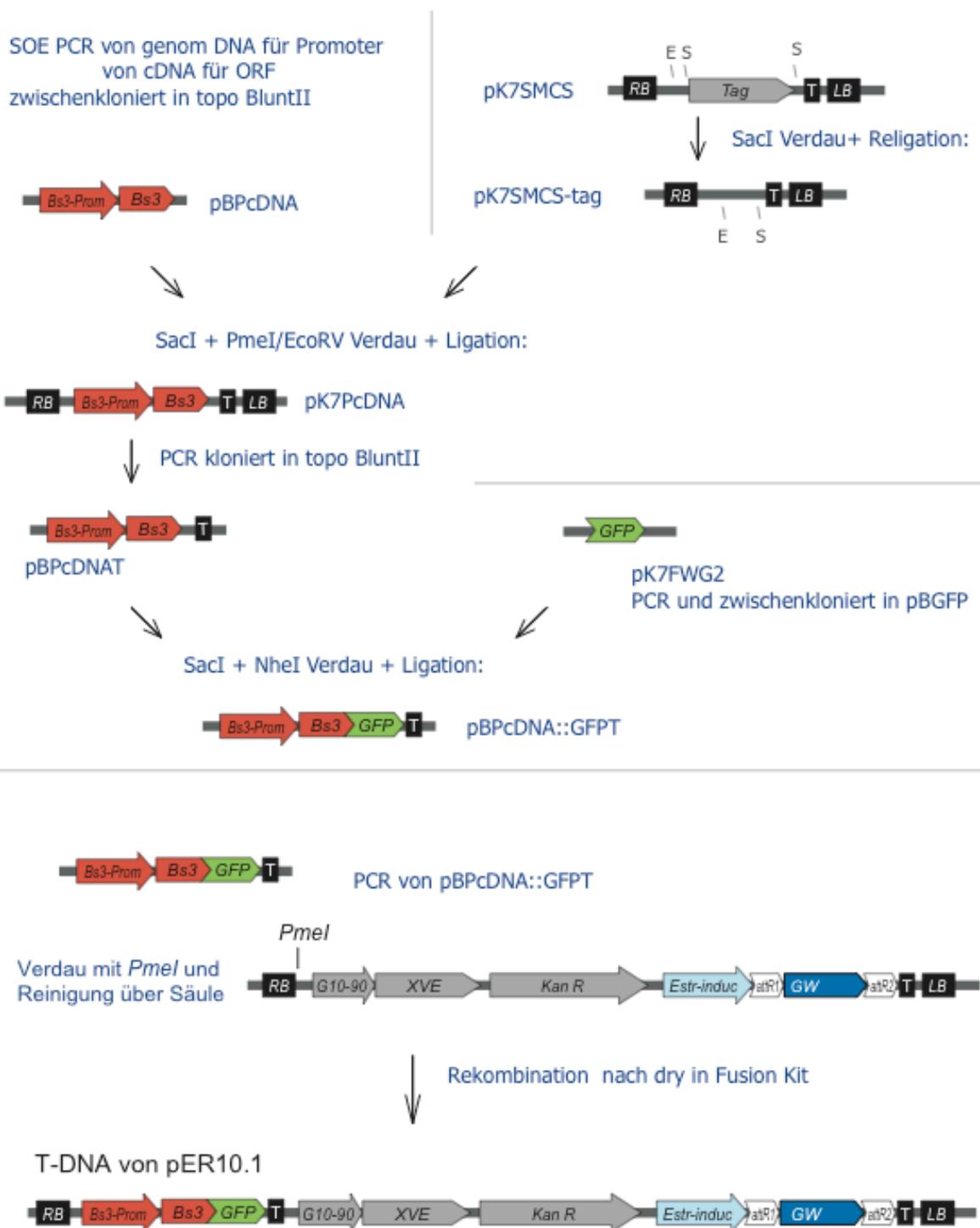
Transkriptionsfaktor; G10-90 – synthetischer, konstitutiver Promotor; Luc – Luciferase, AmpR –

Resistenzmarker gegen Ampicillin; Bs3Prom – 343 bp Promoter von Bs3

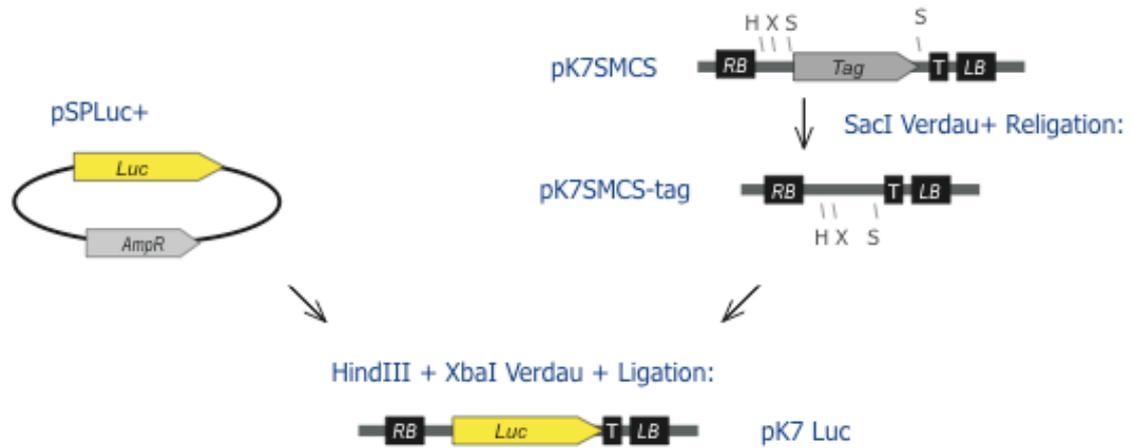
A: Klonierungsstrategie für pER10-Bs3::GFP



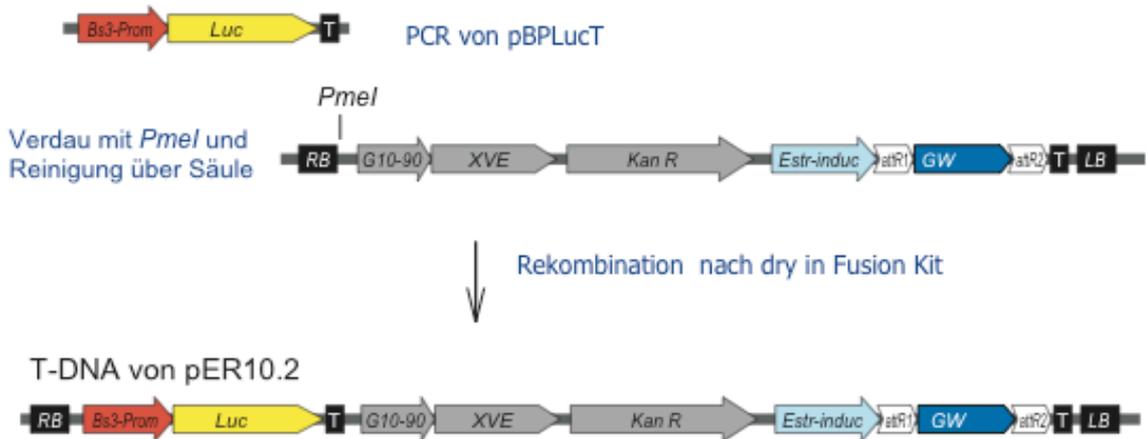
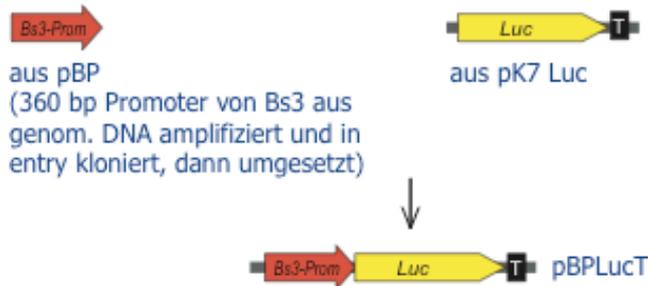
B: Klonierungsstrategie für pER10.1



C: Klonierungsstrategie für pER10.2



SOE PCR LucT mit Bs3-Prom



ORF *CaLRR-RLK*

unterstrichen wurde der ORF des Klons 9A4

ATGGGTTGGAAGAGATCTGTATTATGTTGCTTGAATTTGAAGATCTTGGTGGGGTTTTTGT
 TAACTTTTCCTGTTCAACTTTCTGATGGAAGTACTCAGGAGATGTTGCTGCAATTAATGC
 ATTACATGCTTCTTGGATCGCCTTCCCTTCCAGGCTGGGGTGTGAGCCAGACCCCTGT
 GATGGACAATGGCAAGGGGTTGTATGCAATGAGACGAATATATTATCCATTCAATTAAT
 GCTGCTAACTTGGCAGGTGAACTAGGAGATAAATTGGCGTCATTTTCTTCTGAAAACG
 ATAGATTTAAGTAACAATCACATTGGCGGAACCATCCCGTCCAATCTGCCAGTTTCATTG
 CAGAATATTTTCTTTCAGATAATGATTTAACCAGGATATCCCGAGTTCCTTATCTTCCC
 TAAGTCAACTGTCAGCAATGTCTCTCAATGGAAACCAACTGACTGGAGAAATTCCTGATT
 CCTTTCAAGGCCTTACGGCATTGGTTAATCTTGATTTATCAAGTAACAGTTTAACCGGAGC
 TTTGCCGTCATCAGTAGGAACTTATCCTCCCTGGCCACTCTGCATTTGCAGAGTAACCAG
 CTTTCTGGAAGTCTAGATGTTTTACAAAATCTCCCCCTTGAGATTTGAATGTGGAAAATA
 ACCTTTTAAATGGACCCATACCTCAGAAATTGTTTTCTATCCCAATTTCAAAAACAGCGG
 AAATCCTTTCAACAGTGTGCTCCTTTGTCTCCACCCAACAGTAGTGTCTCTCCTTTGTCTC
 CACCCACTTCTTTTGCAAGACCCCTCCAGCACCACCAGGACAACCCTTTTTTAAGCCTCC
 AACTTCAGCACAGTACCACCGACTTCAGAAAGAAAACCTGGACAAAAGGCAGATGGAC
 CATCAGCAACTGCAGAACCTAGTTCACAAGGAAGCAAAAAGTCTGTTAAAAGGGTAGTC
 TGGATATCCATTGTATCAGTTTTGTCATTTCTAATATTGGTTATAGCAATCCTGCTCTTTCT
 GCCAAGATGCTTTAGGGAAAGGAGAGAGACTAATTGGTCCAGACGGCACGAAATAGCGC
 CTTATGTGGGCTCCAGGGAGAATCGTAGAGATAATGGTTTATTGCTCCAACCTGGACAAG
 ATGTAGAGAAAGCTCCTCCTTAGTGAGGCCAAAGGAAGAGCAACAACCAAGAAGACCG
 GCTCGCACTCCCATGCCACAGCATGAGCAGGAGGTAATGTGCGGAACATGAGTGCAGT
 GCCAAAGAAGGATGCTAGTGAGATAAATCTAAGCAGAATTGATATTGATTTGATGGCTCC
 ACCACGACCCCTCCTCCAGCGACTGCACCGCCTGCGGCCCCACCACCACCACCCTTCC
 TCAAGAGAGAGTTACTGTGAAGCCAATTCCACCTGCTGACAATACTGCAATGAAGTTTCC
 AACCCGGCCACTTCCACCAACTTCTGTGAAATCTTACACAATCGCATCTCTTCAGCAATAC
 ACCAACAGCTTTTCGCAAGATAATCTGATAGGATCAGGAATGCTGGGAACTGTGTACAGA
 GCAGAGCTTCAAATGGGAAGTTACTTGTGTCAAGAAGCTGGACAGGAGAGTTACCAA
 TCAACAGAAGGATGATGAGTTTCTTGAAGTAAACACTATTGATGGAATTCGTCATGC
 TAACGTTGTGAGTTGATGGGCTATTGTTTAGAGCATGGTCAAAGACTTCTAGTTTATGA
 GTATTGCAGTAACGGGACACTACAAGATGCACTGCACTCTGATGATGAATTCAAGAAAC
 AACTCTCATGGGATAACCGTATCCGGATGGCTCTTGGAGCTGCAAGAGCCTTGGAGTATC
TCCATGAGATCTGCGAGCCACCTATTATCCACAGGAACTTCAAGTCCGTCATCTTCTCAT
AGATGAAGAGTTGGCTGTGCATGTCTCTGATTGTGGTTTAGCTTCACTGATATCATCAGGT
GCCGTGAGCCAGTTGTCAGGACAGCTGCTAACAACTATGGTTACGGTGCCCCAGAATTT
GAGTCAGGGATTTATACTTCTCAAAGTGATGTTTACAGTTTTGGCGTGGTCATGCTGGAA
CTCTTAACAGGCAGAATGTCATATGACCGAACACGAAGTTCGAGGAGAGCAATTCTTGGTC
CGATGGGCAATTCCTCAGCTACATGATATTGATGCCTTGACAAGGATGTTGATCCTTCTC
TCAAAGGAAAGTACCCACTTAAATCATTATCGCATTTTGCTGACATAATCTCCCGTTGTGT
TCAGCCTGAGCCAGAATTCAGGCCACAAATGTGCGGAGGTAGTTCAAGACCTCATACAAAT
GAAAAGAAGAGAATCTCCAGTAGATCCGATGAAGAATAA

DNA-Sequenz des semisynthetischen *avrBs3*

unterstrichen sind die Schnittstellen *StuI* und *AgeI*

ATGGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGT
TCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCATGGGTTTACACACGCGCA
CATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGA
CATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGGCAGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGT
GGTCCGGCGCACGCGCCCTGGAGGCCTTGCTTACTGTTGCTGGGGAATTGAGAGGGCCTC
CACTGCAATTAGATACAGGTCAGTTGCTCAAGATAGCTAAACGGGGAGGAGTGACTGCC
GTGGAAGCTGTGCATGCCTGGAGGAATGCTTTGACGGGGGCACCGCTGAATCTTACACCT
GAGCAGGTTGTGCAATCGTAGTCACGATGGCGGCAAACAGGCATTGGAGACCGTGCA
ACGCCTTCTCCAGTCTTGTGTCAAGCTCATGGACTGACACCGCAACAAGTGGTAGCAAT
CGCAAGCAATGGCGGAGGGAAGCAGGCTCTTGAAACTGTACAGAGGTTGCTACCTGTCC
TATGCCAGGGCGCACGGGCTGACACCACAACAAGTTGTAGCTATCGCTAGCAATAGTGGC
GGAAAGCAGGCATTGGAGACTGTTCAAAGGCTACTCCCAGTTCTATGTCAGGCTCATGGA
CTGACACCTGAACAAGTGGTTGCTATCGCTAGCAACGGTGGTGGAAAGCAAGCACTTGA
GACGGTTCAACGACTCCTGCCCGTACTGTGCCAAGCTCATGGACTTACGCCTGAGCAGGT
AGTTGCTATTGCTTCTAATATAGGAGGAAAGCAGGCTCTCGAAACTGTGCAAGCGCTTCT
ACCTGTACTATGCCAGGCTCATGGCCTTACCCAGAACAGGTTAGTCGCAATTGCTTCGAA
TATCGGAGGTAACAGGCTCTTGAGACCGTTCAAGCCTTGTTGCCAGTGTTATGTCAAGC
ACATGGGCTAACTCCTGAGCAAGTTGTTGCAATAGCTTCAAATATAGGGGAAAACAAG
CCCTTGAGACAGTCCAAGCCTTGTTGCCGGTCCATGCCAGGCACATGGATTGACACCGG
AACAGGTTGTTGCGATCGCTAGCCACGATGGTGGCAAGCAGGCACCTGAAACAGTTTCA
GACTGTTACCAGTACTATGTCAAGCTCACGGACTCACCCCTGAACAGGTGGTGGCGATC
GCTTCACACGATGGAGGCAAGCAGGCTCTAGAGACTGTGCAGCGTCTTTTGCCAGTCCCT
TGTCAGCCCATGGATTGACACCACAGCAAGTTGTAGCTATTGCGTCTAATGGTGGAGGT
AAACAAGCCCTGGAACCGTCCAGAGACTTCTTCCAGTGCTTTGTCAAGCACATGGACTC
ACACCTGAACAAGTTGTTGCTATCGCAAGCAATTCTGGAGGTAACAGGCGCTTGAGACA
GTTCAAGCTCTTCTTCCAGTGCTCTGTCAAGCTCATGGACTCACTCCTGAACAGGTGGTGG
CTATCGCAAGCAACTCTGGAGGCAAACAAGCATTGGAGACCGTGCAGAGACTTCTGCCG
GTGCTTTGCCAGGCCCATGGTCTAACACCCGAGCAGGTCGTTGCTATCGCTTACATGAT
GGTGGAAAGCAAGCTCTTGAAACTGTACAAAGGCTGTTACCAGTTCTCTGCCAGGCTCAT
GGATTGACTCCAGAACAAGTAGTCGCTATAGCCAGTCATGATGGTGGAAAACAGGCTCTT
GAGACAGTTCAGAGATTATTACCTGTCCTGTGTCAAGCCCACGGACTGACACCAGAGCAA
GTTGTTGCTATTGCCTCTCACGACGGTGGTAAACAGGCCCTAGAGACCGTTCAAAGGTTA
CTTCCAGTGTTGTGTCAAGCCCATGGACTAACACCGCAACAAGTTGTTGCTATTGCTTCTA
ACGGTGGAGGAAGACCTGCTTTGGAGACGGTACAGAGACTCTTACCTGTACTGTGTCAGG
CTCATGGTCTTACTCCTGAGCAGGTAGTAGCTATCGCTTCGCATGATGGTGGAAAGCAGG
CACTGGAGACAGTCCAGAGATTGCTGCCGTTCTCTGTCAAGCCCATGGCTTGACACCAC
AGCAGGTGGTGGCAATTGCATCAAACGGAGGAGGACGGCCAGCACTTGAGTCGATTGTT
GCGCAATTGAGCAGACCCGATCCTGCTTTGGCTGCGCTAACGAATGATCACCTCGTTGCT
TTAGCATGCCTAGGAGGTCGGCCGGCTCTGGATGCTGTCAAGAAAGGGCTTCCACATGCC
CCTGCTCTTATTAAGCGTACTAACCAGCAATCCCAGAGCGCACCCAGCCATAGAGTAGCT
GACCACGCGCAAGTTGTTAGAGTCTTAGGCTTTTTCCAATGCCATTCTCATCCCGCTCAGG
CTTTGACGATGCAATGACTCAATTCGGAATGTCTAGACATGGTCTTCTTCAATTGTTTCG
CAGAGTTGGTGTACCGAACTCGAAGCACGTAGTGGAACTCTCCCTCCTGCAAGTCAGAG
ATGGGACCGCATTTTGCAAGCAAGTGGTATGAAAAGGGCTAAACCGTCTCCAACCAGTA
CCCAAACGCCTGATCAGGCTTCTCTTACGCATTTGCTGATTGCTGGAGCGAGATCTTGA
CGCTCCGTCACCAATGCATGAAGGAGACCAAACACGAGCGTCATCTCGAAAGCGATCTA
GGAGCGATCGTGCAGTGACCGGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGCGTTCCCG
AACAGCGCGATGCGCTGCATTTGCCCTCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGGTACCAGTA
TCGGGGGCGGCCCTCCCGATCCTGGTACGCCACGGCTGCCGACCTGGCAGCGTCCAGCA
CCGTGATGCGGGAACAAGATGAGGACCCCTTCGCAGGGGCAGCGGATGATTTCCCGGCA
TTCAACGAAGAGGAGCTCGCATGGTTGATGGAGCTATTGCCTCAGTGA

Anhang 5: Sequenzen

KPSVKRTSSVSFKNSPTFHLIPSTQVAATPDRSSTSQDSPDTRGVKAFSLADLQNTASCFS
PNRLLGEGTIGRVYKAKFQDGRKFAVKEIDSSLLGKGNPEEFSHIVSSISSIHHKNMAELVGYC
SEQGRNMLVYEFYFTSGSLHRFLHLSDDFSKPLTWNTRIRIALGTAKAIEYLHETCSPPLVH
KNIKSSNILLDNELNPRLSDYGLANFHHRSTQNGLVGYNAPECTDPSAYTQKSDVYSFGV
VMLELLTGRKPYDSGRPKAEQSLVRWAKPQLKDMDTLDEMVDPALCGLYAPESVSSFADIV
SICVMTEPGLRPPVSNVVEALKRLV

>SRF5

MTQKLVRLVIVSLAITVTLLQAKTDNQEVSALNVMFTSLNPSKLGWKANGGDPCEDSWE
GVKCKGSSVTELOLSGFELGGSRGYLLSNLKSLLTFDLSKNNLKGNIPIYQLPPNIANLDF
SENELDGNVPYSLSQMKNLQSNLQNKLNGLPDMFQKLSKLETLDLDFSLNKLKSGKLPQSF
ANLTSCLKLHLQDNRFRTGDINVLRLNAIDDLNVEDNQFEGWIPNELKDIDSLLTGGNDWST
ETAPPPPPGVKYGRKSSGSKDGGGITAGTGMVIAGACLGLVLIIVLIALVSKKSSLSPHFI
DEDNSHHTPKFKSLTSHGSAQELRVDFGNDYKDGKSGDSDENIHRIGSKGLKHYVSSRVMS
FTDTEFANKLNAKRTTSTRSAVEFELSDLQSATANFSPGNLLGEGSIGRVYRAKYS
DGRTLAVKKIDSTLFDSGKSEGITPIVMSLSKIRHQIAELVGYCSEQGHNMLVYEFYFRN
GSLHEFLHLSDCFSKPLTWNTRVRIALGTARAVEYLHEACSPVMHKNIKSSNILLDADLN
PRLSDYGLSKFYLRSTQNGLGEGYNAPEARPSAYTPKSDVYSFGVVMLELLTGRVPFDG
EKPRPERSLVRWATPQLHDIDALSNIA DPALHGLYPPKSLSRFADIIALCVQVEPEFRPP
MSEVVEALVRMVQRSSMKLKDDLSSSYRAHDDYDY

>SRF6

MRENWAVVALFTLCIVGFELRFIHGATDASDTSALNTLFSGMHSPAQLTQWTAAGDPCGQ
NWRGVTCGSRVTOIKLSGLELSGTLGGYMLDKLTSLELSSNNLGGDLPYQFPPNLQRL
NLANNQFTGAASYLSQITPLKYLNLGHNQFKGQIAIDFSKLDLSTLDFSFNSFTNSLPATF
SSLTSLKSLYLQNNQFSGTVDVLAGLPLETLNIANNDFGTWIPSSLKGITLIKDGNSFNTG
PAPPPPGTTPPIRGSPPRKS GGRESRSSDESTRNGDSKKSIGAGAIAGIISLLVVTALLV
AFFLFRKKS KRSSPMDIEKTDNQPFTLASNDFHENNSIQSSSSVETKKLDTLSINLRPPP
IDRNKSFDDDEDSTRKPIAVKKSTVVVPSNVRLYSVADLQIATGSFSVDNLLGEGTFGR
VYRAEFDDGKVLAVKKIDSSALPHGMTDDFIEMVSKIANLDHPNVTCLVGYCAEHGOHL
VVYEFHKNGSLHDFLHLSSEEESKALVWNSRVKIALGTARALEYLHEVCSPSIVDKNIK
SANILLDSELNPHLSDSGLASFLPTANELLNQTDEGYSAPVSMGQYSLKSDIYSFGV
VMLELLTGRKPFDDSTRSRSEQSLVRWATPQLHDIDALAKMVDPALKGLYPVKSLSRF
ADVIALCVQPEPEFRPPMSEVVQALVVLVQRANMSKRTVGVDPSPQRAGSADTTSDYM

>SRF7

MFSSMNSPGQLSQWTASGGDPCGQNWKGITCSGSRVTOIKLPSLGLSGSLGFMLDKLTS
VTEFDMSNNNLGGDLPYQLPPNLERLNLANNQFTGSAQYSISMMAPLKYLNLAHNQLKQ
LAIDFTKLTSLSILDSSNAFIGSLPNTCSSLTSAKSIYLQNNQFSGTIDILATLPLENL
NIANNRFTGWIPDSLKGINLQKDGNNLNSGPAPPPPPGTTPISKSSPTPKSGNRGNRSN
GDSSNSKDSKSGLGAGGVAGIVISLIVVTA VIAAFFLIKRRKRSKSSSTDIEKTDNNIN
QPILASNDFHQENKSVQNPPLVETKKLDTLSMNLRPPPSERHKSFDDDDSTMRKPIVA
KKA AVVVPSNVNTYTVSDLQVATNSFSDVNLLGEGTFGRVYRAQFEDGKVLAVKKID
SSALPTDTADDFTEIVSKIAHLDHENVTKLDGYCSEHGOHLVVYEFHRNGSLHDFLHL
LAEESKPLIWNPRVKIALGTARALEYLHEVCSPSIVHKNIKSANILLDSELNPHLSDS
GLASFLPTANELLNQNDEGYSAPETSMGQYSLKSDVYSFGVVMLELLTGRKPFDDSTR
SRSEQSLVRWATPQLHDIDALGKMVDPALKGLYPVKSLSRFADVIALCVQPEPEFRPP
MSEVVQALVVLVQRANMSKRTVGVGSGSSGVNDYM

>SRF8

MAIGDRAMFTVLLLFIASISGFSVVRVCTDPSDVQALQVLYTSLNPSQLTNWKNGGGDPC
GGE SWKGITCEGSAVVTIDISDLGVSGTLGYLLSDLKSLRKLVDVSGNSIHDTLPYQLPP
NLTSNLARRNLSGNLPYSISAMGSLSYMNVSGNSLTMSIGDIFADHKSLATLDLSHNNF
SGDLPSSSLSTVSTLSVLYVQNNQLTGSIDVLSGLPLKTLNVANNHFNGSIPKELSSIQ
TLIYDGN SFDNVPASPQPERPGKKEPSPGSKPKIGSEEKSSDSGKGLSGGVVTGIVF
GSLFVAGIHALVLYLCLHKKRKY

RGSTRASQRSLPLSGTPEVQEQRVKSVASVADLKSSPAEKVTVDRVMKNGSISRIRSPITASQY
TVSSQLQVATNSFSQENIIGEGSLGRVYRAEFPNGKIMAIKKIDNAALSLQEEDNFLEAVSNMSR
LRHPNIVPLAGYCTEHGQRLLVYEVVGNLDDTLHTNDDRSMNLTWNARVKVALGTAKA
LEYLHEVCLPSIVHRNFKSANILLDEELNPHLSDSGLAALTPNTERQVSTQVVGSGFYSAPEFA
LSGIYTVKSDVYTFGVVMLELLTGRKPLDSSRTRAEQSLVRWATPQLHDIDALSKMVDPSLN
GMYPAKSLSRFADIIALCIQPEPEFRPPMSEVVQQLVRLVQRASVVKRRSSDDTGFSYRTPEHE
HVDISF

>SRF9

MSFTRWEVFFGLSVLALTMPFSAGVTNLRDVSAINNLYITLGAPSLHHWLAFFGGDPCGEKQG
VVCDSSNITEIRIPGMKVGGGLSDTLADFSIQVMDFSSNHISGTIPQALPSSIRNLSLSSNRFTG
NIPFTLSFLSDLSELSLGSNLLSGEIPDYFQQLSKLTKLDLSSNILEGHLPSMMDLASKILYLQ
DNKLTGTLDVIEDLFLTDLNVENNLFSGPIPPNLLKIPNFKKDGTPFNSTIITPPPPVVDPPPAT
HRAPPVPRIPVSGVPPAPFAPFAPLQPQHPPPSPPLVWSPSSDNGGGDPWNSVSGQPTLQIS
PPSGSGSGKFWSTQRILLVSSVAIIVLVSGLCVTLWRCCRSKIYNRYYSYGARKDLQRPYFNKP
PSQPTPTMGKVSREPMVKPFDGYGAGDRKYGYPMQRAEESRRAMPPTSYYNKDVNTPQKP
LQPPRQFQSNDTASKRAAHFPPGLNSSSSATVFTIASLQQYTNNFSEENIIGEGSIGNVYRAEL
RHGKFLAVKLSNTINRTQSDGEFLNLVSNVLKLRGHILELLGYCNEFGORLLVYEYCPNGS
LQDALHLDRKLHKKLTWNVRINIALGASKALQFLHEVCOPPVVHQNFKSSKVLDDGKLSVR
VADSGLAYMLPPRPTSQMAGYAAPEVEYGSYTCQSDVFSLVVMLELLTGRRPFDRTRPRG
HOTLAQWAIPRLHDIDALTRMVDPSLHGAYPMKSLSRFADIISRSLOMEPGFRPPISEIVODLO
HMI

>CaLRR-RLK

MGWKRSVLCCLNLKILVGFLFTFPVQLSDGTDSDGVAAINALHASLGSPSLPGWGVSPDPCD
GQWQGVVCNETNILSIQLNAANLAGELGDKLASFSSLKTIDLNNHIGGTIPSNLPSVSLQNIPLS
DNDLTGSIPSSLSLSQLSAMSNGNQLTGEIPDSFQGLTALVNLDLSSNSLTGALPSSVGNLSS
LATLHLQSNQLSGTLDVQLNLPLADLNVENNLFNNGPIPKLFSIPNFKNSGNPFNSVAPLSPPN
SSVSPLSPPTSFARPPPAPPGQPFFKPPTSAQSPPTSERKPGQKADGPSATAEPSSQGSKKSVKR
VVWISIVSVLSFLILVIAILLFLPRCFRERRETNWSRRHEIAPYVGSRENRRDNGLLQPGQDVE
KAPPLVRPKEEQPRRPARTPMPQHEQE VNVNRNMSAVPKKDASEINLSRIDIDLMAPRPPPP
ATAPPAAPPPPLPQERVTVKPIPPADNTAMKFPTRPLPPTS VKSYTIASLQQYTNSFSQDNLIG
SGMLGTVYRAELPNGKLLAVKKLDRRVTNQKDDDEFLELVNTIDGIRHANVVELMGYCLEH
GORLLVYEYCSNGTLQDALHSDDEFKQLSWDTRIRMALGAARALEYLHEICEPPIIHRNFKS
VNLLIDEELAVHVSDCGLASLISSGAVSQLSGQLTTYGYGAPEFESGIYTSQSDVYSFGVVM
LELLTGRMSYDRTRSRGEQFLVRWAIPQLHDIDALTRMVDPSLKGKYPLKSLSHFADIISRCV
QPEPEFRPQMSEVVQDLIQMKRRESPRSDEE

DNA-Sequenz der SMCS mit TIA2-Epitoptag und Terminator

```
AAGCTTATTTAAATTCTAGACAATTGGGCGCGCCGCGATCGCACTAGTGATATCCTCGAG
AGGCCTGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTGAACAAAATTAAT
CTCAGAAGAAGACTTGAACGGACTCGACGGTGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATT
TGAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTAGCCATCATCATCAT
CATCATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCAGAGAATCTTTATTTTCAGGGAAGGCCTTAC
CCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCA
TATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGT
GGAGGTTCCGGAGGTGGATCGGGAGGTGGATCGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATA
ACTCGAGCCTGCAGGTGAGCTCTAACTAAGTAACGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATC
ACCAGTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTT
CCCAGATAAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAA
CCCTTAGTATGATTTGTATTTGTAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAA
CCAAAATCCAGTGACCTGGATCCGGTACCGAATTC
```

Blau markiert ist die Sequenz des 35S-Terminators.

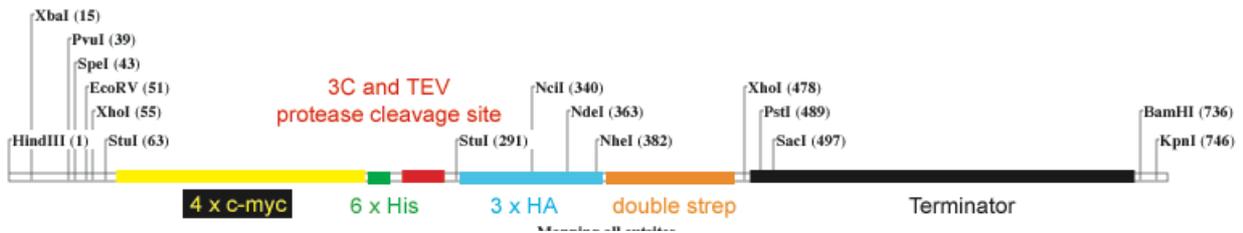


Abb. 1: SMCS mit TIA2-Tag und Terminator
schematische Darstellung der Bestandteile des TIA-Epitoptags und einiger Schnittstellen

Anhang 6: Alignment zwischen Bs3 und der bakteriellen FMO aus Methylophaga

Identität zwischen Bs3 und der bakteriellen FMO: 18,4 %

Ähnlichkeit zwischen Bs3 und der bakteriellen FMO: 60,8 % (nach ClustalW)

```

Bs3          MMNQNCFNCSPLTVDALEPKKSSCAAQCIQVNGPLIVGAGPSGLATAAVLKQYS--VPY 58
bacterialFMO ---GAMGSMATRIAILGAGP---SGMAQLRAFQSAQEKGAEIPELVCFEKQADWGGQWNY 54
          . .: :: . * * *: . . . ** . * . : : . *

Bs3          VIERADCIASLWQHKTDRRLRLNVPRQYCELPGLPFPDF----PEYPTKNQFISYLVS 114
bacterialFMO TWRTGLDENGEVHSSMYRYLWSNGPKCLEFADYTFDEHFGKPIASYPPREVLWDYIKG 114
          . * . . : . * * * *: * . . * . * . . ** : : : * : .

Bs3          YAKHFEIKP--QLNESVNLAGEYDETCGLWKVKTVSEINGSTSEYMCKWLIVATGENAEMI 172
bacterialFMO RVEKAGVRKYIRFNTAVRHVEFNEDSQTFTVTVQDHTDTIYSAAFDYVVCCTGHFSTPY 174
          . : : : : * : * . . : * . : * . . . . . . . : : : * : .

Bs3          VPEFEGLDQDFGGQVIHACEYKTGEYYTGENVLAVGCGNSGIDISLDLSQHNNANPFMVVR- 231
bacterialFMO VPEFEGFEKFGGRILHAHDFRDALEFKDKTVLLVGSYSYSAEDIGSQCYKYGAKKLISCYR 234
          ***** : : * : : * : : : . . . . . * * * . * . * . : : : * : :

Bs3          SSVQGRNFPPEEINIVPAIKKFTQKVEFVNGQILEIDSVILATGYTSNVTSWLMESELF 291
bacterialFMO TAPMGYKWPENWDERPNLVRVDTENAYFADGSSEKVDAILCTGYIHHFPFLNDDLRLVT 294
          : : * : : * : : * : : . . * : * . : * : * * * * * : . . : * :

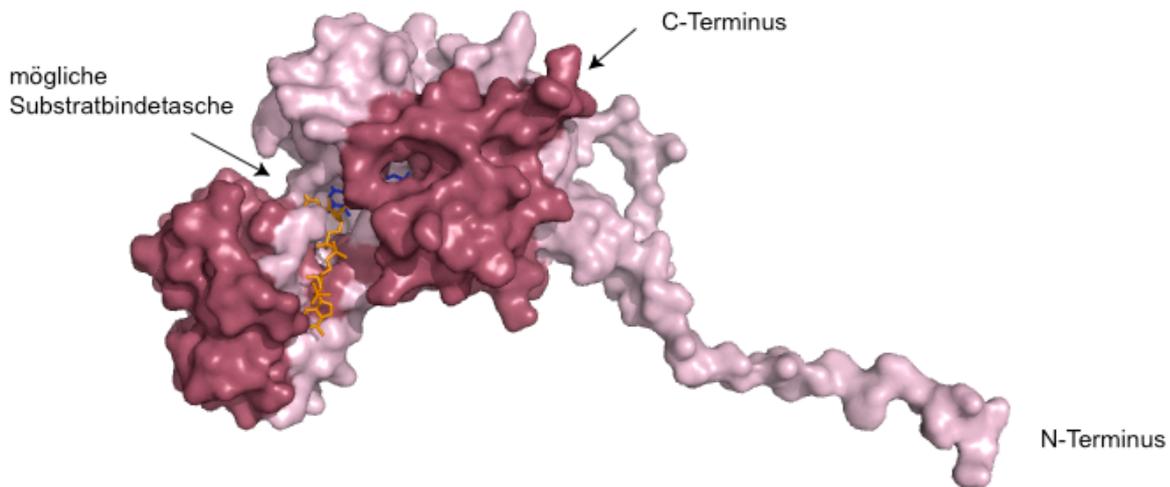
Bs3          REGCPKSPFPNG--WKGEDGLYAVGFTG----IGLFGAS-----IDATNVAQ 332
bacterialFMO NNRLWPLNLYKGVVWEDNPKFFYIGMQDQWYSFNMFDAQAWYARDVIMGRLLPLPSKEEMK 354
          . : : : * * : : : : * : . . : * : * . : : : :

Bs3          DIAKIWKEQM----- 342
bacterialFMO ADSMAWREKELTLVTAEEMYTYQGDYIQNLIDMTDYPSFDIPATNKTFLEWKHHKKENIM 414
          : * :
    
```

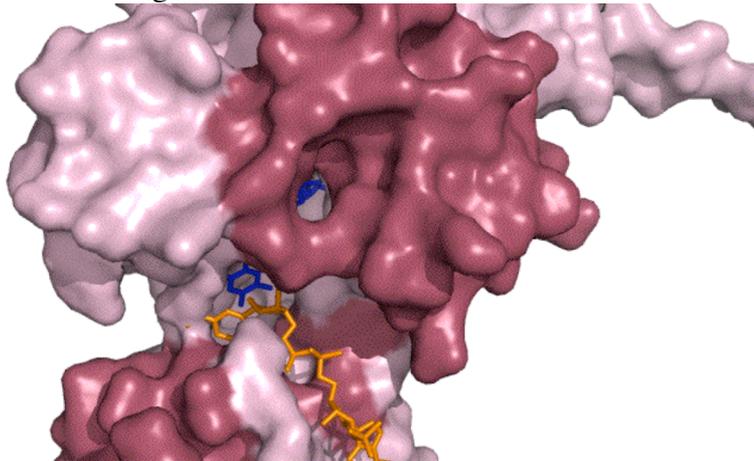
die verkürzte Bs3-Variante ist mit Bs3 von Aminosäure 1 bis 210 identisch

Anhang 7: zusätzliche Darstellungen des Bs3-Moleküls

Oberflächendarstellung des gesamten Moleküls inklusive der Cofaktoren



Ausschnitt, um ca. 45° gedreht:



für beide Abbildungen gilt folgender Farbcode:

orange: NADP

blau: FAD

magenta und weinrot: vollständige Bs3

weinrot: in der verkürzten Bs3-Variante deletierter Bereich

Abbildung modifiziert nach Jaenecke und Schornack, 2010, nicht publiziert

Anhang 8: T₁ - Test auf Anwesenheit des Transgens

ja: positiver PCR-Test, nein: Transgen unvollständig oder gar nicht nachweisbar

pER10-Bs3::GFP			pER10attR		
Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test	Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test
1-1	31	ja	3-1	33	ja
1-2	29	ja	3-2	86	ja
1-3*	tot		3-3	87	ja
1-4	71	ja	4-1	54	nein
1-5	72	ja	4-2	21	ja
1-6	73	ja	4-3	22	ja
1-7	74	ja	4-4	23	ja
4-1	tot		4-5	25	ja
4-2	32	nein	4-6*	tot	
5-1	30	nein	4-7	55	nein
5-2*	tot		4-8	24	ja
5-3	75	ja	4-9	90	ja
5-4	76	ja	4-10	89	nein
5-5	77	ja	4-11	88	nein
5-6	78	ja	5-1	19	ja
6-1	79	ja	5-2	20	ja
6-2	80	ja	5-3	81	ja
7-1	117	ja	5-4	82	ja
7-2	118	ja	5-5	83	ja
7-3	159	ja	5-6	84	ja
7-4	160	ja	5-7	85	ja
7-5	162	ja			
8-1	163	ja			
8-2	120	ja			
8-3	119	ja			
8-4	165	ja			
8-5	166	nein			
8-6	167	ja			
8-7	122	nein			
8-8	121	ja			
8-9	168	nein			
8-10	164	ja			
9-1	123	nein			
9-2	124	ja			

Anhang 8: T1 - Test auf Anwesenheit des Transgens

pER10.1-356*

Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test	Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test
1-1	49	nein	9-2	130	ja
1-2	113	ja	9-3	175	ja
1-3	26	ja	9-4	176	ja
1-4	91	nein	9-5	178	ja
1-5	58	ja	10-1	179	ja
1-6	92	nein	10-2	132	ja
2-1	50	ja	10-3	180	ja
2-2	59	ja	10-4	131	ja
2-3	93	ja	10-5	181	ja
2-4	60	nein	11-1	133	ja
3-1	51	ja	11-2	134	ja
3-2	111	ja	11-3	182	ja
3-3	94	ja	11-4	183	ja
4-1	112	ja	11-5	184	ja
4-2	52	ja	12-1	135	ja
4-3	27	ja	12-2	136	ja
4-4	95	nein	12-3	185	ja
4-5	96	nein	12-4	186	ja
4-6	97	ja	12-5	187	ja
5-1	53	ja	pER10.1		
5-2	28	nein			
5-3	tot				
5-4	98	ja	1-1	61	ja
5-5	99	ja	1-2	62	ja
5-6	100	ja	1-3	63	ja
6-1	18	ja	2-1	37	ja
6-2	101	ja	2-2	38	ja
6-3	102	nein	2-3	39	nein
6-4	57	ja	3-1	4	ja
7-1	125	ja	3-2	5	ja
7-2	126	ja	3-3	6	ja
7-3	169	ja	4-1	7	ja
7-4	170	nein	4-2	40	ja
7-5	171	nein	4-3	41	ja
8-1	172	nein	5-1	42	ja
8-2	173	ja	5-2	43	ja
8-3	127	ja	5-3	44	ja
8-4	174	ja	6-1	64	nein
8-5	128	nein	6-2	8	ja
9-1	129	nein	6-3	9	ja

Anhang 8: T1 - Test auf Anwesenheit des Transgens

pER10.2-356*			pER10.2		
Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test	Pflanze	DNA-Nummer	PCR-Test
1-2	tot		1-1	66	ja
1-3	34	ja	1-2	45	ja
3-1*	tot		1-3	65	ja
3-2	114	ja	2-1	10	ja
4-1*	tot		2-2	67	ja
4-2	35	ja	2-3	46	ja
4-3	36	ja	3-1	47	ja
4-4	104	nein	3-2	68	nein
4-5	105	nein	3-3	11	ja
5-1	109	ja	4-1	12	ja
5-2	110	ja	4-2	13	ja
5-3	56	ja	4-3	69	ja
5-4*	tot		5-1	14	ja
5-5	106	nein	5-2	15	ja
5-6	103	ja	5-3	16	ja
5-7	115	nein	6-1	17	ja
5-8	116	ja	6-2	70	nein
5-9	107	ja	6-3	48	ja
5-10	108	nein			
7-1	138	ja			
8-1	139	ja			
8-2	140	nein			
8-3	141	nein			
8-4	142	ja			
8-5	151	ja			
8-6	143	ja			
8-7	152	ja			
8-8	153	ja			
8-9	154	ja			
8-10	150	ja			
9-1	144	ja			
10-1	145	ja			
10-2	146	ja			
10-3	147	nein			
10-4	148	ja			
10-5	137	nein			
10-6	156	ja			
10-7	157	ja			
10-8	158	ja			
10-10	155	ja			

Tod nach Induktion: ja/nein; für pER10.2-356*: Einschätzung der Photonenemission nach Induktion- schwach, okay und super

pER10-Bs3::GFP

Anhang 9: Segregations- und Southern Blot Analyse der T₂

Pflanze	Nummer	grün	weiß	Verhältnis	Kopien	Kopien nach Southern	Estradiolphänotyp
1-1	31	317	143	2,2 : 1	1	1	ja
1-2	29	121	61	2,0 : 1	1		nein
1-4	71	176	179	1 : 1	1		ja
1-5	72	103	39	2,6 : 1	1		nein
1-6	73	x	x	x	?	2 oder 5	super
1-7	74	272	76	3,6 : 1	1		nein
5-3	75	71	42	1,9 : 1	1	1	okay
5-4	76		ca. 95 % tot		0		nein
5-5	77	98	48	2,04 : 1	1	1	super
6-1	79	381	149	2,6 : 1	1		nein
6-2	80	x	x	x	?	2	super
7-1	117	185	74	2,5 : 1	1		nein
7-2	118	271	81	3,3 : 1	1		nein
7-3	159	183	73	2,5 : 1	1		nein
7-4	160	178	62	2,9 : 1	1	2	super
7-5	162	186	59	3,1 : 1	1		nein
8-1	163	105	93	1,1 : 1	1		super
8-10	164	217	75	2,9 : 1	1		nein
8-2	120	197	11	17,9 : 1	2		nein
8-3	119	189	11	17,1 : 1	2		nein
8-4	165	71	46	1,5 : 1	1		nein
8-6	167	46	10	4,6 : 1	1 oder 2?	2	super
8-8	121	ca. 200	59	3,4 : 1	1		nein
9-2	124	409	119	3,4 : 1	1		nein

pER10.1-356*

Pflanze	Nummer	grün	weiß	Verhältnis	Kopien	Kopien nach Southern	Estradiolphänotyp
1-2	113	x	x	x	?		nein
1-3	26	121	61	2,0 : 1	1		nein
1-5	58	129	23	5,6 : 1	1 oder 2?		nein
2-1	50	x	x	x	?	1	ja
2-2	59	49	13	3,8 : 1	1		ja
2-3	93	x	x	x	?		nein
3-1	51	x	x	x	?	2	ja
3-2	111	107	66	1,6 : 1	1		nein
3-3	94	x	x	x	?		nein
4-1	112	131	21	6,2 : 1	1 oder 2?		nein
4-2	52	92	29	3,2 : 1	1		nein
4-3	27	x	x	x	?		ja
4-6	97	x	x	x	?		nein
5-1	53	x	x	x	?	2	ja
5-4	98	42	20	2,1 : 1	1		nein
5-5	99						nein
5-6	100	ca. 400	16	25,0 : 1	2 oder 3		nein
6-1	18	432	82	5,3 : 1	1 oder 2?		nein
6-2	101	23	5	4,6 : 1	1 oder 2?	2	ja
6-4	57	86	18	3,1 : 1	1		nein
7-1	125	370	107	3,5 : 1	1		nein
7-2	126	ca. 100	ca. 100	1 : 1	1		nein
7-3	169	124	104	1,2 : 1	1		nein
8-2	173	x	x	3,0 : 1	1		nein
8-3	127	450	82	5,5 : 1	1 oder 2?		nein
8-4	174	x	x	1 : 1	1		nein

pER10.1-356*

Pflanze	Nummer	grün	weiß	Verhältnis	Kopien	Kopien nach Southern	Estradiolphänotyp
9-2	130	250	54	4,6 : 1	1 oder 2?		nein
9-3	175	61	18	3,4 : 1	1		nein
9-4	176	183	88	2,1 : 1	1		nein
9-5	178	315	100	3,2 : 1	1		nein
10-1	179	176	56	3,1 : 1	1		nein
10-2	132	560	164	3,4 : 1	1		nein
10-3	180	180	12	15,0 : 1	2		nein
10-4	131	297	149	2,0 : 1	1		nein
10-5	181	148	26	5,7 : 1	1 oder 2?		nein
11-1	133	330	73	4,5 : 1	1 oder 2?		nein
11-2	134	239	41	5,8 : 1	1 oder 2?	1	ja
11-3	182	109	16	6,8 : 1	1 oder 2?		nein
11-4	183	271	26	10,4 : 1	2		nein
11-5	184	199	85	2,3 : 1	1		nein
12-1	135	257	101	2,5 : 1	1		nein
12-2	136	>> 200	18	>11 : 1	2		ja
12-3	185	223	61	3,7 : 1	1		nein
12-4	186	184	61	3,0 : 1	1		nein
12-5	187	ca. 150	ca. 150	ca. 1:1	1		nein

pER10.2-356*

Pflanze	Nummer	grün	weiß	Verhältnis	Kopien	Kopien nach Southern	Estradiolphänotyp
1-3	34	371	116	3,2 : 1	1		super
3-2	114	ca. 350	9	39,0 : 1	2 oder 3?		super
4-2	35	292	63	4,6 : 1	1	1	super
4-3	36	x	x	x	?	3	okay

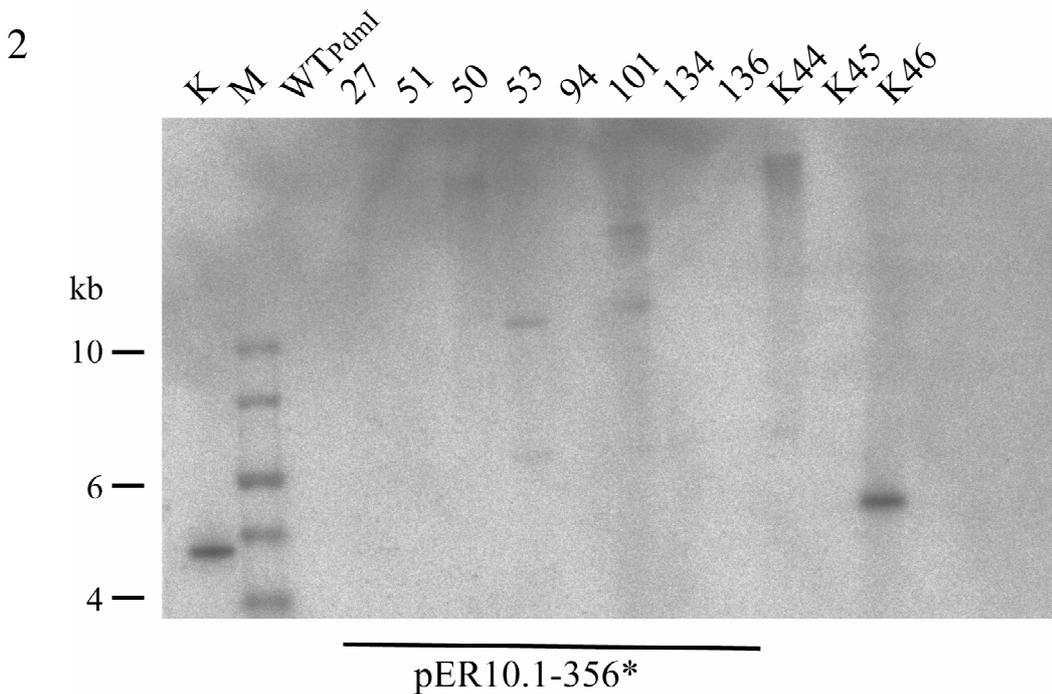
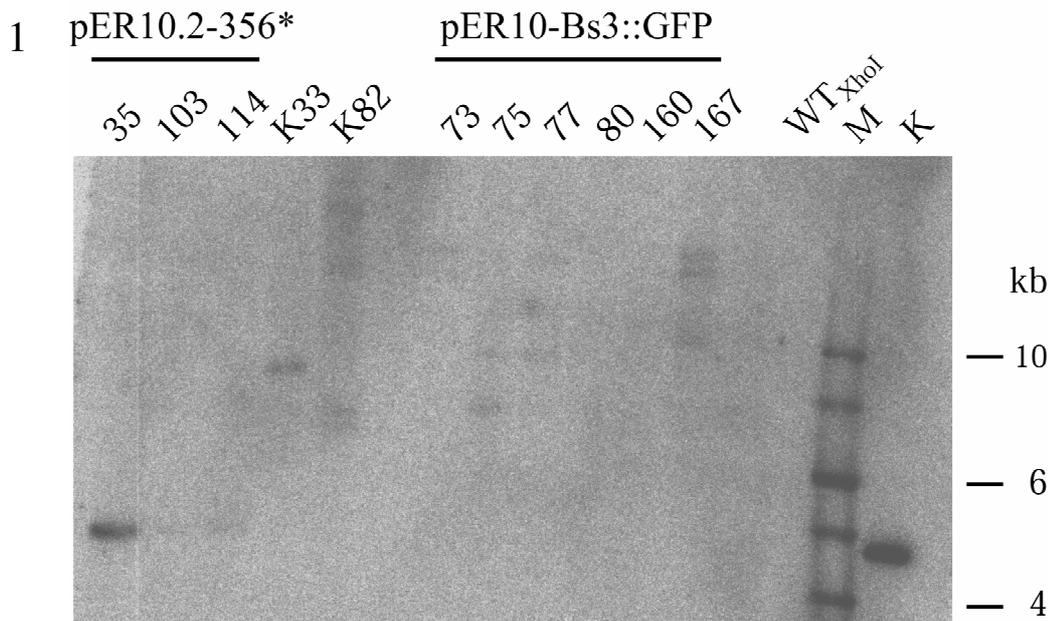
per10.2-356*

Pflanze	Nummer	grün	weiß	Verhältnis	Kopien	Kopien nach Southern	Estradiolphänotyp	
5-1	109	154	161	1 : 1	1		okay	
5-2	110	x	x	x	?		schwach	
5-3	56	176	19	9,3 : 1	2		-	
5-6	103	210	43	4,9 : 1	1	1	super	
5-8	116	ca. 300	ca. 200	1,5 : 1	1	1	okay	
5-9	107	145	145	1 : 1	1	1	okay	
7-1	138	x	x	x	?	3	okay	
8-1	139	ca. 300	184	1,6 : 1	1		okay	
8-10	150	161	44	3,7 : 1	1		okay	
8-3	141	ca. 500	47	ca. 10 : 1	2	2		
8-4	142	85	41	2,1 : 1	1		okay	
8-5	151	ca. 300	70	4,2 : 1	1 oder 2?		schwach	
8-6	143	x	x	x	?			
8-7	152	122	44	2,8 : 1	1		schwach	
8-8	153	ca. 350	10	35,0 : 1	3		schwach	
8-9	154	129	41	3,1 : 1	1		schwach	
9-1	144	213	60	3,6 : 1	1 oder 2?	1	okay	
10-1	145	16	3	5,3 : 1	1 oder 2?		okay	
10-2	146	x	x	x	?			
10-4	148	alle grün, da Platte vertrocknet und keine Selektion						okay
10-6	156	183	69	2,7 : 1	1		nein	
10-7	157	ca. 500	136	3,6 : 1	1		okay	
10-8	158	17	9	1,9 : 1	1		schwach	
10-10	155	163	21	7,8 : 1	1 oder 2?		okay	

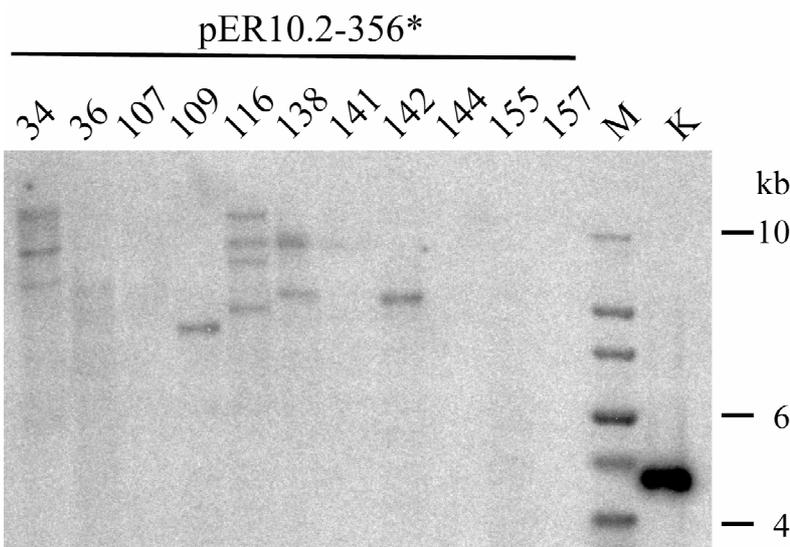
Anhang 10: Southern Blots

Abb.: Southern Blot Analysen verschiedener Linien

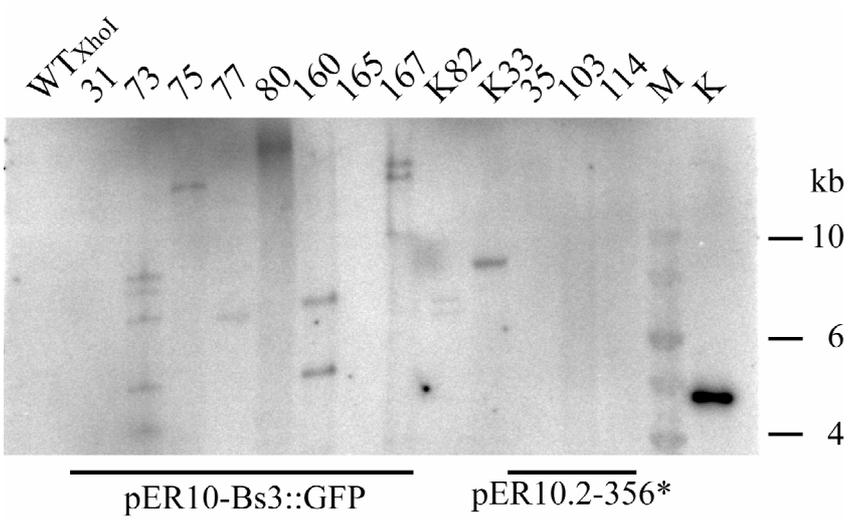
Die Blots 1 und 2 bzw. 3,4 und 5 wurden jeweils zusammen angefertigt. Bei 1 und 2 wurden alle genomischen DNAs mit dem Restriktionsenzym *XhoI* behandelt, bei 3 bis 5 wurde wie in Material und Methoden beschrieben vorgegangen. Die Ergebnisse sind im Anhang 9 zusammengefasst. Es wurde immer der gleiche Größenstandard (M, 1 kb-Ladder von Fermentas) benutzt. Als Positivkontrolle (K) diente der *BamHI*-Restriktionsverdau des Plasmids pER10attR je 167 pg.



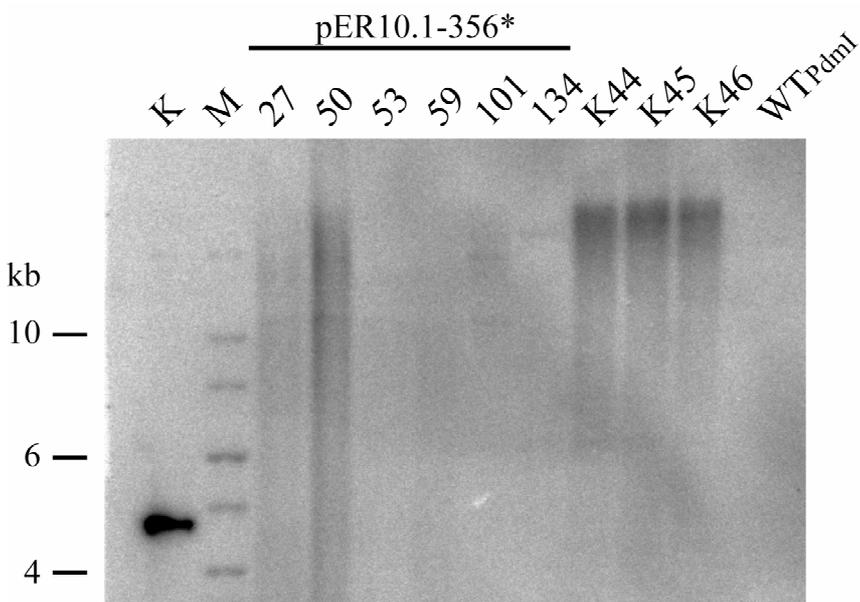
3



4



5



Anhang 11: Homozygote Tochterlinien in der T₃

Tabelle 1: Analyierte T₃ Tochterlinien

Konstrukt	Linie (DNA-Nr)	T3 homozygote Tochterlinie	Estradiolinduktion
pER10-Bs3::GFP	31	1, 2, 5, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18 (von 18)	
pER10-Bs3::GFP	77	18, 17, 16, 14, 13, 12, 9, 3, 1 (von 19)	
pER10.1-356*	27	keine von 11	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	51	10, 13 (von 13)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	59	4, 5, 12, 14 (von 16)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	94	6,8 (von 9)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	101	4, 7, 8 (von 20)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	134	1, 3, 7, 9 (von 13)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.1-356*	136	12 (von 12)	Verlust des Phänotyps!!
pER10.2-356*	35	18, 16,7, 6, 4, 2, 1 (von 20)	
pER10.2-356*	103	16, 11, 10, 8 (von 20)	Problem: nur 10 okay

Tabelle 2: bisher nicht analysierte T₃ Tochterlinien

Konstrukt	Linie	Anzahl der T3 Tochterlinien
pER10attR	33	25
pER10attR	82	18
pER10-Bs3::GFP	31	26
pER10-Bs3::GFP	73	5
pER10-Bs3::GFP	75	13
pER10-Bs3::GFP	80	11
pER10-Bs3::GFP	160	13
pER10-Bs3::GFP	167	19
pER10.1	40	18
pER10.1	44	18
pER10.1-356*	50	13
pER10.1-356*	53	11
pER10.2	45	18
pER10.2	46	18
pER10.2-356*	34	19
pER10.2-356*	36	16
pER10.2-356*	107	6
pER10.2-356*	109	11
pER10.2-356*	110	12
pER10.2-356*	116	13
pER10.2-356*	138	12
pER10.2-356*	139	12
pER10.2-356*	141	12
pER10.2-356*	142	3
pER10.2-356*	142	16
pER10.2-356*	144	13
pER10.2-356*	157	13

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M₂

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-2-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-2-3	nein		Saatgut
77-2-5	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-2-6	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-2-7	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-2-8	nein		
77-2-9	nein		Saatgut
77-2-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-4	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-5	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-6	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-3-7	nein		Saatgut
77-3-8	nein		Saatgut
77-3-11	nein		Saatgut
77-3-13	nein		Saatgut
77-3-15	nein		Saatgut
77-5-3	nein		Saatgut
77-5-5	nein		
77-5-8	nein		Saatgut
77-5-13	nein		
77-6-1	nein		Saatgut
77-6-2	nein		Saatgut
77-6-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-6-4	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-5	nein		Saatgut
77-6-6	nein		Saatgut
77-6-7	nein		Saatgut
77-6-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-6-9	nein		Saatgut
77-6-10	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-11	nein		Saatgut
77-6-12	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-13	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-6-14	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-15	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-16	nein		Saatgut
77-6-17	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-6-18	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-6-19	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-20	nein		Saatgut
77-6-21	nein		Saatgut
77-6-22	nein		Saatgut
77-6-23	nein		Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-6-24	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-25	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-6-26	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-6-28	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-6-29	nein		Saatgut
77-6-30	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-8-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-8-2	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-8-3	nein		Saatgut
77-8-4	??	fehlerfrei	Saatgut
77-8-5	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-8-6	nein		
77-9-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-9-3	nein		Saatgut
77-9-5	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-9-7	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-1	nein		Saatgut
77-10-2	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-10-3	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-10-4	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-10-5	ja	509 u 511 A>G	Saatgut
77-10-6	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-8	nein		Saatgut
77-10-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-10	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-10-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-12	in Spaltöffnungen		Saatgut
77-10-13	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-14	nein		Saatgut
77-10-16	nein		Saatgut
77-10-17	nein		
77-10-18	nein		Saatgut
77-10-19	nein		Saatgut
77-10-20	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-21	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-10-23	nein		Saatgut
77-10-24	nein		Saatgut
77-10-26	nein		Saatgut
77-10-27	nein		
77-10-28	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-10-29	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-11-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-4	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-11-5	nein		Saatgut
77-11-6	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-11-8	ja	fehlerfrei	Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-11-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-14	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-11-15	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-16	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-11-17	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-19	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-20	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-11-22	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-11-23	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-12-2	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-12-3	nein		Saatgut
77-12-4	nein		
77-12-5	nein		
77-12-6	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-7	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-9	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-12-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-12	nein		
77-12-13	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-14	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-15	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-16	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-18	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-19	nein		Saatgut
77-12-20	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-12-23	nein		Saatgut
77-12-24	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-27	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-12-28	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-12-29	nein		Saatgut
77-13-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-4	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-5	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-6	nein		Saatgut
77-13-7	ja		Saatgut
77-13-8	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-11	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-13	nein		Saatgut
77-13-14	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-15	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-16	nein		Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-13-17	nein		Saatgut
77-13-18	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-19	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-20	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-21	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-22	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-23	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-24	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-25	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-26	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-27	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-28	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-29	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-30	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-31	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-13-32	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-33	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-13-34	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-14-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-14-2	nein		Saatgut
77-14-3	nein		Saatgut
77-14-4	nein		Saatgut
77-14-5	nein		Saatgut
77-14-6	nein		Saatgut
77-14-7	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-14-8		fehlerfrei	Saatgut
77-14-9	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-14-10	ja		
77-15-3	nein		
77-15-8	ja, gelb	fehlerfrei	Saatgut
77-15-9	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-15-10	nein		
77-16-1	nein		Saatgut
77-16-2	nein		Saatgut
77-16-3	ja	fehlerfrei	
77-16-4	nein		
77-16-5	nein		Saatgut
77-16-6	nein		
77-16-7	nein		
77-16-8	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-9	nein		Saatgut
77-16-10	nein		Saatgut
77-16-11	nein		
77-16-12	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-13	nein		Saatgut
77-16-14	nein		Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-16-15	nein		Saatgut
77-16-16	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-17	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-18	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-19	nein		Saatgut
77-16-20	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-16-21	in Spaltöffnungen		Saatgut
77-16-22	nein		
77-16-23	ja		Saatgut
77-16-24	nein		Saatgut
77-16-25	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-26	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-27	nein		Saatgut
77-16-28	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-16-29	nein		Saatgut
77-17-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-4	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-17-5	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-6	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-7	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-13	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-14	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-15	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-16	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-17	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-17-18	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-19	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-20	nein		Saatgut
77-17-21	nein		Saatgut
77-17-22	nein		Saatgut
77-17-23	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-24	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-17-25	nein		Saatgut
77-17-26	nein		Saatgut
77-17-27	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-18-1	ja		Saatgut
77-18-8	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-19-1	nein		
77-19-3	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-19-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-19-17	in Spaltöffnungen		Saatgut
77-20-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-20-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-21-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-14	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-15	beginnend. Zelltod		Saatgut
77-21-19	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-21-20	in Spaltöffnungen		Saatgut
77-21-21	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-21-24	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-23-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-4	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-5	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-6			Saatgut
77-23-7	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-9	nein		Saatgut
77-23-10	nein		
77-23-11	nein		
77-23-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-23-13	nein		Saatgut
77-23-14	nein		Saatgut
77-23-15	nein		
77-23-16	nein		
77-23-17	nein		Saatgut
77-23-18	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-23-22	nein		Saatgut
77-23-23	nein		
77-23-24	nein		Saatgut
77-23-26	nein		
77-23-27	nein		
77-23-28	nein		Saatgut
77-23-29	nein		Saatgut
77-23-31	nein		
77-23-32	nein		
77-23-33	nein		
77-23-34	nein		
77-24-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-24-2	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-24-3	nein		Saatgut
77-24-5	ja	fehlerfrei	Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-24-6	nein		Saatgut
77-24-7	nein		Saatgut
77-24-8	nein		Saatgut
77-24-9	nein		Saatgut
77-24-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-24-11	nein		
77-24-12	ja		Saatgut
77-24-13	ja	fehlerfrei	
77-25-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-27-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-27-2	nein		Saatgut
77-27-3	ja	fehlerfrei	
77-27-4	nein		Saatgut
77-27-5	nein		Saatgut
77-27-6	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-27-7	nein		
77-27-8	nein		
77-27-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-27-10	ja	fehlerfrei	
77-27-11	nein		Saatgut
77-27-12	nein		Saatgut
77-27-13	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-27-14	nein		Saatgut
77-27-15	nein		Saatgut
77-27-16	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-27-17	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-27-18	nein		Saatgut
77-27-19	ja		Saatgut
77-27-20	nein		Saatgut
77-27-21	nein		Saatgut
77-27-22	nein		Saatgut
77-28-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-28-2	nein		Saatgut
77-28-3	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-28-4	ja	fehlerfrei	
77-28-5	nein		
77-28-6	nein		Saatgut
77-28-7	nein		
77-28-8	nein		Saatgut
77-29-1	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-29-2	nein		Saatgut
77-29-3	nein		Saatgut
77-29-4	nein		Saatgut
77-29-5	nein		Saatgut
77-29-6	nein		Saatgut
77-29-7	in Kernen	fehlerfrei	Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-29-8	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-29-9	nein		Saatgut
77-29-10	nein		Saatgut
77-29-11	ja		Saatgut
77-29-12	nein		Saatgut
77-29-13	nein		Saatgut
77-30-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-3	nein		Saatgut
77-30-4	nein		Saatgut
77-30-5	nein		Saatgut
77-30-6	nein		Saatgut
77-30-7	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-8	nein		Saatgut
77-30-9	nein		Saatgut
77-30-10	nein		Saatgut
77-30-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-12	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-13	nein		Saatgut
77-30-14	nein		Saatgut
77-30-15	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	
77-30-16	nein		Saatgut
77-30-17	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-18	nein		Saatgut
77-30-19	nein		Saatgut
77-30-20	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-21	in Kernen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-23	nein		Saatgut
77-30-24	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-25	nein		Saatgut
77-30-26	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-27	nein		Saatgut
77-30-28	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-29	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-30	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-30-31	nein		Saatgut
77-30-32	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-33	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-34	nein		Saatgut
77-30-35	nein		Saatgut
77-30-36	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-30-37	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-33-10	nein		Saatgut
77-33-11	nein		
77-33-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-33-13	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-33-17	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-39-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut

Anhang 12: Details Überlebende nach Induktion der M2

Name	GFP Mikroskop	Sequenzierung Bs3	Saatgut vorhanden
77-39-15	nein		
77-39-16	nein		
77-39-20	nein		
77-39-21	nein		
77-39-22	nein		
77-40-3	ja		Saatgut
77-40-5	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-40-6	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-40-12	nein		Saatgut
77-43-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-43-2	ja		Saatgut
77-43-3	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-43-4	ja		Saatgut
77-43-5	nein		Saatgut
77-43-6	nein	fehlerfrei	Saatgut
77-43-7	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-43-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-43-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-43-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-43-11	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-44-1	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-2	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-44-3	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-4	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-5	nein		Saatgut
77-44-6	in Spaltöffnungen		Saatgut
77-44-7	ja		Saatgut
77-44-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-44-9	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-10	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-11	nein		Saatgut
77-44-12	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-13	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-44-14	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-45-1	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-2	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-45-3	nein		Saatgut
77-45-4	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-45-5	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-6	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-7	ja	fehlerfrei	Saatgut
77-45-8	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-9	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-10	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-11	nein		Saatgut
77-45-12	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut
77-45-13	in Spaltöffnungen	fehlerfrei	Saatgut

Danksagung

Für die Vergabe des sehr interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten und vor allem die kontinuierliche Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. U. Bonas bedanken.

Herrn Dr. Th. Lahaye möchte ich für die sehr gute Betreuung und Hilfestellung während der Arbeit danken. Besonders seine weiterhelfende Kritik und immer währende Diskussionsbereitschaft, mit der er mir wertvolle Anregungen und neue Blickwinkel vermittelte, möchte ich hervorheben.

Bei Frau Kretzschmar bedanke ich mich für die methodische Unterstützung bei den zahlreichen Sequenzierungen, sowie bei Frau Roszinsky für die Anzucht und Pflege unzähliger Tabak- und Paprikapflanzen.

Dr. J. Fuchs danke ich für seine Kooperation im Rahmen der Arbeiten des Graduiertenprogramms. Dr. I. Hofmann möchte ich für seine methodischen Hinweise und seine Geduld bei immer neuen Fragen zum Umgang mit Arabidopsispflanzen sowie zur Fehlersuche bei Southern Blot Analysen danken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bonas möchte ich für die angenehme und entspannte Atmosphäre im Laboralltag und die fachliche und methodische Assistenz danken. Dabei möchte ich besonders Annett, Eva, Jana, Sabine, Sebastian und Patrick hervorheben, die mir gerade in der Anfangs- oder Endphase wertvolle Hinweise und Ratschläge gaben.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre Unterstützung und manchmal nötige Ablenkung in dieser Zeit danken. Ohne euch wäre nichts hiervon möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Cornelia Jaenecke (geb. Pabst)
Anschrift Lessingstr. 45 in 06114 Halle/Saale
Geburtsdatum 06.09.1981
Geburtsort Leipzig

Ausbildung:

09/1988 - 08/1992 70. Grundschule in Leipzig
09/1992 - 08/1993 Leibniz - Schule, Gymnasium in Leipzig
09/1993 - 07/2000 W.-Ostwald-Schule, Gymnasium mit vertieftem mathematisch-naturwissenschaftlichen Profil in Leipzig
Abschluss: Abitur

10/2000 - 09/2005 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biochemiker

11/2004 - 07/2005 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Gläser
Thema: „Einfluss von Genen des Notch-Signalweges auf das Alagille-Syndrom“

03/2006 – 06/2010 Promotion am Institut für Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas, Forschungsgruppe Dr. Th. Lahaye
Thema: „Etablierung und Durchführung verschiedener Sichtungen zur Identifizierung von Signalwegkomponenten der Paprika-Bs3-vermittelten Resistenzreaktion“

03/2006 - 07/2009 Stipendium des Graduiertenprogramms „Pflanzliche Proteinkomplexe – Struktur, Funktion und Evolution“

seit 06/2010 Mutterschutz und Elternzeit

Halle/Saale, den 20.09.2010

Selbstständigkeitserklärung

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

Halle/Saale, den 20.09.2010

Cornelia Jaenecke