

Transkriptom-Analyse von Tomatenpflanzen nach Infektion mit *Xanthomonas*

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Oliver A. Müller

geb. am 09.04.1984 in Schkeuditz

Gutachter:

Prof. Dr. Ulla Bonas

Prof. Dr. Sabine Rosahl

Prof. Dr. Anke Becker

Tag der Verteidigung: 14.08.2016

Ein Teil dieser Arbeit wurde in einer Fachzeitschrift publiziert:

Müller, O. A., Grau, J., Thieme, S., Prochaska, H., Adlung, N., Sorgatz, A., & Bonas, U. (2015). „*Genome-Wide Identification and Validation of Reference Genes in Infected Tomato Leaves for Quantitative RT-PCR Analyses.*“ *PLoS ONE*, **10**(8), e0136499.

Zusammenfassung

Typ III-Effektorproteine (T3E) sind essentielle Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), die über das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) direkt in das Zytoplasma von Pflanzenzellen transloziert werden. Dort lokalisieren T3E in verschiedene Zellkompartimente und interferieren mit pflanzlichen Proteinen oder DNA, um zelluläre Prozesse zum Vorteil von *Xcv* zu verändern.

Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen gehen meist mit einer drastischen Veränderung des Transkriptomts beider Interaktionspartner einher. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von *Microarray*-Analysen der Einfluss von *Xcv* auf das Transkriptom der Wirtspflanze *S. lycopersicum* in Abhängigkeit eines funktionellen T3SS analysiert. Durch die Infektion mit dem T3SS-defizienten Stamm *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* war die Transkriptmenge von 2.856 der 34.383 annotierten *S. lycopersicum*-Genen verändert, von denen mutmaßlich viele Gene an der pflanzliche Immunantwort beteiligt waren. Durch die Translokation von T3E während der Infektion mit dem Wildtypstamm *Xcv* 85-10 war hingegen die Transkriptmenge von 2.035 Genen verändert. Die Transkriptmenge von 968 Genen war sowohl während der pflanzlichen Immunantwort erhöht bzw. vermindert, als auch T3E-abhängig gegenläufig verändert. Eine Vielzahl dieser Gene wurde bekannten pflanzlichen Abwehrmechanismen zugeordnet, was die Unterdrückung dieser Abwehrmechanismen durch *Xcv*-T3E nahelegt. Transkriptomanalysen von *S. lycopersicum* nach *Agrobacterium*-vermittelter transiente Synthese einzelner T3E zeigten, dass XopL vermutlich den ABA-Hormonsignalweg und XopS möglicherweise die Integrität pflanzlicher Zellwände beeinflusst.

Zudem wurden anhand aller Transkriptomdaten eine Vielzahl bisher nicht in der Pathogenabwehr beschriebener Gene identifiziert, welche Möglichkeiten für weitere Analysen eröffnen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden auf Grundlage der Transkriptomdaten für qRT-PCR-Analysen von *S. lycopersicum* unter *Xcv*-Infektionsbedingungen optimale Referenzgene identifiziert, *SIPHD* und *SILSM7*, die häufig verwendeten Referenzgenen überlegen sind. Homologie-basiert wurden *CaPHD* und *CaUCH* für das Paprika-*Xcv*-Pathosystem als geeignetes Referenzgen-Paar identifiziert.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf dem T3E-Protein XopI, für welches durch ein N-terminales F-Box-Motiv die Integration in SCF-Komplexe zur Degradation pflanzlicher Proteine vermutet wurde. Mittels Hefe-Dihybrid-Sichtungen wurden verschiedene pflanzliche Interaktionspartner identifiziert, deren vermutliche Funktion einen Einfluss von XopI auf die Apertur von Stomata von Wirtspflanzen vermuten ließ. Dazu zählt das ABC-Transporter-ähnliche Protein *SIALP*, dessen Interaktion mit XopI *in planta* bestätigt werden konnte. Tatsächlich konnte durch Stomata-Assays ein Einfluss von XopI auf die stomatale Immunität von *S. lycopersicum* bestätigt werden.

Summary

Type III-effector proteins (T3E) are essential virulence factors of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), which are translocated directly into the cytoplasm of plant cells by the Type III-secretion system (T3SS). There they localize in different cell compartments and interfere with plant proteins or DNA, to alter cellular processes to the advantage of *Xcv*.

Plant-pathogen-interactions often come along with radical changes of both, the transcriptome of the host and the pathogen. In this study, using microarray-analysis, changes of the transcriptome of infected *S. lycopersicum* plants were studied with regard to a functional T3SS. Caused by the infection with the T3SS-deficient strain *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*, 2,856 of 34,383 annotated *S. lycopersicum* genes were altered in their transcript abundance, of which several genes presumably are involved in plant defense responses. However, due to the translocation of T3E during the infection with the wild type strain *Xcv* 85-10, the transcript abundance of 2,035 *S. lycopersicum* genes was altered. The transcript abundance of an intersection of 968 genes was both, altered during plant defense responses during infection with *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* and T3E-dependently altered in the opposite direction. A multitude of these genes were assigned to plant defense responses, indicating the suppression of these responses by T3E. Transcriptomics of *S. lycopersicum* after *Agrobacterium*-mediated transient synthesis of single T3E showed, that XopL probably affects the ABA hormone signaling pathway and XopS possibly has an impact on plant cell wall integrity.

Besides, with the help of this transcriptome data of *S. lycopersicum*, a multitude of genes were newly subjected to plant defense responses, by what possibilities for further studies are enabled. In another part of this study, on the basis of the generated transcriptome data, *SIPHD* and *SILSM7* were identified as optimal reference genes for qRT-PCR analysis of the tomato-*Xcv*-pathosystem. Furthermore, homology-based, *CaPHD* and *CaUCH* were identified as suitable reference genes for qRT-PCR analysis of the pepper-*Xcv*-pathosystem. All of these newly identified reference genes showed significant better normalization results than commonly used reference genes.

Another focus of this study was the T3E XopI, which is known to harbor a N-terminal F-box motive, with the help of which XopI presumably integrates in plant SCF-complexes to promote the degradation of plant proteins. Using Yeast-two-hybrid interaction studies, several putative plant interaction partners of XopI were identified, whose potential function raises the assumption, that XopI maybe influences the aperture of plant stomata. Especially the ABC-transporter-like protein *SIALP* affects a currently unknown pathway leading to stomatal closure. Actually, in this study both was verified, the interaction of XopI and *SIALP* *in planta* and an influence of XopI on stomatal closure using stomata assays.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Summary	III
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Interaktion zwischen phytopathogenen Bakterien und deren Wirtspflanzen.....	1
1.2 Die Basalabwehr der Pflanze	2
1.3 Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien	5
1.4 Spezifische pflanzliche Resistenz durch Erkennung von Typ III-Effektoren.....	6
1.5 Der Einfluss bakterieller Effektorproteine auf pflanzliche Abwehrprozesse	7
1.6 Einfluss von T3Es auf das pflanzliche Transkriptom	10
1.7 Phytopathogene Bakterien der Gattung <i>Xanthomonas</i>	11
1.7.1 Charakteristika des sequenzierten Stammes Xcv 85-10	12
1.8 Zielstellung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Nährmedien und Antibiotika	17
2.1.2 Pflanzenmaterial	18
2.1.3 Bakterien- und Hefestämme	19
2.1.4 Puffer und Lösungen	20
2.1.5 Vektoren und Plasmide	20
2.1.6 Oligonukleotide	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.2 Biochemische Methoden	30
2.2.3 <i>Microarray</i> -Analysen.....	35
3 Ergebnisse.....	39
3.1 <i>Xcv</i> -induzierte Änderungen des Transkriptoms von <i>S. lycopersicum</i>	39
3.1.1 Transkriptomanalysen infizierter <i>S. lycopersicum</i> -Blätter.....	39
3.1.2 Validierung ausgewählter Gene mittels quantitativer RT-PCR.....	44

3.1.3	Vergleich T3SS-abhängig regulierter Gene mit Genen der Basalabwehr von <i>S. lycopersicum</i>	46
3.1.4	Funktionelle Kategorisierung T3SS-abhängig differentiell exprimierter Gene	47
3.1.5	Identifizierung differentiell exprimierter <i>S. lycopersicum</i> -Gene nach Expression einzelner Xcv-T3E	51
3.1.6	Verifizierung differentiell exprimierter Gene nach Expression von XopL	54
3.1.7	Funktionelle Kategorisierung differentiell exprimierter Gene nach Expression einzelner T3E	55
3.2	Genom-weite Identifizierung und Validierung von Referenzgenen in <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i> für quantitative RT-PCR-Analysen	60
3.2.1	Selektion geeigneter Referenzgene für Expressionsstudien im Tomate-Xcv-Pathosystem	60
3.2.2	Vergleich der Kandidaten-Referenzgene mit traditionell verwendeten Referenzgenen in <i>S. lycopersicum</i>	62
3.2.3	Homologie-basierte Identifizierung von Kandidaten-Referenzgenen für das Paprika-Xcv-Pathosystem	63
3.2.4	Verifizierung der Kandidaten-Referenzgene und Vergleich mit traditionell verwendeten Referenzgenen im Tomate- bzw. Paprika-Xcv-Pathosystem	64
3.2.5	qRT-PCR-basierte Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene in <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i> für kompatible und nicht-kompatible Interaktionen	69
3.3	Funktionelle Charakterisierung des Effektorproteins XopI	73
3.3.1	Analyse der Interaktion von XopI mit Skp1 in pflanzlichen SCF-Komplexen	73
3.3.2	Lokalisierungsstudien der potentiellen XopI-Interaktoren in <i>N. benthamiana</i>	80
3.3.3	Interaktionsstudien von XopI mit potentiellen XopI-Interaktoren mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	83
3.3.4	Analyse des Einflusses von XopI auf die Stomata-abhängige Pathogenabwehr von <i>S. lycopersicum</i>	85
4	Diskussion und Ausblick	89
4.1	Xcv beeinflusst das Transkriptom von <i>S. lycopersicum</i>	89
4.1.1	Kritische Betrachtung der erhobenen Transkriptomdaten	89
4.1.2	Xcv-T3E-Proteine supprimieren die Immunantwort von <i>S. lycopersicum</i>	91
4.1.3	Xcv-T3E-abhängig regulierte Gene sind oft Teil pflanzlicher Hormonsignalwege	91
4.1.4	Xcv-T3E hemmen pflanzliche Signalwege der PTI	94
4.1.5	Xcv-T3E beeinflussen zu späteren Infektionszeitpunkten den Metabolismus von <i>S. lycopersicum</i>	96
4.1.6	Modell der Xcv-T3E-abhängigen Veränderung der Abwehr von <i>S. lycopersicum</i>	99

4.1.7	Ausblick	100
4.2	Die Transkriptomdaten identifizieren bisher unbekannte Kandidaten- Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i>	101
4.2.1	<i>PHD</i> und <i>LSM7</i> sind das für das Tomate- <i>Xcv</i> -Pathosystem optimale Referenzgen-Paar	103
4.2.2	<i>UCH</i> und <i>PHD</i> sind ein für das Paprika- <i>Xcv</i> -Pathosystem geeignetes Referenzgen-Paar	103
4.3	Funktionelle Charakterisierung des <i>Xcv</i> -Effektorproteins Xopl	105
4.3.1	Xopl integriert vermutlich in spezifische SCF-Komplexe	105
4.3.2	<i>SIALP</i> und <i>SIARC6</i> sind mögliche pflanzliche Zielproteine von Xopl	106
5	Literaturverzeichnis	111
6	Anhang	125
	Lebenslauf	141
	Erklärung	143

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pflanzliche <i>PTI</i> -Reaktionen nach Pathogenperzeption	3
Abb. 2: Molekulare Ziele von T3E-Proteinen in der Pflanzenzelle	9
Abb. 3: Experimentelle Ansätze zur Analyse des <i>S. lycopersicum</i> -Transkriptoms nach <i>Xcv</i> -Infektion	41
Abb. 4: Einfluss von <i>Xcv</i> auf das Transkriptom von <i>S. lycopersicum</i>	43
Abb. 5: Vergleich <i>Xcv</i> -T3SS-abhängig regulierter Gene mit Gene der Basalabwehr von <i>S. lycopersicum</i>	46
Abb. 6: Immunoblot zur Synthese der GFP-Effektorfusionen in <i>S. lycopersicum</i> -Blättern	51
Abb. 7: Experimenteller Ansatz zur Analyse des <i>S. lycopersicum</i> -Transkriptoms nach transienter Synthese einzelner <i>Xcv</i> -T3E-Proteine	52
Abb. 8: Verifizierung <i>XopL</i> -spezifisch regulierter Gene von <i>S. lycopersicum</i> mittels qRT-PCR	55
Abb. 9: Transkriptmengen von traditionell verwendeten Referenzgenen und <i>TAF6</i> aus <i>S. lycopersicum</i>	63
Abb. 10: Gelelektrophorese nach Amplifikation der Kandidaten-Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i>	64
Abb. 11: Transkriptabundanz aller untersuchten Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i>	66
Abb. 12: Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i> mittels <i>geNorm</i> - und <i>NormFinder</i> -Algorithmus	68
Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher Referenzgen-Paare auf die Bestimmung der Transkriptabundanz von <i>PTI</i> - und <i>ETI</i> -Genen mittels qRT-PCR	70
Abb. 14: Relative Expression der Gene für Aktin und GAPDH in <i>S. lycopersicum</i> bzw. EF-1 α und GAPDH in <i>C. annuum</i> nach Infektion mit <i>Xcv</i>	72
Abb. 15: Ko-Immunopräzipitation von <i>XopI</i> und <i>S/Skp1</i> bzw. <i>CaSkp1</i> aus <i>N. benthamiana</i> -Blättern	74
Abb. 16: Analyse der Interaktion von <i>XopI</i> und <i>CaSkp1</i> <i>in vitro</i> mittels <i>GST-pull-down</i> -Analysen	75
Abb. 17: Analyse der Interaktion von <i>XopI</i> mit ASK-Proteinen aus <i>A. thaliana</i> in Hefe	76
Abb. 18: Analyse der Interaktion von <i>XopI</i> und den Kandidaten-Proteinen in Hefe.....	80
Abb. 19: Lokalisierungsstudien der potentiellen <i>XopI</i> -Interaktoren in <i>N. benthamiana</i>	82
Abb. 20: Analyse der Interaktion von <i>XopI</i> mit potentiellen Interaktionspartnern mittels BiFC	84
Abb. 21: <i>XopI</i> beeinflusst die Apertur der Stomata von <i>S. lycopersicum</i>	87
Abb. 22: Schema <i>Xcv</i> -T3E-abhängig beeinflusster Prozesse von <i>S. lycopersicum</i>	100
Abb. 23: Vergleich der Proteinsequenzen von <i>CaSkp1</i> , <i>S/Skp1</i> und ausgewählten ASK-Proteinen aus <i>A. thaliana</i>	106
Abb. 24: Modell zum Einfluss von <i>XopI</i> auf Stomata suszeptibler Wirtspflanzen	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verifizierte Effektorproteine von <i>Xcv</i> 85-10 und deren biologische Funktion	14
Tabelle 2:	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.....	17
Tabelle 3:	Verwendete Antibiotika.....	18
Tabelle 4:	Konzentrationen von Aminosäuren und Nukleotiden in Hefemedien	18
Tabelle 5:	Verwendete Bakterienstämme	19
Tabelle 6:	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	19
Tabelle 7:	Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 8:	Verwendete Antikörper.....	31
Tabelle 9:	qRT-PCR-basierte Validierung der <i>Microarray</i> -Daten für ausgewählte <i>S. lycopersicum</i> -Gene.....	45
Tabelle 10:	Expressionsmuster <i>Xcv</i> -T3SS-abh. regulierter Markergene des Hormonhaushaltes von <i>S. lycopersicum</i>	48
Tabelle 11:	Expressionsmuster T3SS-abh. regulierter Markergene der Signaltransduktion und Abwehr von <i>S. lycopersicum</i>	49
Tabelle 12:	Expressionsmuster T3SS-abh. regulierter Markergene des Metabolismus von <i>S. lycopersicum</i>	50
Tabelle 13:	Differentiell exprimierte Gene von <i>S. lycopersicum</i> nach transienter Expression von GFP-XopB, -XopG, -XopI, -XopL, -XopQ oder -XopS	53
Tabelle 14:	AvrBs3-abhängig regulierte <i>S. lycopersicum</i> -Gene	54
Tabelle 18:	Kandidaten-Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> mit stabiler Transkriptabundanz im <i>Microarray</i> und orthologe Gene aus <i>C. annuum</i>	61
Tabelle 19:	Funktionelle Kategorisierung der Kandidaten-Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i>	61
Tabelle 20:	Für <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i> traditionell verwendete Referenzgene	62
Tabelle 21:	Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene aus <i>S. lycopersicum</i> und <i>C. annuum</i> mittels <i>BestKeeper</i> -Algorithmus	69
Tabelle 22:	Zahl der durch Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen selektierten und auf Spezifität überprüften Transformanden.....	78
Tabelle 23:	Ausgewählte potentielle Interaktoren von BD _{Gal4} -XopI oder BD _{Gal4} -XopI _{ΔF-Box} aus <i>C. annuum</i>	78
Tabelle 24:	Zusammenfassung der Lokalisierungs- und Interaktionsstudien potentieller XopI-Interaktoren	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
AD _{Gal4}	Gal4-Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASK	Arabidopsis-Skp1-like (Skp1-Proteinfamilie in <i>A. thaliana</i>)
BD _{Gal4}	Gal4-Bindedomäne
Bp	Basenpaare
Bs	bacterial spot disease resistance gene
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Cytosin-Nukleotid
Ca	Capsicum annuum (Paprika)
cDNA	complementary-DNA
CDPK	Ca ²⁺ -dependent proteine kinase
cfu	colony forming unit, Zahl der Einzelkolonien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E1-Enzym	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2-Enzym	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3-Enzym	Ubiquitin-Ligase
ECL	enhanced chemiluminescence, Detektionsverfahren für Westernblot-Analysen
ECW	<i>Early Calwonder</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETI	effector-triggered immunity, Effektor-induzierte Immunität
EtOH	Ethanol
fwd	forward, vorwärts
G	Guanin-Nukleotid
Gent ^R	Gentamycin-Resistenz
GST	Glutathion-S-Transferase
HR	hypersensitive response, Hypersensitive Reaktion
hrp	hypersensitive response and pathogenicity
Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
KBE	kolonie-bildende Einheiten
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobasen
LB	lysogeny broth
(k)Da	(Kilo-)Dalton
MAPK	mitogen-activated proteine kinase
MCS	multi cloning site, Multiklonierungsstelle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>PTI</i>	<i>PAMP-triggered immunity</i> , <i>PAMP</i> -induzierte Immunität
pv.	pathovar, Pathogen-Varietät
qRT-PCR	quantitative <i>reverse-transcription</i> -PCR
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
<i>RLCK</i>	<i>receptor-like cytoplasmatic kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>ROS</i>	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Skp1	<i>S-phase kinase associated protein 1</i>
SI	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)
Spp.	Subspezies
T	Thymin-Nukleotid
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> + Tween
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Ub	Ubiquitin
WT	Wildtyp
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Die Interaktion zwischen phytopathogenen Bakterien und deren Wirtspflanzen

Durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Lebensräume und Umweltbedingungen sind Bakterien, neben Pilzen und Viren, verbreitete Krankheitserreger für Tiere und Pflanzen. Infektionskrankheiten stellen daher sowohl die Medizin als auch das Agrarwesen vor große Herausforderungen. Phytopathogene Bakterien sind überwiegend Gram-negativ und verursachen jedes Jahr hohe Ernteverluste, sodass molekularbiologischen und biotechnologischen Forschungsarbeiten an Interaktionen zwischen pathogenen Bakterien und Wirtspflanzen eine große Bedeutung zukommt (1).

Pflanzen besitzen im Gegensatz zu vielen Tieren kein durch spezialisierte Zellen organisiertes Immunsystem. Trotzdem besitzen Pflanzen eine Vielzahl von Abwehrmechanismen, wodurch es meist nur angepassten Bakterien gelingt, Wirtspflanzen erfolgreich zu kolonisieren. Abwehrmechanismen, die als „angeborene Immunität“ (oder Nicht-Wirts-Resistenz) bezeichnet werden, verhindern eine Infektion durch die meisten phytopathogenen Bakterien, sodass die erfolgreiche Infektion einzelner Pflanzenspezies durch phytopathogene Bakterien die Ausnahme darstellt (2).

Sowohl bakterielle Virulenz- als auch pflanzliche Resistenzstrategien werden anhand einiger Modellorganismen studiert. Durch ihre gute Zugänglichkeit für molekularbiologische Analysen zählen dazu die Gram-negativen Bakteriengattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas* oder *Ralstonia*, welche bspw. mit Nutzpflanzen wie Reis (*Oryza sativa*), Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Paprika (*Capsicum annuum*), oder mit der Modellpflanze Ackerschmalwand (*A. thaliana*), interagieren. Häufig werden einzelne Bakterienspezies anhand ihres Wirtsspektrums in Pathovare (pv.) eingeteilt.

Bei kompatiblen Interaktionen gelingt phytopathogenen Bakterien die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmechanismen, wodurch eine Kolonisierung anfälliger (suszeptibler) Pflanzen ermöglicht wird. Bei inkompatiblen Interaktionen werden Bakterienspezies hingegen durch Abwehrmechanismen resistenter Pflanzen am Wachstum gehindert. Diese Abwehrmechanismen werden in zwei wesentliche Ebenen unterteilt. Die Basalabwehr wird durch die Erkennung essentieller bakterieller Komponenten, wie Flagellin, ausgelöst. Auf der zweiten Ebene können mit Hilfe pflanzlicher Rezeptoren in pflanzliche Zellen injizierte bakterielle Virulenzfaktoren erkannt, und somit spezifische Abwehrreaktionen ausgelöst werden (1). Die Ansiedlung im Interzellularraum ist nur wenigen Bakterien mit Hilfe spezieller

Virulenzfaktoren möglich (3). Die Ko-Evolution pflanzlicher Abwehrmechanismen und phytopathogener Virulenzstrategien führte zu einer Art „molekularem Wettrüsten“.

1.2 Die Basalabwehr der Pflanze

Phytopathogene werden bereits beim ersten Kontakt mit Wirtspflanzen mit pflanzlichen Abwehrmechanismen konfrontiert. Zellwände können durch Wachsschichten der Kutikula verstärkt sein und dienen als erste mechanische Barriere. Bakterien dringen durch natürliche Öffnungen wie Stomata oder Hydathoden bzw. über Verwundungen in den Interzellularraum pflanzlichen Gewebes ein (4). Die Pflanzenzellen perzipieren bakterielle Strukturen, sog. Mikroben- oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*microbial-/ pathogen -associated molecular patterns, MAMPs* bzw. *PAMPs*) (Abb. 1) (5). Dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien (6), bakterielles Flagellin (7) und essentielle bakterielle Proteine wie der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) (8). Pflanzliche Membran-lokalisierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors, PRRs*) erkennen *PAMPs/MAMPs* und lösen eine *PAMP-/MAMP-induzierte Immunität (PAMP-triggered immunity, PTI)* aus, wodurch die weitere Kolonisierung durch das Pathogen aufgehalten wird (9).

PRRs bestehen meist aus einer N-terminalen Domäne mit Leuzin-reichen Sequenzwiederholungen (*leucine-rich repeat, LRR*), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne zur Signalweiterleitung (10). Nach *PAMP*-Bindung bilden *PRRs* Komplexe mit Ko-Rezeptoren, regulatorischen Proteinen sowie anderen Komponenten und induzieren intrazelluläre Signalweiterleitung (11). Der am besten untersuchte *PRR*-Proteinkomplex besteht aus dem Flagellin-Rezeptor FLS2, der Proteinkinase BAK1 und regulatorischen Proteinen wie PUB13 (Abb. 1), welcher bspw. während der Interaktion von *A. thaliana* mit *Pseudomonas*-Stämmen gebildet wird (12). Die Proteinkomplexe phosphorylieren und aktivieren zytoplasmatische Rezeptor-ähnliche Proteinkinasen (*receptor-like cytoplasmic kinases, RLCKs*), z.B. BIK1 (13,14), woraufhin diese innerhalb weniger Minuten Immunreaktionen auslösen. Dazu zählen die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases, MAPKs*), Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinasen (*calcium-dependent protein kinases, CDPKs*), die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*), die Expression von Abwehrgenen und die Verstärkung der Zellwand durch Kalloseeinlagerungen (15,16).

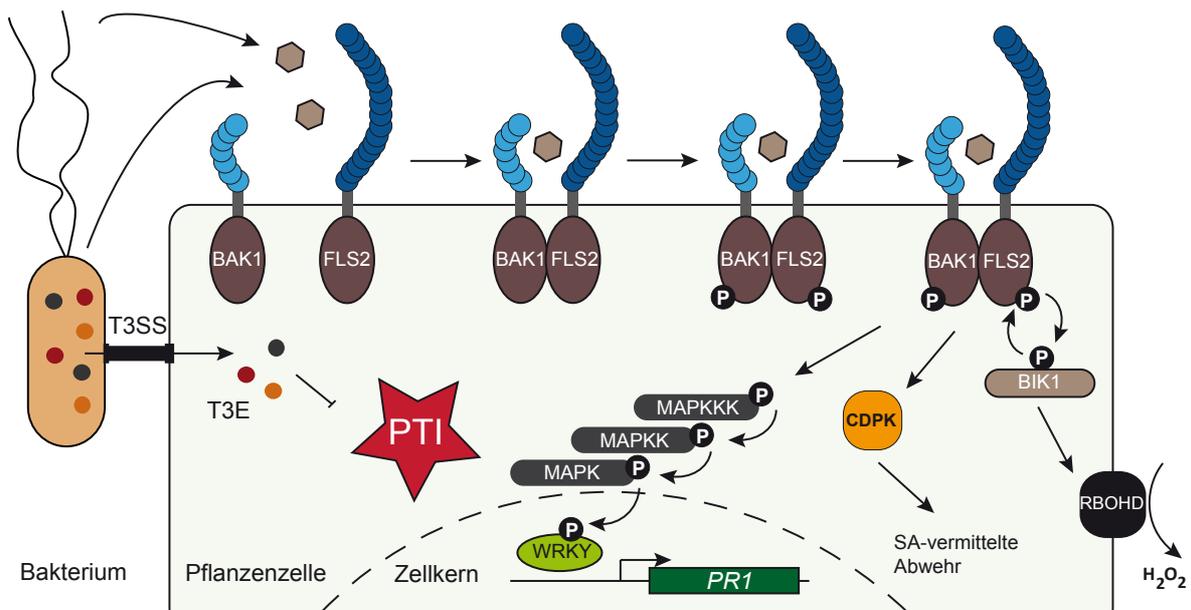


Abb. 1: Pflanzliche PTI-Reaktionen nach Pathogenperzeption

Nach Eindringen von Bakterien in Apoplasten, perzipieren Rezeptorproteinkinasen (PRR) wie FLS2 PAMPs, z.B. bakterielles Flagellin. PRRs besitzen eine extrazelluläre Leuzin-reiche Repeat-Region (blau), eine Transmembrandomäne (grau) und eine zytoplasmatische Kinasedomäne (braun). PRRs bilden oft Proteinkomplexe mit anderen Rezeptorproteinkinasen (wie BAK1) und aktivieren PTI-Signalwege durch Phosphorylierung. Die Signalweiterleitung erfolgt beispielsweise über MAP-Kinasen (MAPKs), CDPKs (calcium-dependent protein kinases) oder, im Fall von FLS2, über BIK1. Die Signalweiterleitung führt letztendlich zu PTI-Reaktionen (PAMP-triggered immunity) wie der Aktivierung von Abwehrgenen wie PR1 (pathogenesis related protein 1), der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch membranständige Oxidasen wie RBOHD oder der Ca^{2+} -abhängigen Induktion Salizylsäure-vermittelter Abwehr. Phytopathogene Bakterien translozieren Effektorproteine (T3E) über das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) in die Pflanzenzelle. Verschiedene T3E unterdrücken die PTI und fördern so die Virulenz des Bakteriums. Modifiziert nach (17).

In *A. thaliana* sind mehr als 20 MAP-Kinasen bekannt, welche nach verschiedensten Stimuli phosphoryliert werden und Abwehrmechanismen aktivieren (18). So führt z.B. die Phosphorylierung von MPK6 zur Akkumulation des Phytohormons Ethylen (Eth) und zur Aktivierung von *ERF1* (ethylene response factor 1), eines Schlüsseltranskriptionsfaktors der Pathogenabwehr (19). Die Aktivierung von MPK3 hingegen führt über die Phosphorylierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren zur Expression von Abwehrgenen der *PR1*-Klasse (pathogenesis-related gene 1) (20).

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist eine der frühesten Abwehrreaktionen nach PAMP-Perzeption. Der Ca^{2+} -Influx führt zur Aktivierung von CDPKs und Calmodulinen (CaM) und nachfolgend zur Bildung antimikrobieller Proteine, Aktivierung von Phytohormon-Signalwegen, Regulation abwehrspezifischer Transkriptionsfaktoren sowie zur ROS-Bildung (16). Neben der antimikrobiellen Wirkung im Apoplasten, sind ROS an der Produktion antimikrobieller Proteine (Phytoalexine), der Weiterleitung von Abwehrsignalen (ROS-Signalwege), der Auslösung von Zelltodreaktionen, der Einlagerung von Kallose in Zellwände, dem Vesikeltransport sowie der Ausbildung einer systemischen Immunität (systemic acquired resistance, SAR) beteiligt (21). Zu den ROS zählen insbesondere

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickoxid (NO), welche vorwiegend durch membrangebundene NADPH-Oxidasen bzw. Peroxidasen gebildet werden (22).

Phytohormone sind ebenfalls wichtig in der *PTI*. Klassische an der Pathogenabwehr beteiligte Phytohormone sind Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Ethylen (Eth), Abszisinäure (ABA) sowie Auxin (AUX) (23). SA induziert die Synthese von PR-Proteinen (*pathogenesis-related proteins*) und vermittelt eine systemische Resistenz (*SAR*) während der Infektion durch verschiedene Pathogene. Stark vereinfacht dargestellt wirken JA und Eth antagonistisch zu SA und werden hauptsächlich während der Infektion mit nekrotrophen Pathogenen, bspw. einigen Pilzen, akkumuliert (23). ABA ist sowohl ein negativer als auch positiver Regulator pflanzlicher Abwehrmechanismen. ABA-defiziente Tomatenpflanzen sind einerseits resistenter gegenüber vielen phytopathogenen Bakterien und Pilzen wie *Pseudomonas* oder *B. cinerea* (24,25). Andererseits ist ABA ein wesentlicher positiver Regulator der Stomata-abhängigen Immunität, bspw. bei der Infektion von *A. thaliana* durch *Pseudomonas*-Stämme (26,27). Im Gegensatz dazu werden die Signalwege anderer Phytohormone während der *PTI* unterdrückt. Beispielsweise ist AUX ein negativer Regulator von Abwehrreaktionen in *A. thaliana* und wird daher während der Infektion mit bspw. *Pseudomonas*-Stämmen gehemmt (28). Weiterhin fördert AUX die Expression von Expansinen und so die Lockerung der Zellwand (26). Während der Pathogenabwehr hingegen, fördert die Unterdrückung von AUX-Signalwegen bspw. die mechanische Abwehr von *Xanthomonas*-Stämmen in *O. sativa* (26,29).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der *PTI* ist der Schutz der Zellwände an Infektionsstellen. Phytopathogene Bakterien sekretieren Enzyme wie Zellulasen, Xylanasen, Polygalakturonasen, Pektinlyasen oder Pektinesterasen um die Penetration pflanzlicher Zellwände zu erleichtern (30). Bisher wurden zwei Mechanismen beschrieben um pflanzliche Zellwände bei Pathogenbefall zu schützen: durch Inhibition bakterieller Zellwand-degradierender Enzyme und durch Stärkung der Zellwände. Letzteres geht meist mit der Einlagerung von Kallose bzw. phenolischen Substanzen oder Lignifizierung einher (31).

Ein niedriger pH-Wert sowie sekretierte antimikrobielle Substanzen im pflanzlichen Interzellularraum bilden einen weiteren wichtigen Aspekt aktiver pflanzlicher Abwehr gegen eine Vielzahl von Pathogenen (4). Antimikrobielle Substanzen werden über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat sekretiert und bilden innerhalb der Papille einen für das Pathogen toxischen „Cocktail“ (32).

Neben der Abwehr in den Apoplasten eingedrungener Bakterien oder Pilze, wird im Zuge der *PTI* die Stomata-abhängige Immunität induziert, um ein weiteres Eindringen des Pathogens zu verhindern (33). Nach Perzeption von bspw. *Pseudomonas*-Stämmen wird innerhalb von Minuten der Turgor in den Schließzellen der Spaltöffnungsapparate von *A. thaliana* vermindert, wodurch die Apertur der Stomata verringert wird (27,33). Dabei unterscheidet man zwischen Abszisinäure (ABA)- und *PAMP*-induziertem Schließen von Spaltöffnungen.

Nach Perzeption von ABA bzw. *PAMPs* werden membranständige NADPH-Oxidasen (RBOHF bzw. RBOHD) aktiviert, wodurch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies angeregt wird (33). Über NO- und Ca²⁺-abhängige Weiterleitung der ROS-Signale werden K⁺- und Anionenkanäle von Schließzellen zum aktiven Ionen-Efflux geöffnet. Der folgende Wasseraustritt senkt den Turgor, wodurch die Apertur der Spaltöffnungen verringert wird (34). Komponenten dieser Signalwege können durch Katalasen, Proteinkinasen, die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts oder auch Phytohormone wie SA beeinflusst werden. JA-abhängige Signalwege wirken hingegen antagonistisch und unterdrücken stomatale Immunität (33).

1.3 Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien

Phytopathogene Bakterien haben zahlreiche Virulenzfaktoren evolviert, mit deren Hilfe u.a. pflanzliche Abwehrmechanismen umgangen und Wirtspflanzen erfolgreich kolonisiert werden. Dazu zählen extrazelluläre Polysaccharide (EPS) (35), Adhäsine (36), Toxine (37) sowie Zellwand-abbauende Enzyme (38). Extrazelluläre Polysaccharide haben verschiedene Virulenz-relevante Funktionen und dienen bspw. der Bildung von Schleimkapseln als Schutz vor Austrocknung, und erleichtern durch adhäsive Eigenschaften die Anheftung der Bakterien an die Pflanzenzellen (35,36). Zellwand-abbauende Enzyme wie Zellulasen und Pektinasen erleichtern dem Bakterium die Penetration der pflanzlichen Zellwand. Dabei entstehende Zucker dienen dem Bakterium darüber hinaus als Nährstoffquelle (39).

Viele Virulenzfaktoren bakterieller Pathogene werden über Sekretionssysteme verschiedener Typen sekretiert. Zu diesen Virulenzfaktoren zählen Toxine, Proteasen sowie Lipasen (Typ I), Zellwand-degradierende Enzyme wie Zellulasen, Pektinasen sowie α -Amylasen (Typ II), aber auch andere Proteine sowie DNA (Typ IV) (40). Darüber hinaus stellt insbesondere das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) einen essentiellen und hochkonservierten Pathogenitätsfaktor der meisten Gram-negativen phyto- und tierpathogenen Bakterien dar (41,42). Bei der Assemblierung des T3SS werden beide bakterielle Membranen durchspannt. Neben der Sekretion von Proteinen in den Interzellularraum, wird mit Hilfe eines Translokons die Penetration der pflanzlichen Zellwand und damit die Translokation sog. Typ III-Effektorproteine (T3E) in das Zytosol pflanzlicher Zellen ermöglicht (40,43).

Das T3SS wurde erstmals anhand des auch in dieser Arbeit verwendeten Gram-negativen Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) beschrieben (44). Die mehr als 20 Proteine des T3SS werden vom sog. *hrp*-Gencluster (*hypersensitive response and pathogenicity*) im Chromosom kodiert (44). In *Xcv* wird die Expression des *hrp*-Genclusters durch den OmpR-ähnlichen Regulator HrpG sowie den transkriptionellen Aktivator HrpX induziert. Bei Kontakt von *Xcv* mit Pflanzenzellen wird HrpG durch ein unbekanntes Signal aktiviert, wodurch wiederum die Expression von *hrpX* aktiviert wird (45). HrpX bindet an *PIP*-

Boxen (*plant inducible promoter*) in den Promotoren von *hrp*- und anderen Typ III-assoziierten Genen und aktiviert deren Genexpression (46).

Elf Gene des *hrp*-Genclusters sind in den meisten tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und werden als *hrc* (*Hrp-conserved*) bezeichnet. Deren Produkte bilden vermutlich den Kern des Typ III-Basalapparates. Beispielsweise kodiert *hrcN* für eine ATPase, welche wahrscheinlich die Energie für die Translokation von Effektorproteinen bereitstellt (47). Neben den *hrc*-Genen sind auch weniger konservierte *hrp*-Gene essentiell für die Pathogenität von *Xcv*; HrpE ist bspw. Hauptbestandteil des extrazellulären Hrp-Pilus, HrpF bildet wahrscheinlich das Translokon in der pflanzlichen Plasmamembran (48). Darüber hinaus tragen sog. Hpa-Proteine (*hrp-associated*) zur Interaktion mit der Wirtspflanze bei, z.B. das Typ III-Chaperon HpaB (49).

1.4 Spezifische pflanzliche Resistenz durch Erkennung von Typ III-Effektoren

Je nach Bakterienspezies werden 20-40 Effektorproteine in die Pflanzenzelle transloziert, welche als Virulenzfaktoren der Auslösung von Krankheitssymptomen dienen und die Vermehrung der Bakterien im Apoplasten fördern (43,50). Dies erfolgt durch Unterdrückung der Basalabwehr (Effektor-induzierte Suszeptibilität, *effector-triggered susceptibility*, ETS) (9).

Resistente Pflanzen können mit Hilfe von R-(Resistenz)-Proteinen direkt oder indirekt einzelne Effektorproteine erkennen, die früher als Avirulenz-Proteine (Avr-Proteine) bezeichnet wurden. Diese inkompatible Interaktion erfordert nach der Gen-für-Gen-Hypothese die Anwesenheit eines *avr*-Gens im Pathogen und eines korrespondierenden R-Gens der Pflanze (51). Bei Interaktionen mit suszeptiblen Pflanzen erfolgt keine Erkennung, da das *avr*- und/oder R-Gen abwesend oder mutiert sind.

Je nach Repertoire an Effektorproteinen des Pathogens bzw. R-Genen der Wirtspflanze, werden einzelne Effektorproteine erkannt und eine Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) ausgelöst (9,52). Diese führt zur Resistenz gegenüber dem erkannten Pathogen und zeichnet sich, verglichen mit der PTI, durch eine spezifische, oft stärkere und längere Immunantwort aus (23,53). Häufig geht dies mit einem schnellen lokalen Zelltod des infizierten Pflanzengewebes einher, welcher als HR (*hypersensitive response*) bezeichnet wird und die weitere Vermehrung des Pathogens verhindert (54).

Die meisten R-Gene kodieren für Proteine, welche eine Nukleotid-Bindedomäne (NB) und eine Leuzin-reiche Domäne (*leucine-rich repeats*, LRR) zur Bindung von Zielproteinen beinhalten (NB-LRR-Proteine) (9). R-Proteine interagieren direkt mit bakteriellen Effektorproteinen (Rezeptor-Ligand-Modell), fungieren als Wächter (*guard*) eines

pflanzlichen Zielproteins (Virulenzziel) oder imitieren ein Virulenzziel (*decoy*) (9,55). Außerdem, aber seltener, kann die Genexpression von *R*-Genen auch direkt von T3E aktiviert werden. Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung des Resistenzgens *Bs3* in *C. annuum* durch den TAL-Effektor *AvrBs3* aus *Xcv* (56).

Die Aktivierung von NB-LRR-Proteinen resultiert in der Aktivierung verschiedener Signalwege pflanzlicher Abwehr, von denen viele auch in die *PTI* integriert sind (9,23). Allerdings unterscheiden sich Kinetik und Amplitude der ROS-Bildung bzw. die Dauer der Aktivität von *MAPK*-Kaskaden im Zuge der *PTI* bzw. *ETI* deutlich (23). Auch die hormonelle Immunantwort zeigt Unterschiede zwischen *PTI* und *ETI*. Während der *ETI* wird hauptsächlich JA, aber im Gegensatz zur *PTI* nur in seltenen Fällen auch SA und Eth, akkumuliert (23). Im Gegensatz zur *PTI* sind in die *ETI* meist nur einzelne Signalwege involviert, wodurch zwar eine starke Immunreaktion ausgelöst wird, negative Effekte auf die pflanzliche Fitness durch die Aktivierung aller Signalwege aber vermieden werden (23).

Einige spezialisierte Pathogene haben wiederum Effektorproteine evolviert, welche die *ETI* nach der Erkennung von Effektorproteinen unterdrücken (9). Beispielsweise unterdrückt *AvrPphC* aus *P. syringae* pv. *phaseolicola*, die durch *AvrPphF* ausgelöste *ETI* in der Bohnenpflanze (57). Ein anderes Beispiel ist das Effektorprotein *AvrPtoB* aus *P. syringae* pv. *tomato*, das die durch *HopA1* und *AvrRpm1* induzierten hypersensitiven Reaktionen in *S. lycopersicum* supprimiert (58). Da durch natürliche Selektion ebenso neue pflanzliche R-Proteine zur Erkennung anderer Effektorproteine evolviert werden können, ergeben sich bei der Interaktion von phytopathogenen Bakterien und Wirtspflanzen immer neue Aspekte von Suszeptibilität und Resistenz.

1.5 Der Einfluss bakterieller Effektorproteine auf pflanzliche Abwehrprozesse

Phytopathogene Bakterien translozieren Effektorproteine in Wirtszellen und unterdrücken pflanzliche Abwehrmechanismen. In der Pflanzenzelle lokalisieren Effektorproteine in verschiedene Zellkompartimente und greifen über die Bindung pflanzlicher Proteine oder DNA in eine Vielzahl zellulärer und physiologischer Prozesse ein (59). Studien der letzten Jahre erweiterten erheblich das Wissen um molekulare Mechanismen einzelner Effektorproteine, wobei beobachtet wurde, dass Effektorproteine sowohl die Genexpression, als auch die Stabilität von Proteinen auf verschiedene Weisen beeinflussen (59,60). Pflanzliche Proteine können darüber hinaus Effektor-vermittelt modifiziert werden. Beispielsweise haben einzelne Effektoren Kinase- bzw. Phosphatase-Aktivität oder übertragen Proteine wie Ubiquitin oder Nukleoside wie Uridin auf pflanzliche Proteine (59). Anhand dieser molekularen Funktionen beeinflussen viele T3E verschiedene pflanzliche

Virulenzziele, welche in die Signalweiterleitung durch membranständige Rezeptoren, Kinasen oder Phytohormone, den Vesikeltransport, das Zytoskelett, Komponenten der Chloroplasten oder stomatale Immunität involviert sind (60). Einige Virulenzziele phytopathogener Bakterien sind in Abb. 2 dargestellt.

Pflanzliche *PRRs* perzipieren bakterielle *PAMPs* und geben dieses Signal an nachgeschaltete Proteine weiter, wodurch *PTI*-Reaktionen ausgelöst werden. Effektorvermittelt kann die Signalweiterleitung an verschiedenen Stellen des Signalweges, beispielsweise *MAP*-Kinasen, Ca^{2+} -Kanäle, *CDPKs* oder *NADPH*-Oxidasen, verhindert und die *PTI* wirksam unterdrückt werden (59). Gut studierte *PRRs* sind bspw. *FLS2* und *EFR* aus *A. thaliana*. *AvrPtoB* aus *Pseudomonas* interagiert mit *FLS2* und vermittelt dessen Degradation (61). *AvrPto* bindet *FLS2* und *EFR* und verhindert auf bisher unbekannte Weise deren Aktivierung bei *PAMP*-Perzeption (62). Auch nachgeschaltete Proteinkinasen wie *BIK1* und insbesondere *MAP*-Kinasen können Ziele von Effektoren sein. Beispielsweise inhibiert *AvrAC* aus *Xanthomonas* die aktive Phosphorylierungsstelle von *BIK1* durch Übertragung eines Uridins (63). *HopA1* aus verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen ist eine Phosphothreonin-Lyase und inhibiert durch Entfernung einer Phosphatgruppe von *MAP*-Kinasen irreversibel deren Phosphorylierung (4,64).

Über Vesikeltransport werden antimikrobielle Substanzen und Kallose an die pflanzliche Zellwand transportiert und über Exozytose in den Apoplasten abgegeben bzw. in Zellwände integriert (65). *AtMIN7* fungiert als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und ist essentiell für das Abschnüren von Transportvesikeln. *HopM1* aus *Pst* fördert über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Degradation von *AtMIN7* durch das 26S-Proteasom und verhindert *PTI*-Reaktionen in Form von Kalloseablagerungen in die Zellwand. Die *HopM1*-vermittelte Degradation von *AtMIN7* wird darüber hinaus nach Perzeption der Effektoren *AvrRpt2*, *AvrPphb* und *HopA1* aus *Pst* blockiert und ist demnach essentiell für *ETI*-Reaktionen (60,66). Dies impliziert einen „Wettkampf“ zwischen *HopM1*-vermitteltem Abbau bzw. der Stabilisierung von *AtMIN7* im Zuge pflanzlicher Abwehrmechanismen (65).

Pflanzen verhindern nach *PAMP*-Perzeption durch stomatale Immunität das Eindringen weiterer Bakterien (27,33). Phytopathogene Bakterien wie *Pseudomonas* verhindern das Schließen der Stomata bspw. durch die Ausschüttung des Phytotoxins Coronatin oder Coronatin-ähnlicher Substanzen und nehmen darüber Einfluss auf *JA*-Signalwege (67). Die Proteinstruktur von Coronatin ist der aktiven *JA*-Form Jasmonat-Isoleucin (*Ja-Ile*) sehr ähnlich und induziert zur stomatalen Immunität antagonistisch wirkende *JA*-abhängige Signalwege (33). Coronatin-defiziente phytopathogene Bakterien induzieren hingegen Effektorprotein-vermittelt *JA*-responsive Prozesse und nehmen so Einfluss auf die stomatale Immunität. Beispielsweise vermittelt *HopX1* aus *Pseudomonas* durch Cystein-Protease-Aktivität die Degradation negativer Regulatoren im *JA*-Signalweg von *A. thaliana* (68). *AvrB*

aus *Pseudomonas* hingegen fördert durch Phosphorylierung von RIN4 JA-Signalwege in *A. thaliana* (69).

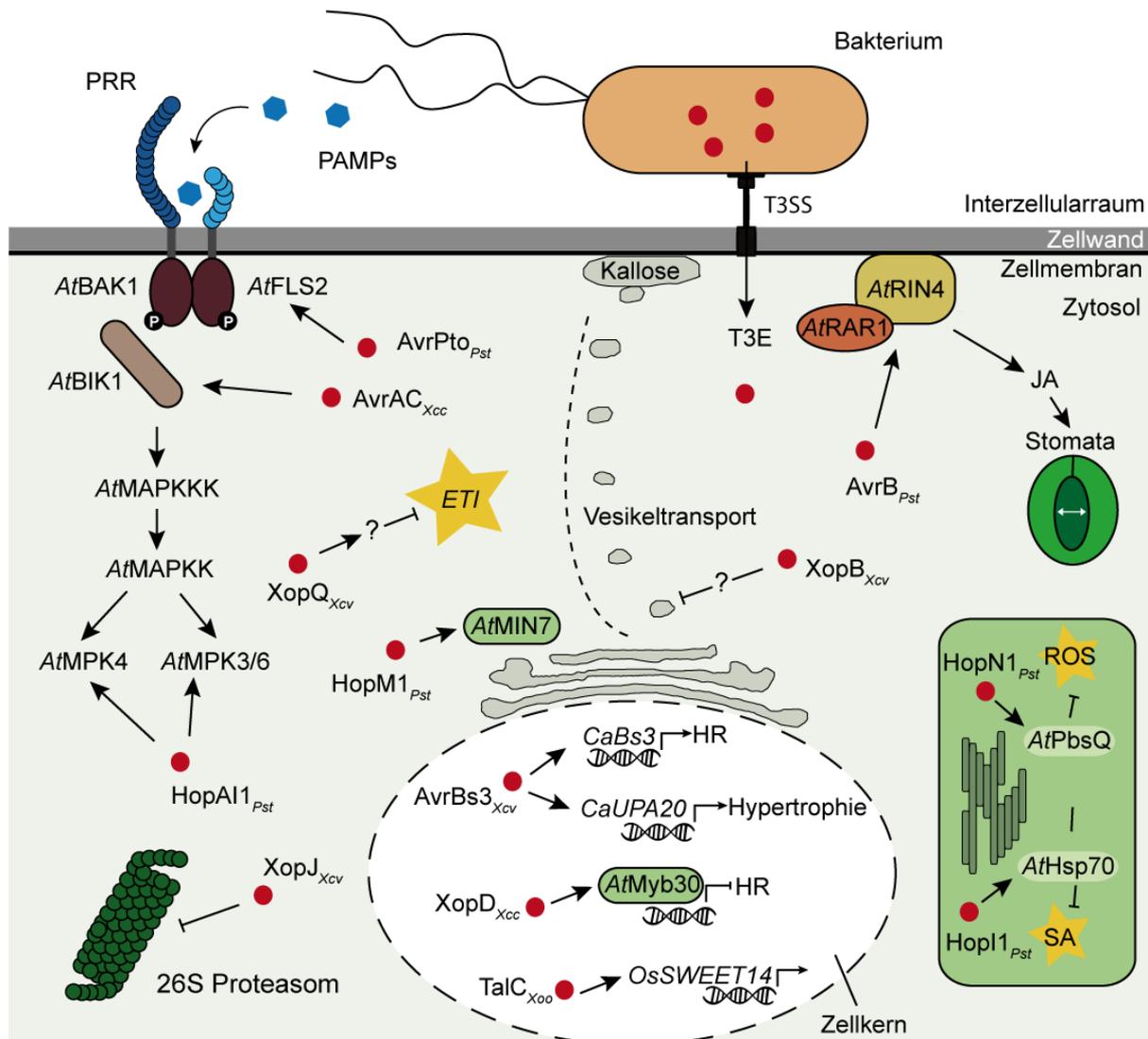


Abb. 2: Molekulare Ziele von T3E-Proteinen in der Pflanzenzelle

Phytopathogene Bakterien wie *Xanthomonas* spp. (*Xcv*, *Xoo*) oder *Pseudomonas* spp. (*Pst*) translozieren über das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) Effektorproteine (T3E) in Pflanzenzellen von *O. sativa* (*Os*) bzw. *A. thaliana* (*At*). Innerhalb der Pflanzenzelle lokalisieren T3E in verschiedene Kompartimente und beeinflussen verschiedene pflanzliche Prozesse. *XopD_{Xcv}* reguliert über *AtMyb30* und unterdrückt die Auslösung einer HR. Je nach Kultivar der infizierten Pflanze induziert *AvrBs3_{Xcv}* die Expression von *CaUPA20* bzw. *CaBs3* und löst so eine Hypertrophie von Mesophyllzellen aus bzw. induziert eine HR. *TalC_{Xoo}* induziert die Expression des Zuckertransporters *OsSWEET14* und fördert damit die Nährstoffversorgung von *Xoo*. Viele T3E beeinflussen die Weiterleitung pflanzlicher Signale. *AvrPto_{Pst}* und *AvrAC_{Xcc}* verhindern die Signalweiterleitung des Rezeptorkomplexes aus *AtFLS2*, *AtBAK1* und *AtBIK1*. *HopAl1_{Pst}* inhibiert dagegen die Phosphorylierung der nachgeschalteten MAP-Kinasen MPK4 und MPK3/6. T3E nehmen auch Einfluss auf pflanzliche Abwehr-relevante Hormonsignalwege bzw. stomatale Immunität. *AvrB_{Pst}* fördert dagegen durch Phosphorylierung von *AtRIN4* JA-Signalwege, wodurch die stomatale Immunität inhibiert wird. *Hop1_{Pst}* lokalisiert in Chloroplasten und inhibiert die SA-Synthese. Zur Unterdrückung der Basalabwehr fördert *HopM1_{Pst}* die Degradation von *AtMIN7* und reduziert damit Kalloseablagerungen. Abbildung verändert nach (60).

Auch andere Phytohormonsignalwege sind Virulenzziele von Effektoren. Da Phytohormone zueinander häufig antagonistisch wirken, beeinflusst die Aktivierung eines Signalwegs durch Effektorproteine oft auch die Signalwege anderer Phytohormone (70). SA vermittelt hauptsächlich die Abwehr gegen bakterielle Infektionen, wohingegen JA und Eth meist mit

Resistenz gegen nekrotrophe Pilze assoziiert sind (23). Effektorproteine Gram-negativer phytopathogener Bakterien vermitteln demnach meist die Unterdrückung von SA-Signalwegen. Beispielsweise vermittelt HopZ1a aus *Pst* die COI1-abhängige Degradation von Transkriptionshemmern JA-responsiver Gene, wodurch SA-Signalwege gehemmt werden (71). Auch die Bildung von SA wird Effektor-vermittelt gehemmt. Beispielsweise lokalisiert das Effektorprotein HopI1 aus *Pst in planta* in Chloroplasten und verhindert dort die SA-Synthese (72).

In Chloroplasten erfolgt ebenfalls die ROS-Synthese. HopN1 aus *Pst* lokalisiert in Chloroplasten und vermittelt dort über Cystein-Protease-Aktivität die Degradation des Photosystem-II-Proteins PsbQ, wodurch die ROS-Bildung reduziert wird (73) (Abb. 2).

Neben proteolytischer Spaltung wird die Abundanz pflanzlicher Proteine hauptsächlich durch das 26S-Proteasom reguliert. Verschiedene Effektorproteine vermitteln die Rekrutierung von Zielproteinen zur pflanzlichen Proteindegradations-Maschinerie. Zum Abbau bestimmte Proteine werden durch posttranslationelle Konjugation kleiner aber hochkonservierter Proteine wie Ubiquitin oder SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) markiert. Als am besten untersuchtes Beispiel wird Ubiquitin durch E1- und E2-Enzyme auf E3-Proteinkomplexe übertragen, welche durch E3-Ligaseaktivität Ubiquitin an Lysinreste von Zielproteinen konjugieren (74). Dabei enthalten E3-Proteinkomplexe zur Bindung von E2-Enzymen das Protein Rbx1 oder Proteine mit U-Box-Motiven. Rbx1 ist Teil von SCF-E3-Proteinkomplexen, welche aus dem Gerüstprotein Cullin, einem E3-Enzym, dem Adapterprotein Skp1 und einem F-Box-Protein bestehen (Skp1-Cullin-F-Box-Protein-Komplex) (74). Zum Abbau bestimmte Proteine werden spezifisch durch das F-Box-Protein gebunden und durch die Interaktion zwischen F-Box-Domänen und SKP1 zum SCF-Komplex rekrutiert (74-76). Effektorproteine können in den Proteindegradations-Prozess eingreifen. Einige T3E enthalten eukaryotische Proteinmotive wie F-Box- oder U-Box-Motive oder eigene E3-Ligase-Aktivität, wodurch pflanzliche Zielproteine durch Ubiquitinierung oder Sumoylierung für den Abbau durch das pflanzliche 26S-Proteasom markiert oder möglicherweise zur Weiterleitung von Signalen modifiziert werden (77,78). Beispielsweise translozieren *Ralstonia* spp. GALA-Effektoren, welche über eine eukaryotische F-Box-Domäne mit Skp1-Proteinen aus *A. thaliana* interagieren und wahrscheinlich durch den Abbau bisher unbekannter pflanzlicher Proteine maßgeblich zur Virulenz der Bakterien beitragen (77,79).

1.6 Einfluss von T3Es auf das pflanzliche Transkriptom

Neben dem Effektor-vermittelten Einfluss auf die Stabilität bzw. Wirkungsweise pflanzlicher Proteine werden nachgeschaltete Gene indirekt beeinflusst. Demzufolge gehen sowohl nach Pathogenperzeption aktivierte pflanzliche Immunprozesse als auch Effektor-vermittelt veränderte zelluläre Prozesse mit einer massiven Änderung des pflanzlichen Transkriptoms

einher. Beispielsweise werden im Zuge von Abwehrreaktionen von *A. thaliana* gegen den T3SS-defizienten Bakterienstamm *Pst* DC3000 Δ *hrpA* innerhalb von 12 Stunden die Transkriptmengen von mehr als 1600 Genen verändert (80,81). Hingegen verursachen Effektorproteine des pathogenen Stammes *Pst* DC3000 die Veränderung der Transkriptakkumulation von mehr als 800 Genen (81). Effektor-abhängig werden dabei besonders Membrankomponenten wie *PRRs* oder nachgeschaltete Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst (81). Beispielsweise interagiert XopD aus *Xcc* mit MyB30 aus *A. thaliana* und verhindert die Ausbildung einer HR (82). Die Erkennung einzelner Effektorproteine durch resistente Pflanzen führt hingegen zu einer massiven Veränderung des pflanzlichen Transkriptom. Beispielsweise werden nach Translokation des Effektors AvrRxv, einer Cysteinprotease aus *Xcv*, 420 Gene von *S. lycopersicum* differentiell exprimiert und führen zur Auslösung einer HR (83).

Eine Gruppe von Effektorproteinen kann pflanzliche DNA binden. Über Bindung an Promotorbereiche pflanzlicher Gene fördern TAL (*transcription activator-like*)-Effektoren die Akkumulation der Transkripte und nehmen so direkt Einfluss auf das Transkriptom von Wirtspflanzen. Die Rolle der meisten TAL-Effektoren im Hinblick auf Virulenzreaktionen ist bisher unverstanden. Einige TAL-Effektoren vermitteln die Aktivierung von Genen des Zuckertransportes. Beispielsweise aktiviert TalC aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) *OsSWEET14* aus Reis (*O. sativa*) und unterstützt damit wahrscheinlich die Nährstoffversorgung des Pathogens (60,84) (Abb. 2). AvrBs3 ist ein gut untersuchter TAL-Effektor des Stammes *Xcv* 82-8. AvrBs3 bindet Promotorbereiche sog. *UPA*-Gene (*upregulated by AvrBs3*) und aktiviert deren Transkription, sowohl in *S. lycopersicum*, als auch in *C. annuum* (85). Je nach Kultivar der infizierten Paprikapflanze wird die Expression von *UPA20* bzw. *Bs3* induziert und so AvrBs3-vermittelt eine Hypertrophie von Mesophyllzellen bzw. die eine HR ausgelöst (56,86) (Abb. 2). TAL-Effektoren wurden anhand von AvrBs3 in *Xanthomonas*-Spezies identifiziert, sind jedoch nicht Bestandteil des „Core“-Effektorrepertoires aller phytopathogenen Bakterien. Verschiedene phytopathogene *Xanthomonas*-Spezies kodieren für keine, wenige oder in Ausnahmefällen mehr als 30 TAL-Effektoren (87).

1.7 Phytopathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas*

Die Gattung *Xanthomonas* beinhaltet Gram-negative, stäbchenförmige und monotrich begeißelte phytopathogene γ -Proteobakterien (88). Membrangebundene Xanthomonadine verursachen die charakteristische gelbe Färbung und vermitteln Schutz vor UV-Strahlung (89). Xanthomonaden leben obligat aerob bei einer optimalen Temperatur von 25-30°C (90). Hauptsächlich durch Regen und Wind übertragen, kolonisieren pflanzenpathogene *Xanthomonas* spp. lebendes Gewebe von mehr als 120 monokotyledonen und 260

dikotyledonen Pflanzen (91). Aufgrund hoher Ernteverluste gehören die Erreger der Weißblättrigkeit von Reis, *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und des Bakterienbrandes von Maniok, *X. axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), zu wirtschaftlich bedeutsamen Pflanzenpathogenen (92). Weitere Beispiele sind *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), der Verursacher des Zitruskrebses sowie *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), der Erreger der Adernschwärze von Brassicaceen (92). Die Bakterien dringen über natürliche Öffnungen wie Stomata und Hydathoden bzw. über Verwundungen in den Interzellularraum ein (90). Dort vermehren sich die Bakterien lokal begrenzt, wie *Xac*, oder systemisch wie *Xoo* (40).

Neben *Xac* und *Xcc* dient auch das in dieser Arbeit untersuchte Pathogen *Xcv* als Modellorganismus für die Interaktion pflanzenpathogener Bakterien mit Wirtspflanzen. *Xcv* verursacht die bakterielle Fleckenkrankheit (93) in *Solanum* spp. (*S. lycopersicum*) sowie *Capsicum* spp. (*C. annuum* oder *C. frutescens*). Die Krankheitssymptome sind lokal begrenzt und durch wässrige Läsionen an Blättern und Früchten gekennzeichnet, welche später nekrotisch werden und zu hohen Ernteverlusten führen (94). Anhand ihrer Verbreitung und ihres Wirtsspektrums unterscheidet man derzeit vier Gruppen von *Xcv*-Spezies: *X. euvesicatoria* (weiterhin *Xcv* genannt), *X. vesicatoria* (*Xv*), *X. perforans* (*Xp*) sowie *X. gardneri* (*Xg*) (95). *Xcv*-Spezies verschiedener Gruppen unterscheiden sich in ihrer Verbreitung, durch die An- oder Abwesenheit von Virulenzfaktoren wie einzelner Effektorproteine und damit hinsichtlich ihrer Wirtsspezifität sowie Pathogenität (96).

1.7.1 Charakteristika des sequenzierten Stammes *Xcv* 85-10

Für diese Arbeit wurde der *Xcv*-Stamm 85-10 verwendet, dessen Genomsequenz 2005 veröffentlicht wurde (97). Viele tier- oder pflanzenpathogene Bakterien vermitteln Virulenz durch niedermolekulare Substanzen wie Phytotoxine und sekretierte Proteine. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch kleine nicht-kodierende RNAs (*small RNAs*) wie *sx12* zur Virulenz von *Xcv* 85-10 in *C. annuum* beitragen (98). Kleine RNAs wie *sx13* sind darüber hinaus an der *hrpG/hrpX*-abhängigen Regulation der Sekretion von Effektorproteinen durch *Xcv* 85-10 beteiligt (99).

Über Phytotoxine als Virulenzfaktoren ist für *Xcv* 85-10 hingegen bisher wenig bekannt. *Xcv* 85-10 sekretiert kein Coronatin oder bisher bekannte ähnliche Substanzen. Da Sekretionsüberstände der Coronatin-defizienten Spezies *Xcc* aber die stomatale Immunität von *A. thaliana* nach Infektion mit einem Coronatin-defizienten *Pst*-Stamm unterdrücken (100), können bisher unbekannte Coronatin-ähnliche Substanzen auch für *Xcv* nicht ausgeschlossen werden.

Sekretierte Proteine tragen wesentlich zur Virulenz von *Xcv* 85-10 bei. Das Genom von *Xcv* 85-10 kodiert mit dem *xps*- bzw. *xcs*-Gencluster für zwei T2SS, wobei nur das *xps*-Gencluster zur Virulenz von *Xcv* 85-10 beiträgt (101). Das *Xps*-T2SS sekretiert Zellwand-

degradierende Enzyme wie Zellulasen, Polygalakturonasen, Xylanasen und Proteasen in den Apoplasten infizierter Pflanzen (101).

Mit Hilfe des T3SS translozierte Effektorproteine von *Xcv* 85-10 werden als Xop (*Xanthomonas outer protein*) bzw. Avr-Proteine bezeichnet (40). Bisher wurden 33 Effektorproteine identifiziert, welche *Xcv* 85-10 in Wirtszellen transloziert (Tabelle 1). Elf dieser Effektoren kommen in allen *Xcv*-Spezies der genannten vier Gruppen vor („Core“-Effektoren) (Tabelle 1) und sind wahrscheinlich für die Pathogenität in vielen Wirtspflanzen wichtig (96). Einer dieser Effektoren ist XopL, welcher über eine N-terminale LRR-Proteindomäne pflanzliche Proteine bindet und über C-terminale E3-Ligaseaktivität wahrscheinlich deren Degradation zur Unterdrückung von *PTI*-Reaktionen vermittelt (102). Ein weiterer „Core“-Effektor, XopQ, bindet das 14-3-3-Protein *S/TFT4* und unterdrückt *ETI*-vermittelte Zelltodreaktionen (103) (Abb. 2). Neben den Kern-Effektorproteinen transloziert *Xcv* mindestens 17 weitere Effektoren über das T3SS (95). XopS und XopB unterdrücken ebenfalls pflanzliche *PTI*-Reaktionen und fördern die Vermehrung von *Xcv* in suszeptiblen Paprikapflanzen des Kultivars ECW (*Early Californian Wonder*) (104). XopB interferiert mit dem pflanzlichen Vesikeltransport und unterdrückt auf bisher unbekannte Weise sowohl *PTI*-Reaktionen (Abb. 2) als auch *ETI*-Reaktionen, die durch die Effektorproteine XopJ, AvrRxv und AvrBsT ausgelöst werden (104). Ein anderes Effektorprotein, XopG, zeigt Ähnlichkeit zu Zink-Metalloproteasen und vermittelt so möglicherweise den proteolytischen Abbau bisher unbekannter pflanzlicher Proteine (105). Anders als *Xcv* 82-8, kodiert das Genom von *Xcv* 85-10 für kein Effektorprotein der TAL-Familie (97).

XopI beinhaltet N-terminal ein eukaryotisches F-Box-Motiv (Pfam-Motiv PF00646; Aminosäuren 47-92) (106). Vorarbeiten wiesen darauf hin, dass XopI mit Hilfe des F-Box-Motives Skp1-Proteine bindet und so möglicherweise in pflanzliche SCF-Komplexe integriert (O. Müller und Ulla Bonas, unpublizierte Daten). Im C-terminalen Bereich von XopI wurde eine SCOP Domäne (*Structural Classification of Proteins database*) (107) d1gw5b identifiziert (*E-value* 3×10^{-4}), welche zur Superfamilie der Armadillo (ARM) *repeat*-Proteine klassifiziert wird (O. Müller und Ulla Bonas, unpublizierte Daten). Da ARM-*repeats* der Protein-Protein-Interaktion dienen (108), liegt die Vermutung nahe, dass XopI pflanzliche Proteine bindet und deren Degradation vermittelt.

Tabelle 1: Verifizierte Effektorproteine von *Xcv* 85-10 und deren biologische Funktion

Effektor	Vorhergesagte Funktion und Motive	Referenz
AvrBs1	unbekannt	109
AvrBs2 ^{CE}	Glycerolphosphodiesterase	110
AvrRxv	Protease	111
XopB	unbekannt	45
XopC	Phosphoribosyltransferase	112
XopD ^{CE}	SUMO-Protease	113,114
XopE1	Transglutaminase, N-Myristoylierungssignal	115
XopE2	Transglutaminase, N-Myristoylierungssignal	115
XopF1 ^{CE}	unbekannt	116
XopF2	unbekannt	116
XopG	Zink-Metalloprotease	117
XopH	Tyrosinphosphatase	118
XopI	F-Box-Protein	119
XopJ	Protease / Acetyltransferase C55	112
XopK ^{CE}	unbekannt	119
XopL ^{CE}	E3-Ligase	102
XopM	unbekannt	119
XopN ^{CE}	unbekannt	116
XopO	unbekannt	116
XopP	unbekannt	116
XopQ ^{CE}	Nukleosid-Hydrolase	116, 103
XopR ^{CE}	unbekannt	119
XopS	unbekannt	119
XopV	unbekannt	119
XopX ^{CE}	unbekannt	120
XopZ1 ^{CE}	Unbekannt	95
XopAA (<i>Ecf</i>)	<i>Early chlorosis factor</i>	121
XopAD ^{CE}	Protein mit SKW-Repeats	122
XopAK	Deamidase	122
XopAP	Lipase (Klasse 3)	122
XopAU	Serin/Threonin-Kinase	122
XopAV	unbekannt	122
XopAW	Calcium-bindendes Protein	122
XopAX	unbekannt	122

^{CE} „Core“-Effektor

1.8 Zielstellung der Arbeit

Als Hauptziel dieser Arbeit sollte analysiert werden, inwieweit die Gesamtheit translozierter Effektorproteine von *Xcv* 85-10 das Transkriptom von Wirtspflanzen beeinflussen. Zu diesem Zweck sollte eine vergleichende Transkriptom-Analyse *Xcv* infizierter *S. lycopersicum*-Blätter zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten durchgeführt werden. Der Vergleich von Transkriptomdaten nach Infektion mit dem Wildtypstamm 85-10 bzw. einem T3SS-defizienten Stamm (*Xcv* 85-10 Δ *hrcN*), sollte Aufschluss über den Einfluss des gesamten T3E-Repertoires auf die Akkumulation von Transkripten von *S. lycopersicum* geben. Durch einen Vergleich von Expressionsmustern nach Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* bzw. der Infiltration mit einer MgCl₂-Lösung sollte mutmaßlich an der Pathogenabwehr beteiligte Gene von *S. lycopersicum* identifiziert werden. Anschließend sollten die Daten verglichen werden, um den Einfluss von T3E-Proteinen auf pflanzliche Abwehrmechanismen zu beschreiben. Zur Erstellung dieser Transkriptomdaten sollten basierend auf dem 2012 veröffentlichten Genom von *S. lycopersicum* erstmals das gesamte Genom repräsentierende *Microarray-Chips* etabliert werden. Ausgewählte Daten sollten mittels qRT-PCR-Analysen validiert werden.

Da qRT-PCR-Analysen häufig die Methode der Wahl sind, um einzelne differentiell exprimierte Gene zu untersuchen, sollten die Transkriptomdaten auch genutzt werden, um geeignete Referenzgene für qRT-PCR-Analysen im Tomate-*Xcv*-Pathosystem zu identifizieren und mit üblicherweise verwendeten Referenzgenen zu vergleichen.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war die Analyse des Einflusses einzelner Effektorproteine von *Xcv* 85-10 auf die Transkriptmenge von *S. lycopersicum*-Genen. Zu diesem Zweck sollten die Effektorproteine XopB, XopG, XopL, XopI, XopQ sowie XopS *Agrobacterium*-vermittelt transient in *S. lycopersicum* exprimiert werden. Es sollten Gene identifiziert werden, deren Transkriptmenge durch die einzelnen Effektorproteine direkt oder indirekt beeinflusst wird. Das Effektorprotein AvrBs3 aus *Xcv* 82-8 wurde in diese Analysen einbezogen, um die Induktion bekannter *UPA*-Gene als Kontrolle zur Auswertung heranziehen zu können.

Schließlich sollte das Effektorprotein XopI näher charakterisiert werden. Da XopI eine eukaryotische F-Box enthält, könnte es über die Bindung an SKP1 pflanzliche Proteine zum 26S-Proteasom rekrutieren. Hefe-Dihybrid-Analysen sollten pflanzliche Interaktionspartner identifizieren und so neue Erkenntnisse zur einem möglichen Beitrag von XopI zur Virulenz von *Xcv* 85-10 liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Nährmedien und Antibiotika

Übernachtukturen von *E. coli*-Stämmen wurden in *Lysogeny Broth*-Medium (LB-Medium) (123) bei 37°C kultiviert. Transformierte *E. coli*-Zellen wurden in SOC-Medium (124) aufgenommen. Die Kultivierung von *Xanthomonas*-Stämmen erfolgte in NYG-Medium (Nutrient-Yeast-Glycerol) (125) bei 30°C für 48h. Die Anzucht von *A. tumefaciens*-Stämmen erfolgte in YEB-Medium (*Yeast-Extract-Broth*) (126) bei 30°C für 48 Stunden, die Inokulation dieser Stämme in Infiltrationsmedium (AIM). *S. cerevisiae* wurden in Vollmedium (YPDA), oder zur Selektionen auf Auxotrophiemarker in Minimalmedium (*synthetic defined/drop out*; SD/DO) kultiviert.

Tabelle 2: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung	Verwendungszweck
LB	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; pH 7,5	Anzucht von <i>E. coli</i>
SOC	2 % (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,05 % (w/v) NaCl; 20 mM Glucose	Transformation von <i>E. coli</i>
NYG	0,5% Bakto-Pepton, 0,3% Hefe-Extrakt, 0,2% Glycerin	Anzucht von <i>Xanthomonas</i>
YEB	0,5 % (w/v) Bakto-Fleisch-Extrakt; 0,1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,2 % (v/v) 1 M MgSO ₄ pH 7,2	Anzucht von <i>Agrobacterium</i>
YPDA	2 % (w/v) Bakto-Pepton; 1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 2 % (w/v) Glucose; 0,05 % (w/v) Adenin-hemisulfat; pH 5,8	Vollmedium zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>
SD/DO	0,67 % (w/v) Minimalmedium (<i>yeast nitrogen base, synthetic defined</i> , SD); 2 % (w/v) Glucose (20 % (w/v) sterile Stocklösung); 10 % (v/v) Aminosäurelösung (sterile 10x Stocklösung)	Minimalmedium zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>
AIM	10 mM MgCl ₂ ; 5 mM MES pH 5,3; 150 mM Acetosyringon	Inokulation von <i>Agrobacterium</i>

Festmedien enthielten 2 % (w/v) Agarose, falls nicht anders angegeben. Für Blau-Weiß-Selektionen (β -Galactosidase-Aktivität) (124) wurde dem Medium 0,004 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) zugesetzt. Zur Induktion von Genexpression wurde ggf. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Endkonzentration von 1 mM zugegeben.

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht hitzebeständige Bestandteile (z.B. Glucose oder Aminosäuren für Hefemedien) wurden sterilfiltriert.

Für die selektive Anzucht von Bakterien wurden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration [mg/ml]	Verwendete Verdünnung
Kanamycin	5	1:200
Ampicillin	100	1:1000 (Festmedium) 1:2000 (Flüssigkultur)
Rifampicin	20	1:200
Spectinomycin	50	1:1000
Gentamycin	7,5	1:500
Tetracyclin	2	1:200

Folgende Konzentrationen von Aminosäuren und Nukleotiden wurden in Selektivmedien für *S. cerevisiae* verwendet:

Tabelle 4: Konzentrationen von Aminosäuren und Nukleotiden in Hefemedien

Aminosäure	Konzentration [mg/l]
L-Adenin-Hemisulfat	200
L-Arginin	200
L-Histidin	200
L-Isoleucin	300
L-Leucin	1000
L-Lysine	300
L-Methionin	200
L-Phenylalanin	500
L-Threonin	2000
L-Tryptophan	200
L-Tyrosin	300
L-Uracil	200

Aminosäuren oder Nukleotide, die der Selektion von Hefezellen dienen (Auxotrophiemarker), wurden der entsprechenden Lösung nicht zugegeben.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien bei -80°C wurden *E. coli*-, *Agrobacterium*- bzw. *Xanthomonas*-Zellen in einer Glycerol-Lösung (10 % (v/v)) suspendiert.

2.1.2 Pflanzenmaterial

Für Infektionsstudien wurden Tomatenpflanzen der Linie *S. lycopersicum* cv. *MoneyMaker* sowie Paprikapflanzen (*C. annuum*) der nahezu isogenen Linien ECW (*Early Calwonder*), ECW-10R und ECW-30R verwendet. Die Kultivare ECW-10R und ECW-30R unterscheiden sich von ECW durch das Vorhandensein der Resistenzgene *Bs1* bzw. *Bs3* (127). Zur *Agrobacterium*-vermittelten transienten Genexpression wurden Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet.

Die Anzucht aller Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei einer Temperatur von 26°C , einer relativen Luftfeuchte von 60 % und einer Lichtperiode von 16 Stunden pro Tag.

Nach Inokulation der Pflanzen wurden diese in eine Phytokammer überführt (Series 101, Percival Scientific). Paprikapflanzen wurden bei 80 % relativer Luftfeuchte, 16 h / 8 h Tag-Nacht-Rhythmus und 26°C Tages- bzw. 22°C Nachttemperatur inkubiert. *N. benthamiana*- sowie *S. lycopersicum*-Pflanzen wurden mit 80 % relativer Luftfeuchte, 16h / 8h Tag-Nacht-Rhythmus und 20°C Tages- und Nachttemperatur inkubiert.

2.1.3 Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp / Eigenschaften	Referenz
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xcv)		
Xcv 85-10	Wildtyp	128
Xcv 85-10 Δ <i>hrcN</i>	<i>hrcN</i> -Deletionsmutante von Xcv 85-10, kein Aufbau des Pilus zu translokation von Effektorproteinen	47
<i>E. coli</i>		
OneShot [®] (TOP10)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg
ElectroMAX [™] DH10B [™]	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Life Technologies GmbH; Darmstadt
DH5 α (λ pir)	<i>recA</i> <i>hsdR17</i> (<i>rK⁻</i> <i>mK⁺</i>) ϕ 80/ <i>dlacZ</i> Δ M15 [λ pir]	129
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für Konjugationen	130
<i>A. tumefaciens</i>		
GV3101	Nopaline; Ti-Plasmid <i>cured</i>	131
GV2260	Octopine; Ti-Plasmid pGV2260	132
C58C1	Nopaline; Ti-Plasmid <i>cured</i>	132

Tabelle 6: Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Beschreibung	Referenz
PJ69-4a	<i>MATa</i> ; <i>trp1-901</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>gal4</i> Δ ; <i>gal80</i> Δ ; <i>LYS::GAL1-HIS3</i> ; <i>GAL2-ADE2</i> ; <i>met2::GAL7-lacZ</i>	133
MAV103	<i>MATa</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp-901</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>gal4</i> Δ ; <i>gal80</i> Δ ; <i>SPAL10-URA3</i> ; <i>GAL1-lacZ</i> ; <i>LYS2::GAL1-HIS3</i> ; <i>can1^R</i> ; <i>cyh2^R</i>	134

^R - Resistenz

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
DNA- und RNA-Analyse	
5x DNA-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
10x PCR-Puffer	0,5 M KCl; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5); 20 mM MgCl ₂ ; 1 % (v/v) TritonX 100; 0,1 % (w/v) Gelatine
1x TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA
1x TBE	89 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA
Protein-Analyse	
2x Laemmli-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerol; 10 % (v/v) β-Mercapto-Ethanol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
1x Tank (Laufpuffer)	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS
1x PBST	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ Dihydrat; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Elutionspuffer für GST-pull-down-Analysen	10 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Ko-IP-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 µl Protease-Inhibitor (<i>complete</i> , Roche)
Hefe-Analysen	
Lyse-Puffer für Plasmidpräparation	25 mM TrisHCl pH 8; 25 mM EDTA; 2,5 % (w/v) SDS
Western-Blot	
ECL-Lösung	100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1,25 mM 3-Aminophtalhydrazid (Luminol); 225 nM p-Cumarsäure; 0,3 % (w/v) H ₂ O ₂
1x TBST	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,05 % (v/v) Tween20
Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol

2.1.5 Vektoren und Plasmide

Eine Tabelle der verwendeten Vektoren und Plasmide ist in Anhang 2 aufgeführt.

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 3 aufgelistet und wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und RNA

2.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (135) unter Verwendung des mi-Plasmid-Miniprep Kit (Metabion international AG, Martinsried). Dazu wurden 2-4 ml einer Übernachtskultur in stationärer Wachstumsphase verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit 30-50 µl Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Plasmidpräparation aus Hefe wurden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet. Nach Zentrifugation der Zellen, wurden diese in 0,5 ml S-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Lysis-Puffer und 30 Minuten Inkubation bei 65°C, wurden 166 µl 3 M Kaliumacetat zugegeben und der Reaktionsansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten entfernt. Eine Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte in zwei Schritten durch Fällen mit 96 % bzw. 70 % (v/v) Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 14 000 rpm für je 10 Minuten. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µL Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1.3 Isolierung von RNA aus *S. lycopersicum* und *C. annuum*

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen wurde das *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Sowohl für *S. lycopersicum* als auch *C. annuum* wurden 16 Blattscheiben (je 0,2 cm²) geerntet. Dies entspricht einem Gewicht von ca. 50 mg und überschreitet das vom Hersteller angegebene Maximalgewicht von 100 mg nicht. Die Blattscheiben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert. Enthaltene RNA wurde laut Herstellerprotokoll isoliert, mit 40 µl DEPC-Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu minimieren, wurde anschließend ein DNaseI-Verdau durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde dabei verwendet:

40 µl RNA-Lösung
7,5 µl 10x DNaseI-Puffer
2 µl DNaseI (10 U/µl, Roche, Deutschland)
0,5 µl RNasin (20 U/µl, Promega, Deutschland)
ad 75 µl DEPC-H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 150 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, das Gemisch für 30 Sekunden invertiert und 15 min bei Raumtemperatur in PLG-Gefäßen (*Phase Lock Gel*, 5Prime, Deutschland) zentrifugiert (16000 x g). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde ein Gemisch aus 45 µl 3 M Natriumacetat (pH 5) und 405 µl EtOH zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mehrmals invertiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die RNA mittels Zentrifugation bei 4°C und 16000 x g für 30 Minuten pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 40 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Um die Löslichkeit der pelletierten RNA zu erhöhen wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 60°C inkubiert.

Die Integrität der RNA wurde anschließend mittels horizontaler Gelelektrophorese in ethidiumbromidhaltigen, 1%igen Agarosegelen bestimmt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer.

2.2.1.2 Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA erfolgte mittels Nanodrop®ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington). Dabei wurde die UV-Absorption der Probe bei 260 nm gemessen (OD₂₆₀ = 1,0 entspricht 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA).

2.2.1.3 Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten

DNA- oder RNA-Proben wurden mittels horizontaler Elektrophorese in ethidiumbromidhaltigen 1%igen (w/v) Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer für DNA und 1x TBE-Puffer für RNA. Als Längenstandard wurde die GeneRuler™ 1 Kb DNA Leiter (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die Visualisierung und Fotografie der aufgetrennten Fragmente erfolgte unter UV-Licht (Alphamager®, Alpha Innotech Corp., San Leandro).

2.2.1.4 Elution von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden zur Reinigung mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend der Gelbereich mit dem DNA-Fragment der entsprechenden Größe auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

2.2.1.5 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

2.2.1.5.1 Standard-PCR

Mit Hilfe von PCR-Reaktionen (136) wurden gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen mittels PCR wurde die *proof-reading*-Polymerase „Phusion“ aus *Pyrococcus furiosus* und der entsprechende PCR-Puffer (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Zur Durchführung von Kolonie-PCR-Reaktionen wurde laborintern hergestellte *Taq*-Polymerase und der entsprechende Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 8,5; 0,01 % Gelatine) verwendet. PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit Heizdeckel (FlexCycler, Analytic Jena, Jena) durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz (50 µL) wurde verwendet:

1 pg-100 ng DNA-Matrize
 1x PCR-Puffer
 200 µM dNTPs
 0,15 µM Oligonukleotid A
 0,15 µM Oligonukleotid B
 1 µl Polymerase
 ad 50 µl H₂O

PCR-Reaktionen wurden standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung	95°C	2 min	Z x
Denaturierung	95°C	30 s	
Anlagerung	X°C	30 s	
Elongation	72°C	Y s	
Elongation	72°C	5 min	
	4°C	∞	

In Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Matrize und den jeweiligen Oligonukleotiden wurde die Anlagerungstemperatur X, die Elongationszeit Y und die Zyklenanzahl Z

angepasst. Wurde „Phusion“-Polymerase verwendet, wurde die Temperatur der initialen Denaturierung auf 98°C erhöht.

Zur Durchführung von Kolonie-PCR-Reaktionen wurde dem Reaktionsansatz eine nicht definierte Zahl an Bakterienzellen (picken einer Kolonie mit Pipettenspitze) ohne vorangegangene DNA-Extraktion zugefügt. Dabei wurde der initiale Denaturierungsschritt (95°C) auf 5 Minuten verlängert, um einen effizienten Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

2.2.1.5.2 quantitative reverse transcription-PCR

Für quantitative *reverse transcription*-PCR (qRT-PCR)-Reaktionen wurde ein CFX96 Connect-Steuergerät verwendet (BioRad, Hercules, Californien, USA). Dabei wurde SYBR Green I als interkalierender Farbstoff zusammen mit einer HotStart-Taq-Polymerase verwendet (Absolute Blue qPCR SYBR Green Fluorescein Mix, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Folgender Standardansatz (20 µL) wurde verwendet:

8 ng cDNA-Matrize
 10 µl SYBR-Green I-Mix
 0,15 µM Oligonukleotid A
 0,15 µM Oligonukleotid B
 ad 20 µl H₂O

qRT-PCR-Reaktionen wurden standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung	95°C	15 min		Amplifikation (60x)
Denaturierung	95°C	15 s		
Anlagerung	57°C	15 s		
Elongation	72°C	25 s		
Messung der Fluoreszenz				

Die Spezifität der Oligonukleotid-Paare wurde durch Schmelzkurvenanalysen überprüft.

Denaturierung	50°C	10 s	
Messung der Fluoreszenz			
Denaturierung	100x +0,5°C	10 s	Schmelzkurve (100x)
Messung der Fluoreszenz			

Um eine absolute Quantifizierung zu gewährleisten, wurde die Effizienz der PCR-Amplifikation durch Standardkurven verschiedener Verdünnungsstufen der cDNA (1:5, 1:25, 1:125 und 1:625) überprüft. Zu Berechnung der Transkriptlevel wurden C_T-Werte von technischen Duplikaten von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten herangezogen. Eine Normalisierung erfolgte gegen mindestens zwei Referenzgene, deren

Auswahl auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruhte (4.2.1 und 4.2.2). Um C_T -Werte von verschiedenen PCR-Platten verrechnen zu können, wurden die Schwellenwert-Linien zur C_T -Wert-Bestimmung angeglichen.

Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA mittels quantitativer *real-time*-PCR (qRT-PCR) wurden nach verschiedenen Kriterien erstellt. Die Länge der Amplifikate wurde auf 250- bis maximal 500 nt begrenzt. Um die Amplifikation von möglichen Verunreinigungen mit genomischer DNA in cDNA-Proben zu vermeiden, wurden die Oligonukleotide (wenn möglich) über eine bestehende Intron-Exon-Grenze gelegt. Die Anlagerungstemperatur der einzelnen Nukleotidpaare wurde für 57°C optimiert. Dafür wurden die Webtools *oligonucleotide properties calculator* von Metabion (www.metabion.com/support/biocalc) und primer3 (www.primer3.ut.ee) (137) verwendet.

2.2.1.6 DNA-Sequenzierung

Sequenzreaktionen wurden nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des *Big DyeTM-Kit* nach Herstellerangaben (PE Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Anschließend wurde die in der Sequenzierreaktion enthaltene DNA durch Zugabe von 1 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5) und 3 Volumen gefällt und anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des *ABI PRISM® 377 Genetic Analyzer*- Sequenzierautomaten (PE Applied Biosystems, Darmstadt) durch einen Arbeitsgruppen-internen Service. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *Sequencher 4.6* (Gene Codes Corporation, USA) bzw. *Geneious Pro 5.3.6* (Biomatters, New Zealand).

2.2.1.7 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde, wenn nicht anders angegeben, das *Maxima First Strand cDNA Synthesis* Kit (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben und unter Verwendung eines Gemisches aus oligodT- und *random hexamer*-Oligonukleotiden genutzt. Dabei wurde 2 µg RNA als Matrize eingesetzt und die erhaltene cDNA 1:50 verdünnt. Nimmt man eine cDNA-Syntheseeffizienz von 100% an, ergibt sich Endkonzentration von 2 ng/µl.

Sollte Poly(A)⁺-RNA umgeschrieben werden, wurde das *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit (Fermentas GmbH, Deutschland) unter Verwendung von oligodT(18)-Oligonukleotiden nach Herstellerangaben genutzt.

2.2.1.8 Restriktionsanalysen

Restriktionsanalysen wurden mittels Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben durchgeführt (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte bzw. New England Biolabs; Frankfurt am Main). Anschließend wurde der Restriktionsverdau mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

2.2.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden *blunt-end* mit Hilfe des Restriktionsenzym *SmaI* in den Vektor pUC57 kloniert.

Folgender Standardansatz (20 μ L) wurde verwendet:

- 0,5 μ L *SmaI*
- 1 μ L *SmaI*-Restriktionspuffer
- 1 μ L T4 Ligase (30u)
- 1 μ L 10 mM ATP
- 50 ng pUC57
- 5,5 μ L PCR-Produkt

Die *cut-ligation* erfolgte im Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (*FlexCycler PCR Thermal Cycler*, Analytic Jena, Jena). Dabei wurden 6 Zyklen für je 10 min bei 37°C und 10 min bei 16°C durchgeführt. Anschließend wurden chemisch kompetente *E.coli*_{TOP10}-Zellen mit den erstellten Plasmiden transformiert.

2.2.1.10 Golden-Gate-Klonierung

Die Klonierung aller Konstrukte für Analysen mittels GST-*pull-down*, Koimmunopräzipitation, BiFC sowie alle Komplementationskonstrukte der XopI-Deletionsmutanten erfolgte nach der *Golden Gate Technology* (138). DNA-Fragmente der entsprechenden Gene wurden als Module mit flankierenden *BsaI*-Restriktionsschnittstellen wie unter Kapitel 2.2.1.4 beschrieben erstellt. Die Klonierung der Module in Expressionsvektoren erfolgte mittels *BsaI cut-ligation* (139), wobei die *cut-ligation* parallel im Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (*FlexCycler PCR Thermal Cycler*, Analytic Jena, Jena) erfolgte. Dabei wurden 6 Zyklen für je 30 min bei 37°C und 30 min bei 16°C durchgeführt. Anschließend wurden chemisch kompetente *E.coli*_{TOP10}-Zellen mit den assemblierten Konstrukten transformiert. Abschließend wurden die Konstrukte mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit *Insert*-spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2.2.1.11 Gateway-Klonierung

Sollten Xopl, Derivaten von Xopl oder identifizierte potentiell mit Xopl interagierende Proteine in *S. cerevisiae*-Zellen synthetisiert werden, wurden entsprechende Expressionskonstrukte mittels Gateway-Klonierung erstellt. Dafür wurden entsprechende kodierende Sequenzen zunächst mittels Golden-Gate-Klonierung in den Vektor pEGG, einem pENTR/D-Derivat, kloniert (Donorvektor). In diesem Vektor wird die klonierte Sequenz von *attL*-Rekombinationsstellen flankiert, die eine rekombinationsbasierte Klonierung in Expressionsvektoren mit *attR*-Rekombinationsstellen (LR-Rekombination in GATEWAY®-Vektoren) ermöglichen. Die LR-Rekombination wurde mit Hilfe des Enzyms *Clonase* II durchgeführt (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte), wobei 50 ng Donorvektor, 150 ng Expressionsvektor und 1 µl *Clonase* II in einem Gesamtvolumen von 10 µl für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

2.2.1.12 Transfer von DNA

Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur (10 ml LB-Medium) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur (meist 1 l) mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Bakterienkultur wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C (4000 rpm) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1/3 Volumen gekühltem Puffer TFB I (30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂; 15% Glycerol; pH 5,8) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,04 Volumen kaltem Puffer TFB II (10 mM NaMOPS pH7; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% Glycerol) resuspendiert, die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für jede Transformation wurden 50 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und eine entsprechende Plasmidmenge zugegeben. Nachdem einer Inkubation für 15-30 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 45 s. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 250 µl LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Festmedium ausplattiert, welches entsprechende Mengen Antibiotika zur Plasmidselektion enthielt.

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

Zur Herstellung elektrokompeter *E. coli*- bzw. *A. tumefaciens*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur von 10 ml LB- bzw. YEB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37° bzw. 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur (1 l) mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Kultur wurde für 10 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet dreimal in 1 Volumen des Ausgangsvolumens in eisgekühltem 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Danach wurde das Pellet in 1/10 des Ausgangsvolumens in 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für jede Transformation wurden je 50 µl elektrokompeter *E. coli*- bzw. *A. tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut und je 1 µl Plasmid-DNA zugegeben. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine eisgekühlte 2 mm Elektroporations-Küvette überführt. Zur Transformation wurde ein elektrischer Puls gegeben (*Electro Pulser*; BioRad GmbH, München), transformierte Bakterienzellen zügig in 250 µl LB- bzw. YEB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37° bzw. 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB- bzw. YEB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° bzw. 30°C inkubiert.

Herstellung und Transformation chemokompeter Hefezellen

Die Herstellung und Transformation von chemokomperten Hefezellen erfolgte nach der *LiAc/ss carrier DNA/ PEG*- Methode (140).

2.2.1.13 *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Genexpression in *N. benthamiana* und *S. lycopersicum*

Agrobacterium-Stämme mit entsprechenden Expressionsplasmiden wurden auf YEB-Festmedien mit entsprechenden Antibiotikazusätzen für 2 Tage bei 30°C angezogen. Zur Inokulation wurden *Agrobacterium*-Zellen in AIM resuspendiert und diese Bakterienlösung, wenn nicht anders beschrieben, auf eine OD₆₀₀ von 0,8 (etwa 8 x 10⁸ Zellen/ml) eingestellt. Sollten transformierte Pflanzenproben später als nach 48 h untersucht werden, erfolgte eine Ko-Inokulation mit *Agrobacterium*_{C58C1}-Zellen, die eine T-DNA mit dem *silencing*-Inhibitor *p19* (pBin61p19) enthielten. Die Bakterienlösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und mit Hilfe einer kanülenlosen Spritze in die Interzellularräume des Blattgewebes der Blattunterseite von *N. benthamiana*- oder *S. lycopersicum*-Blättern inokuliert.

2.2.1.14 Xcv-Infektionsexperimente

Xcv-Stämme wurden zwei Tage auf selektiven NYG-Platten angezogen. Für die Inokulationen wurden die Bakterien in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und auf verschiedene optische Dichte eingestellt. Für *Microarray*- und qRT-PCR-Analysen wurden *S. lycopersicum*-Blätter mit verschiedenen Xcv-Stämmen mit einer OD₆₀₀ von 0,4 inokuliert, bei Inokulationen zur phänotypischen Analyse von Xcv-Deletionsmutanten bzw. *Dipping*-Experimenten, wurden *S. lycopersicum*- bzw. *C. annuum*-Pflanzen mit einer OD₆₀₀ von 0,2 und 0,02 inokuliert bzw. gedippt. Für Stomata-Assays wurden *S. lycopersicum*-Blätter mit Xcv-Stämmen einer OD₆₀₀ von 0,3 infiziert. Inokulationen erfolgten mit einer kanülenlosen Spritze in die Blattunterseite entsprechender Blätter. Für *Dipping*-Experimente wurde den Bakterienlösungen 0,05 % (v/v) Silwet L77 SGS (Momentive Performance Materials GmbH, Leverkusen) zugegeben und ca. die Hälfte des Blattes für 1 min in die Bakteriensuspension eingetaucht.

Phänotypen wurden 3 bis 10 Tage nach Inokulation dokumentiert.

2.2.1.15 Bestimmung der Stomata-Apertur von *S. lycopersicum*

Die Apertur von Stomata mit Xcv infizierter *S. lycopersicum*-Blätter wurde anhand mikroskopischer Bilder in Anlehnung an das Protokoll von Chitrakkar und Melotto bestimmt (141). Xcv-Stämme, deren Einfluss auf die Stomata untersucht werden sollte, wurden zwei Tage auf selektiven NYG-Platten angezogen. Anschließend wurden die Bakterien in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in eingestellt.

Je zwei Blattscheiben (Ø 0,5 cm) unterschiedlicher Pflanzen wurden für 10 min in einer 20 µM Propidium-Iodid-Lösung inkubiert und anschließend kurz in Wasser gespült. Anschließend wurden 300 µL der Bakteriensuspensionen auf einen Objektträger gegeben und beide Blattscheiben mit der Blattunterseite nach unten auf den Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden für 3 h unter Gewächshausbedingungen ohne Licht inkubiert.

Anschließend wurden die Blattscheiben mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops LSM780 und der Software ZEN (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) anhand eines spezifischen Filters für Propidiumiodid analysiert. Mit Hilfe der Software ZEN wurde die maximale Öffnung von mindestens 60 Spaltöffnungen gemessen sowie das arithmetische Mittel berechnet. Nach der Durchführung von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung zwischen verschiedenen Experimenten berechnet. Statistisch signifikante Änderungen der stomatalen Apertur wurden anhand studentischer t-Tests überprüft.

2.2.1.16 Generierung von *xopI*-Deletionsmutanten in *Xcv*

Für die Generierung der Deletionskonstrukte wurden zunächst die flankierenden Genbereiche (je 1 Kb) von genomischer DNA des Stammes 85-10 amplifiziert und *blunt end* in den Vektor pUC57 kloniert. Durch die verwendeten Oligonukleotide wurden Restriktionsschnittstellen eingeführt, die sowohl eine Ligation beider Fragmente als auch eine Klonierung in den Suizidvektor pOK1 (142) erlauben. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli*_{DH5 α} (λ pir)-Zellen (129) mit diesem Konstrukt transformiert und folgend das Deletionskonstrukt über triparentale Konjugation in den Stamm *Xcv* 85-10 eingeführt. Die Selektion auf Rekombinationsereignisse, die zur Deletion von *xopI* führten, erfolgte wie in Hausner *et al.* 2013 beschrieben. Erhaltene *xopI*-Deletionsmutanten wurden anschließend Kolonie-PCR-basiert mit Oligonukleotiden für *xopI*, *hrcN* und *sacB* überprüft.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western-Blot

Für Extrakte infizierter *N. benthamiana*- und *S. lycopersicum*-Blätter wurden drei Blattscheiben (\varnothing 0,9 cm) von verschiedenen Pflanzen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und mit 100 μ l 2x Laemmli-Puffer versetzt. Für Proteinextrakte aus Hefezellen wurden die zu untersuchenden Hefestämme für zwei Tage in entsprechenden Flüssigkulturen angezogen. Zum Aufschluss der Zellen wurden 2,5 OD-Einheiten pelletiert und in 100 μ l *aqua dest.* resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μ l 0,2 M NaOH wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 50 μ l 2x Laemmli-Puffer resuspendiert. Für Proteinextrakte aus *E. coli*-Zellen wurden Zellpellets aus 1 ml Übernachtskultur mit 50 μ l 2x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proteinextrakte wurden anschließend für 5-10 Minuten im Wasserbad denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 4%-igen Sammelgelen und 10%-igen Trenngelen. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 20 μ l der Proteinextrakte aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 140 V, 400 mA in 1 x Tank-Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) durchgeführt. Der *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher) diente als Standard für Molekulargewichte. Für Western-Blot Analysen wurden aufgetrennte Proteine in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,1 % SDS) auf eine Nitrocellulosemembran (*Whatman* Protran®, Schleicher und Schuell GmbH) transferiert (90 V, 400 mA und 4°C für 95 Minuten). Nach Blockieren der Membran für 1 h in 1x TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20, pH 8,0) mit 5% Magermilchpulver und 3% BSA wurde die Membran über Nacht bei 8°C mit dem

primären Antikörper inkubiert (Tabelle 8). Nach drei Waschschrritten mit 1x TBST wurden entsprechende sekundäre Antikörper (Tabelle 8) zugegeben und entsprechende Signale von Fusionsproteinen mittels verstärkter Chemilumineszenz (*enhanced chemoluminescence*, ECL) detektiert. Dafür wurde die Membran in ECL-Lösung (100 mM Tris-HCl, 225 nM p-Cumarinsäure, 1,25 mM 3- Aminophtalhydrazid, 0,3 % (v/v) H₂O₂, pH 8,5) für 1 min inkubiert. Anschließend wurden Biomax Light 1-Filme (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) zur Detektion der Signale belichtet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Sekundärer Antikörper (1:10000)
anti-c-Myc	1:200	Santa Cruz, Heidelberg	anti-Kaninchen (GE Healthcare, Pittsburgh, USA)
anti-GFP	1:3000	Thermo Scientific, Schwerte	anti-Kaninchen
anti-GST	1:10000	GE Healthcare, Freiburg	anti-Ziege (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
anti-His	1:2000	Roche, Mannheim	Anti-Maus
anti-BD _{Gal4}	1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	anti-Kaninchen
anti-AD _{Gal4}	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	anti-Kaninchen

2.2.2.2 Lokalisierungsstudien mittels GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Agrobacterium-Stämme zur transienten Expression entsprechender GFP-Fusionskonstrukte wurden in Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Nach 24 Stunden wurden Blattproben am konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop LSM780 mit Hilfe der Software ZEN (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) unter Verwendung eines GFP-Filters nach Herstellerangaben untersucht. Die stabile Synthese der Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot mit GFP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

2.2.2.3 Interaktionsstudien

2.2.2.3.1 Interaktionsstudien *in vitro* mittels GST-pull-down

Für Interaktionsstudien mittels GST-pull-down wurden rekombinante Proteine von GST (Vektor pDEST15), GST-Xopl bzw. GST-Xopl_{ΔF-Box} (Vektor pGGE2) sowie His₆-CaSkp1 (Vektor pGGE6) in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen hergestellt. Die *E. coli*-Zellen wurden in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C und 130 rpm angezogen. Eine Hauptkultur wurde auf eine OD₆₀₀ 0,05 angeimpft und die Expression der Fusionskonstrukte zur Induktion IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die Zellen wurden 2 h bei

Raumtemperatur schüttelnd (130 rpm) inkubiert, und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 2100 x g und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 3 ml 1 x PBST resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch viermalige Frost-Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff und anschließendem 37°C Wasserbad. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurden die aufgeschlossenen Zellen mit je 50 µl DNaseI (1 mg/ml) und RNaseA (1 mg/ml) versetzt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 40 000 x g und 4°C zentrifugiert. 600 µl Extraktes wurde mit 50 µl Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) versetzt. Nach Inkubation von einer Stunde bei 4°C unter Rotieren wurde die Glutathion-Sepharose zweimal mit je 1 ml kaltem 1 x PBST gewaschen. Anschließend wurden je 600 µl des Lysates von *E. coli*-Zellen, welche His₆-Fusionkonstrukte des zu untersuchenden Interaktionspartners synthetisierten zugegeben und das Gemisch für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose viermal mit je 1 ml kaltem 1 x PBST gewaschen. Die Elution spezifisch gebundener Proteine erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 20 °C mit 40 µl 10 mM reduziertem Glutathion, welches in 50 mM Tris-HCl pH 8,5 gelöst war. Sowohl die Totalextrakte, als auch Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.2.2.3.2 Interaktionsstudien *in vivo* mittels Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)

Für Interaktionsstudien mittels Ko-Immunopräzipitation wurden GFP- bzw. Myc₄-Fusionskonstrukte der Interaktionspartner erstellt (Vektoren pGGA2 und pGGA8) und *A. tumefaciens*_{GV3101}-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert. Entsprechende *Agrobacterium*-Stämme wurden auf Festmedium kultiviert, in AIM auf eine OD₆₀₀ 1,6 eingestellt und mit einem Stamm zur Expression des p19- *silencing*-Inhibitors im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Das Gemisch wurde anschließend mit einer kanülenlosen Spritze in jeweils ein Blatt von drei *N. benthamiana* Pflanzen inokuliert. Nach drei Tagen wurden mit einem Korkbohrer insgesamt je 3 Blattscheiben (Ø = 0,9 cm) pro Pflanze vereinigt und in *safelock*-Reaktionsgefäßen (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Mörsers homogenisiertes Blattmaterial wurde mit 1 ml KolP-Puffer versetzt und durch vortexen gemischt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 10000 x g und 4°C wurde der Überstand mit 100 µl 10 %igem Nonidet-P40 versetzt. Anschließend wurden 20 µl Protein G-Agarose (Roche) zugegeben und das Gemisch für eine Stunde bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Durch Zentrifugation wurde die Protein-G-Agarose entfernt und der erhaltene Extrakt anschließend mit 2 µg anti-c-Myc₄ Antikörper (Roche) eine Stunde bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Protein G-Agarose (Roche) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 4°C

über Kopf rotierend inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine mittels Kochen für 10 Minuten in 50 µl 2x Laemmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.2.2.3.3 Interaktionsstudien *in vivo* mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Interaktionsstudien mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) wurden unter Verwendung des gelb fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*, YFP) durchgeführt. Dafür wurden N-terminale Fusionskonstrukte der Interaktionspartner mit der C- bzw. N-terminalen Domäne von YFP erstellt (Vektor pGGA28: YFP_N AS 1-154, Vektor pGGA30: YFP_C AS 155-239) und *A. tumefaciens*_{GV3101}-Zellen mit diesen Expressionskonstrukten transformiert. Entsprechende *A. tumefaciens*_{GV3101}-Stämme wurden auf Festmedium kultiviert, auf eine OD₆₀₀ 1,6 eingestellt und mit *A. tumefaciens*_{C58C1}-Zellen zur Expression des p19-*silencing*-Inhibitors im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Blätter von zwei *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit einer kanülenlosen Spritze mit dieser Bakterienlösung inokuliert. Nach drei Tagen wurden Blattproben am konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop LSM780 und der Software ZEN (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) mit spezifischen Filtern für YFP analysiert.

2.2.2.3.4 Hefe-2-Hybrid-Sichtung

Hefe-Dihybrid-Sichtungen wurden nach dem Prinzip des MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-Dihybrid-Systems und nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefanie Mücke BD_{Gal4}-Xopl- bzw. BD_{Gal4}-Xopl Δ _{F-Box}-Fusionskonstrukte im Vektor pGBT9 erstellt. Für die Sichtungen wurde eine Bibliothek eines cDNA-Gemisches aus mit Xcv 85-10 infizierten und nicht infizierten Paprika ECW- und ECW-30R-Pflanzen (Szczesny *et al.*, 2010) verwendet. Enthaltene cDNAs lagen in dieser Bibliothek als AD_{Gal4}-Fusionskonstrukte vor.

In zwei unabhängigen Ansätzen wurde *S. cerevisiae*_{MaV103}-Zellen mit je 10 µg der Plasmid-DNA der cDNA-Bibliothek und 10 µg der Plasmid-DNA der Köderplasmide BD_{Gal4}-Xopl bzw. BD_{Gal4}-Xopl Δ _{F-Box}, wie unter Kapitel 2.2.1.12 beschrieben, ko-transformiert. Der Transformationsansatz wurde für drei Stunden in YPDA-Medium bei 30°C inkubiert und anschließend auf Minimalmedium zur Uracil-Selektion (ohne Uracil) plattiert. Dem Minimalmedium wurde zur Selektion auf Köderplasmide kein Tryptophan und zur Selektion auf Beuteplasmide kein Leucin zugegeben. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz

wurde eine 10^{-4} -Verdünnung des jeweiligen Transformationsansatzes auf Minimalmediumplatten zur Selektion auf Köder- und Beuteplasmide plattiert und nach Inkubation ausgezählt. Erhaltene Ko-Transformanden wurden erneut auf Selektivmedium ohne Uracil, Tryptophan und Leucin übergestrichen und die Plasmide der positiven Ko-Transformanden isoliert (siehe Kapitel 2.2.1.1.2). *E. coli*_{DH10B}-Zellen (ElectroMAX™ DH10B, Life Technologies GmbH; Darmstadt) wurden mit den Plasmiden transformiert und die Plasmide erneut isoliert.

In einem Spezifitätstest wurde die Interaktion der BD_{Gal4}-Fusionskonstrukte mit den Köder-Fusionskonstrukten erneut analysiert. Dafür wurden kompetente *S. cerevisiae*_{MaV103}-Zellen mit den isolierten Beute-Plasmiden sowie den Köder-Plasmiden zur Expression von von BD_{Gal4}-Xopl-, BD_{Gal4}-Xopl Δ _{F-Box} oder BD_{Gal4} (Kontrolle) erneut ko-transformiert. Je zwei erhaltene Ko-Transformanden wurden in flüssigem Minimalmedium ohne Tryptophan und Leucin kultiviert. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt und je 3 μ L von Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) auf Minimalmediumplatten ohne Uracil bzw. Histidin, Tryptophan und Leucin getropft. Minimalmedium ohne Histidin enthielt 20 mM 3-Amino-1, 2,4-triazol (3-AT). Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und Interaktionen von Beute- und Köderproteinen anhand des Wachstums beurteilt. Beuteplasmide, die für positiv getestete Fusionsproteine kodierten, wurden anschließend sequenziert. Anhand der erhaltenen Sequenzen wurden mittels Datenbanksuche homologe Proteine aus *S. lycopersicum* und *C. annuum* identifiziert (pBLASTx, www.solgenomics.net/blast).

2.2.2.3.5 Interaktionsstudien in Hefe

Für Interaktionsstudien in Hefe wurden *S. cerevisiae*_{MaV103}- oder *S. cerevisiae*_{PJ69-4a}-Zellen mit entsprechenden Köder- und Beuteplasmiden ko-transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.12). Die Anzucht von einzelnen Transformanden erfolgte für zwei Tage in Flüssigmedium zur Leucin- und Tryptophan-Selektion. Nach Einstellen einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden je 3 μ L von Verdünnungsstufen (1, 1:10, 1:100) auf Minimal-Selektionsmedium getropft und für zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert. Minimalmedium zu Histidin-Selektion enthielt 20 mM 3-AT.

2.2.3 *Microarray*-Analysen

2.2.3.1 *Microarray*-Chips für Transkriptomanalysen von *S. lycopersicum*

Um die Transkriptmengen aller 34.383 annotierter *S. lycopersicum*-Gene (Annotation nach "The International Tomato Annotation Group", ITAG, Version 2.3) zu bestimmen, wurden durch die Firma Source BioScience (Berlin) je fünf Oligonukleotid-Sonden pro Gen mit einer Länge von 50 Basenpaaren auf einen *Agilent custom array* gespottet und mit Hilfe von RNA infizierter *S. lycopersicum*-Pflanzen getestet. Dafür wurde Source BioScience RNA von infizierten *S. lycopersicum*-Pflanzen des Kultivars *MoneyMaker* zur Verfügung gestellt. Die verwendete RNA-Probe wurde aus Blättern von vier *S. lycopersicum*-Pflanzen isoliert, welche mit dem Stamm *Xcv 85-10 p(avrBs3)* infiziert wurden (OD_{600} 0,4). Dabei wurde nach 8 Stunden RNA aus einem Pool von 16 Blattscheiben isoliert, wobei je vier Blattscheiben (\varnothing 0,5 cm) jeder Pflanze geerntet wurden. Aufgrund der limitierten Kapazität der letztendlich verwendeten *8x60K Microarray Chips*, wurden für 25 985 zufällig ausgewählte Gene je zwei passende Oligonukleotide gespottet, für 8 398 Gene je ein Oligonukleotid.

2.2.3.2 RNA-Proben infizierter *S. lycopersicum*-Pflanzen und Expressionsanalyse

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden für jeden erstellten Datensatz 12 *S. lycopersicum*-Pflanzen mit verschiedenen *Xcv*-Stämmen mit einer OD_{600} von 0,4 bzw. zur transienten Expression einzelner GFP-Effektorprotein-Fusionskonstrukte mit *Agrobacterium*-Stämmen mit einer OD_{600} von 0,8 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mit einem Korkbohrer je vier Blattscheiben (\varnothing 0,5 cm) eines Blattes jeder Pflanze entnommen. Die Blattscheiben von je vier Pflanzen wurden vereinigt (16 Blattscheiben) und anschließend die Gesamt-RNA dieser Proben isoliert (Kapitel 2.2.1.1.3). Insgesamt wurden von jeder Probe drei Replikate erstellt. Die RNA-Menge sowie deren Qualität und Integrität jeder Probe wurde mittels Absorptionsspektren am Spektrophotometer und Gelelektrophorese bestimmt. Je 1,5 μ g Gesamt-RNA jeder Probe wurden an Source BioScience (Berlin) verschickt, durch deren Zusammenarbeit die cDNA-Synthese (oligo dT-Priming), die Markierung sowie die *Microarray*-Hybridisierungen nach Standardprotokollen von Agilent (Santa Clara, Californien, USA) durchgeführt wurden.

2.2.3.3 Bioinformatische Analyse der *Microarray*-basierten Daten

Microarray-basierte Rohdaten der analysierten Proben (Spalte „*gProcessedSignal*“) jedes Datensatzes wurden nach Bereitstellung durch Source BioScience in Zusammenarbeit mit

Dr. Jan Grau (Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg) mit Hilfe des *preprocess*-R-Pakets (143) Quantil-normalisiert. Um anschließend differentiell exprimierte Gene in den Datensätzen zu identifizieren, wurden logarithmierte *fold-changes* zur Basis 2 (*lfc*) zwischen verschiedenen Proben berechnet. Replikate wurden dabei durch Bildung des arithmetischen Mittels zusammengefasst. Expressionswerte unterschiedlicher Sonden desselben Gens wurden ebenfalls gemittelt. Die Signifikanz der identifizierten differentiell exprimierten Gene wurde durch statistische Tests (Signifikanzfilter) verifiziert. Zunächst wurde mit Hilfe eines einseitigen studentischen t-Tests p-Werte für *lfc* differentiell exprimierter Gene berechnet, wobei als Schwellwert $p \leq 0,05$ gewählt wurde (Signifikanzfilter 1). Da es sich bei der Gesamtzahl von 34.383 analysierten Genen in der Statistik um multiples Testen handelt, werden bei einem Signifikanz-Schwellwert von $p \leq 0,05$ statistisch 1.719 falsch positiv differentiell exprimierte Gene akkumuliert. Um dies zu vermeiden, wurden die p-Werte nach der Benjamini-Hochberg-Methode korrigiert (*False Discovery Rate*, FDR) (144) (Signifikanzfilter 2). Anschließend wurden Varianzanalysen (*Analysis of Variance*, ANOVA) bezüglich aller Gene getrennt für alle Datensätze durchgeführt. Mit Hilfe der ANOVA wurden p-Werte für alle Gene berechnet, welche aussagen, ob sich das mittlere Expressionsniveau eines Gens zwischen zu vergleichenden Proben eines Datensatzes signifikant im zeitlichen Verlauf der Infektionsexperimente unterscheidet. Wurden Werte von $p \leq 0,01$ berechnet, wurde das entsprechende Gen weiter betrachtet (Signifikanzfilter 3). Da die mittleren Transkriptmengen aller *S. lycopersicum*-Gene sehr unterschiedlich sind, erlauben berechnete Varianzen (Standardabweichungen) eines Gens über verschiedene Replikate keine Aussage über das Maß der Streuung einzelner Expressionswerte. Gene mit höherem Expressionsniveau zeigen höhere Varianzen, wodurch diese Varianzen nicht normierbar sind. Um dennoch eine Normierung der Varianzen zu ermöglichen, wurden Variationskoeffizienten (K_V) für alle Gene über die Gesamtzahl der betrachteten Proben berechnet. Dabei wurden nur Gene betrachtet, deren $K_V \geq 0,2$ war (Signifikanzfilter 4). Sollten statistisch signifikante Unterschiede in Gruppen von Expressions-Mittelwerten untersucht werden, wurden anhand von Post-Hoc-Tests (Tukey-Test) p-Werte berechnet, die eine Auswahl spezifisch regulierter Gene einzelner Probengruppen erlauben ($p < 0,05$; Signifikanzfilter 5).

2.2.3.4 Berechnung der Anreicherung von GO-Termen

GO-Terme werden verwendet, um Proteine übergreifend über alle zur Verfügung stehenden Datenbanken (Transkriptomdaten, Interaktionsstudien, Studien von Deletionsmutanten, etc.) verschiedenen zellulären Prozessen zuzuordnen. Über die Berechnung der Anreicherung von GO-Termen innerhalb verschiedener Schnittmengen von regulierten Genen, wurden regulierte Zellprozesse identifiziert. Dafür wurden p-Werte berechnet, welche eine statistisch

signifikante Anreicherung von GO-Termen innerhalb gewählter Gruppen differentiell exprimierter Gene wiedergeben. Anschließend erfolgte eine Korrektur der p-Werte nach Benjamini-Hochberg-Methode (*False Discovery Rate*, FDR) (144). Als Schwellwert wurde $p < 0,01$ gewählt. Als Grundlage diente eine Liste von GO-Termen aus *S. lycopersicum*, welche den Stand von Mai 2015 widerspiegelt (<http://geneontology.org>).

3 Ergebnisse

3.1 Xcv-induzierte Änderungen des Transkriptoms von *S. lycopersicum*

Um den Einfluss von *Xcv* auf das pflanzliche Transkriptom zu analysieren, wurden vergleichende Infektionsstudien von *S. lycopersicum*-Blättern durchgeführt. Alle Proben wurden mit Hilfe von *Microarray*-Analysen auf Transkriptmengen der 34.383 annotierten Gene von *S. lycopersicum* (Stand 2012) vergleichend untersucht.

3.1.1 Transkriptomanalysen infizierter *S. lycopersicum*-Blätter

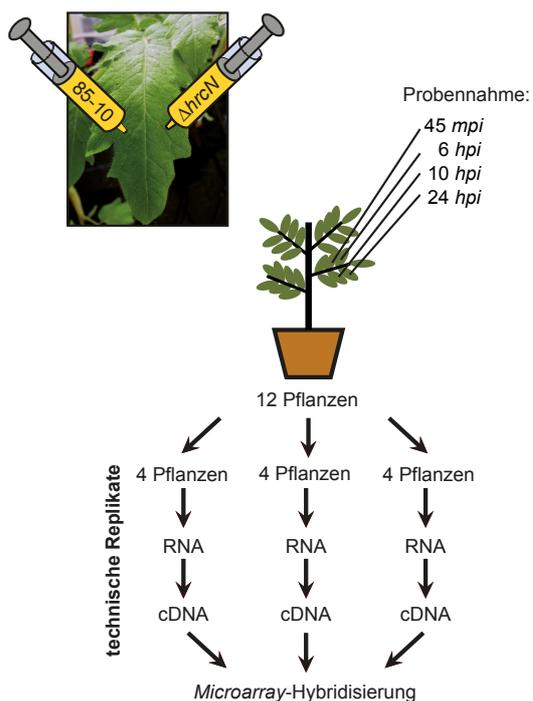
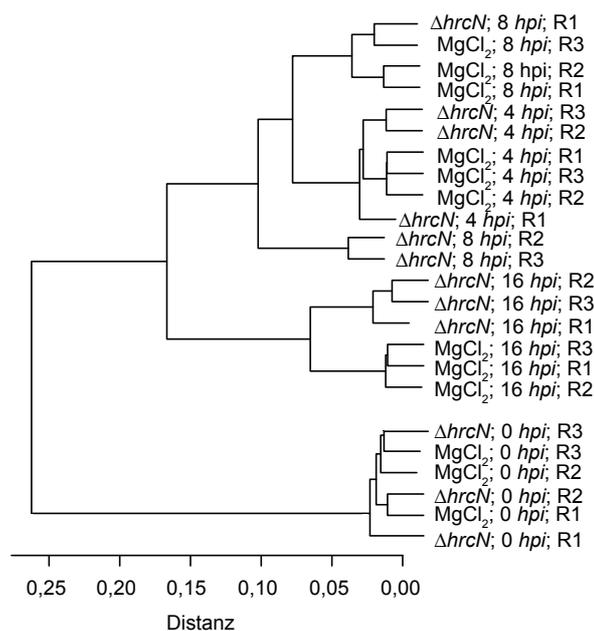
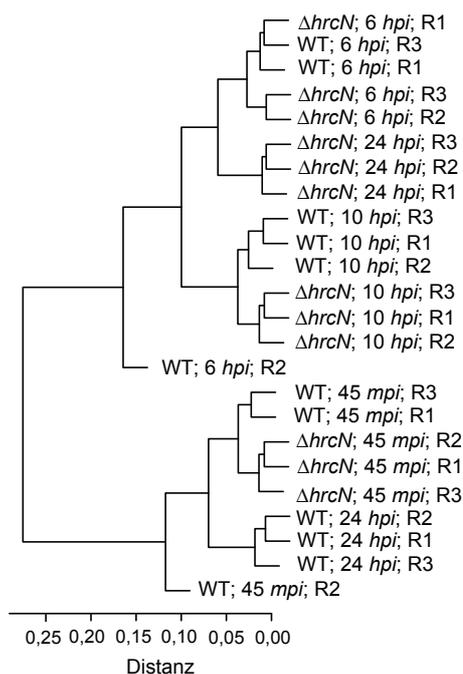
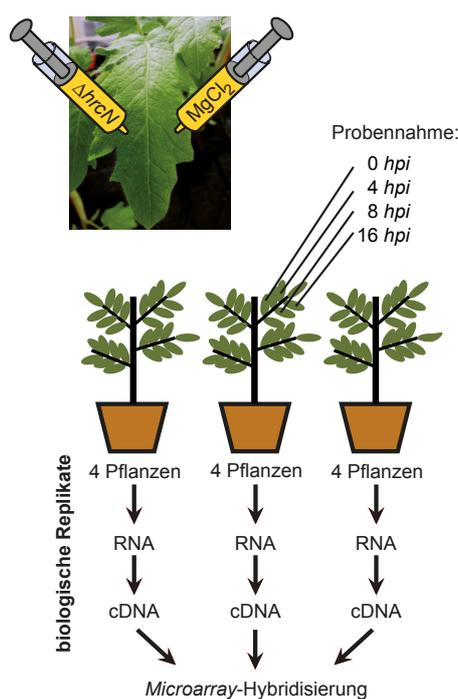
Zur Identifizierung von *S. lycopersicum*-Genen, deren Transkriptmenge sich während der Infektion mit *Xcv* ändert, wurden zwei verschiedene *Microarray*-basierte Experimente durchgeführt und analysiert (Abb. 3). Um zu untersuchen, ob *Xcv*-T3E das Wirtstranskriptom verändern, wurden Blätter von *S. lycopersicum*-Pflanzen mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (Wildtyp) bzw. 85-10 Δ *hrcN* infiziert. In 85-10 Δ *hrcN* ist *hrcN*, welches die ATPase des T3SS kodiert, deletiert, sodass keine T3E-Proteine in die Pflanzenzellen transloziert werden (47). Um die zeitliche Dynamik der Transkriptomänderungen zu untersuchen, wurden Proben von infiziertem Blattmaterial 45 Minuten (*minutes post infection; mpi*) sowie 6h, 10h und 24h (*hours post infection; hpi*) nach der Infektion analysiert. Zur Minimierung der Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzen und experimentellen Bedingungen wurden je inokuliertem *Xcv*-Stamm und Zeitpunkt drei technische Replikate erstellt, wobei für jedes Replikat aus vier Pflanzen jeweils vier Blattscheiben geerntet und vereinigt wurden (Abb. 3A). Wegen der hohen Probenanzahl in diesem ersten Experiment (n=36) wurde hier auf eine MgCl₂-Infiltration als Kontrolle verzichtet.

Im folgenden Experiment wurde die Frage untersucht, welche *S. lycopersicum*-Gene während der Infektion mit dem T3S-defizienten Stamm 85-10 Δ *hrcN* in ihrer Transkriptmenge verändert werden. Diese werden im Folgenden als potentielle Abwehrgene bezeichnet, obwohl deren Transkriptmenge auch durch sekundäre Effekte der Abwehr gegen den nicht-pathogenen *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* verändert sein kann. Für dieses Experiment wurden Blätter von *S. lycopersicum*-Pflanzen mit dem *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* infiziert bzw. mit einer MgCl₂-Lösung infiltriert. Da die Basalabwehr im Infektionsverlauf vermutlich sehr früh induziert wird, wurden hier im Vergleich zum ersten Experiment frühere Zeitpunkte der Probennahme gewählt (direkt nach der Inokulation bzw. Infiltration (0h) sowie nach 4h, 8h und 16h). Im Gegensatz zum ersten Experiment wurden drei biologische Replikate der

Proben erstellt. Dafür wurden je Replikate und Zeitpunkt vier Blattscheiben von vier Pflanzen geerntet und vereinigt (Abb. 3B).

Beide Experimente wurden zusammen ausgewertet. Ziel war dabei die Identifizierung von Genen, die möglicherweise im Zuge pflanzlicher Abwehrmechanismen in ihrer Transkriptmenge erhöht bzw. vermindert und durch Xcv-T3E invers reguliert werden.

Die Synthese der cDNA, die Markierung und Hybridisierung der *Microarray-Chips* wurden durch die Firma Source BioScience (Berlin) durchgeführt (2.2.3.1 und 2.2.3.2). Die Rohdaten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Grau (Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg) Quantil-normalisiert und ausgewertet (2.2.3.3). Zunächst wurden die normalisierten Intensitäten der Hybridisierungssignale aller Replikate eines Datensatzes verglichen. Dabei wiesen, wie erwartet, die meisten Replikate von Proben gleicher Infektionsbedingungen ein vergleichbares Expressionsverhalten aller Gene auf (Abb. 3A und B). Allerdings wurde im ersten Experiment in dem Blattmaterial, welches mit Xcv 85-10 infiziert wurde (45 *mpi* und 6 *hpi*, je Replikate 2), ein von den übrigen Replikaten stark abweichendes Expressionsverhalten beobachtet. Expressionswerte dieser Proben wurden daher nicht weiter betrachtet.

A Experiment 1:
potentiell T3SS-abh. regulierte Gene

B Experiment 2:
potentielle Abwehrgene

Abb. 3: Experimentelle Ansätze zur Analyse des *S. lycopersicum*-Transkriptoms nach *Xcv*-Infektion

Beide *Microarray*-basierten Experimente sind schematisch dargestellt. **(A)** Zur Identifizierung potentiell T3SS-abhängig regulierter Gene wurden *S. lycopersicum*-Blätter von 12 Pflanzen mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hrcN$ ($\Delta hrcN$) inokuliert. Nach 45 Minuten (*mpi*) bzw. 6, 10 und 24 Stunden (*hpi*) wurden je inokuliertem Stamm vier Blattscheiben von je vier Pflanzen geerntet und zu einem technischen Replikat vereinigt (16 Blattscheiben). **(B)** Zur Identifizierung potentieller Abwehrgene wurden *S. lycopersicum*-Blätter mit dem nicht-pathogenen *Xcv*-Stamm 85-10 $\Delta hrcN$ ($\Delta hrcN$) inokuliert bzw. mit einer $MgCl_2$ -Lösung infiltriert. Proben wurden direkt nach der Inokulation bzw. Infiltration (0 *hpi*) bzw. 6, 10 und 24 *hpi* von je vier Pflanzen entnommen und zu einem von drei biologischen Replikaten vereinigt. Aus den einzelnen Proben wurde die Gesamt-RNA isoliert und zur cDNA-Synthese und *Microarray*-Hybridisierung weiterverwendet. Anschließend wurden mittels hierarchischen Clustering die Expressionsmuster aller *S. lycopersicum*-Gene zwischen den Replikaten (R1-R3) der verschiedenen Proben (**A** und **B**) verglichen und als Dendrogramm dargestellt. Der Grad der Abweichung der Expressionsmuster wird durch die Distanz beschrieben.

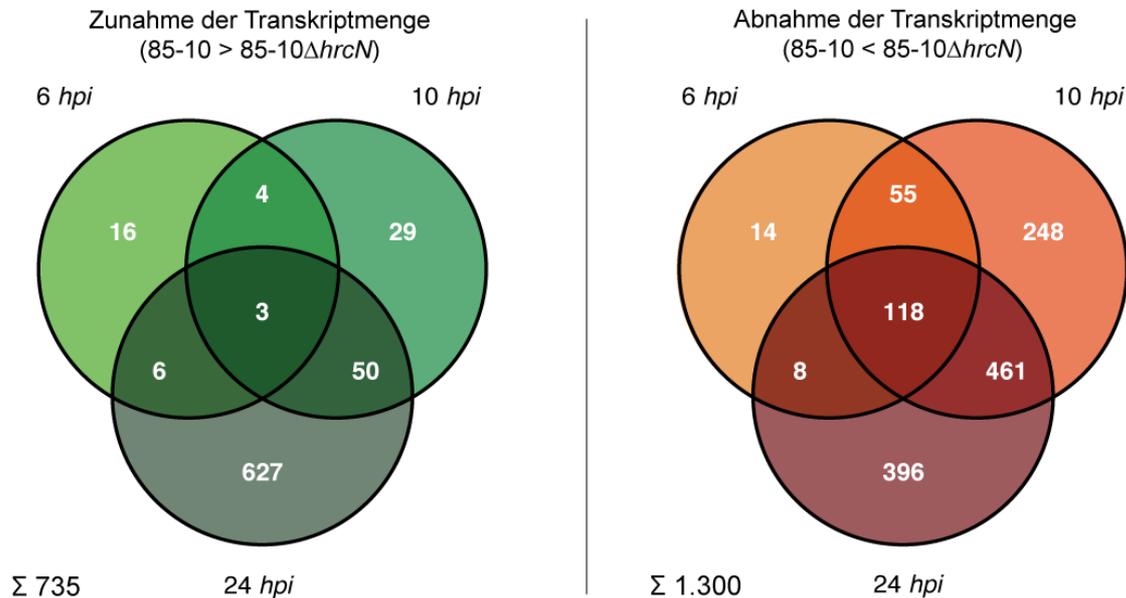
Um differentiell abundante *S. lycopersicum*-Transkripte zu identifizieren, wurden die Unterschiede der Fluoreszenzwerte zwischen den verschiedenen Proben als logarithmierte *fold changes* zur Basis 2 (*lfc*) berechnet, *lfc* unterschiedlicher Replikate gemittelt, und anschließend anhand der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen Signifikanzfilter evaluiert. Für Experiment 1 wurden die Transkriptabundanzen aller Gene nach Infektion mit *Xcv* 85-10 mit denen nach Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen. Dabei wurde zwischen mutmaßlich T3SS-abhängig in ihrer Transkriptmenge erhöhten (*lfc* > 1) und T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge verminderten (*lfc* > -1) Genen unterschieden. Unter der Annahme, dass die Translokation von *Xcv*-T3E 2-3 *hpi* beginnt (Ulla Bonas, persönliche Mitteilung), wurden nur Gene betrachtet, deren Transkriptmenge 45 *mpi* (Kontrolle) keinen signifikanten Unterschied in mit 85-10- und 85-10 Δ *hrcN*-infiziertem Blattmaterial aufwies. Daher wurden 217 bzw. 347 Gene nicht weiter analysiert, die 45 *mpi* mit *Xcv* 85-10 signifikant erhöhte bzw. verminderte Transkriptmengen aufwiesen (Anhang 4).

Analog wurden in Experiment 2 Gene identifiziert, deren Transkriptmenge nach Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*, verglichen mit der MgCl₂-Kontrolle, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion signifikant verändert war. Unter der Annahme, dass diese Gene mutmaßlich an der Basalabwehr beteiligt sind, wurde hierbei zwischen während der Basalabwehr in ihrer Transkriptmenge erhöhten (*lfc* > 1) oder verminderten (*lfc* > -1) Genen unterschieden. Dabei wurden nur Gene betrachtet, deren Transkriptmenge 0 *hpi* nicht signifikant verändert war. Demnach wurde eine Gruppe von 116 bzw. 56 Genen nicht weiter betrachtet, deren Transkriptmenge bereits 0 *hpi* mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* signifikant erhöht bzw. vermindert war (Anhang 5).

Anhand der Signifikanzfilter (2.2.3.3) wurden zunächst normalisierte Expressionswerte einzelner Proben miteinander verglichen und statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene der beiden Experimente identifiziert. Die Gesamtzahl der mutmaßlich durch T3E-Proteine bzw. während der Basalabwehr in ihrer Transkriptabundanz veränderten Gene unterschiedlicher Infektionszeitpunkte sind in Abb. 4 bzw. im Anhang 6 und Anhang 7 dargestellt. Es wurde beobachtet, dass durch Infektion mit *Xcv* 85-10 (mutmaßlich T3SS-abhängig), die Transkriptmenge von 1.300 Genen verglichen zur Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* zunahm und von 735 Genen abnahm (Abb. 4A). Außerdem waren besonders zu frühen Infektionszeitpunkten Transkriptmengen pflanzlicher Gene mehrheitlich vermindert. So nahmen 6 *hpi* die Transkriptmengen von 195 Genen ab, aber lediglich von 29 Genen zu (Abb. 4A). Durch die Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* nahm im Vergleich zur Infiltration mit MgCl₂-Lösung (mutmaßlich während der Basalabwehr) die Transkriptmenge von 1.740 Genen zu und von 1.116 Genen ab (Abb. 4B). Zu frühen Infektionszeitpunkten nahmen die Transkriptmengen pflanzlicher Gene mehrheitlich zu. So nahmen 4 *hpi* die Transkriptmengen von 954 Genen zu, wohingegen 359 Gene in ihrer Transkriptabundanz vermindert wurden (Abb. 4B). Zu späteren Zeitpunkten erhöhte sich die Zahl differentiell

exprimierter Gene in beiden Datensätzen. Darüber hinaus wurden in beiden Datensätzen Gene identifiziert, welche zu allen getesteten Zeitpunkten differentiell exprimiert waren (persistent regulierte Gene).

A Experiment 1: mutmaßlich T3SS-abh. in ihrer Transkriptmenge veränderte Gene (85-10 vs. 85-10 Δ *hrcN*)



B Datensatz 2: mutmaßlich Gene der Basalabwehr (85-10 Δ *hrcN* vs. *MgCl*₂)

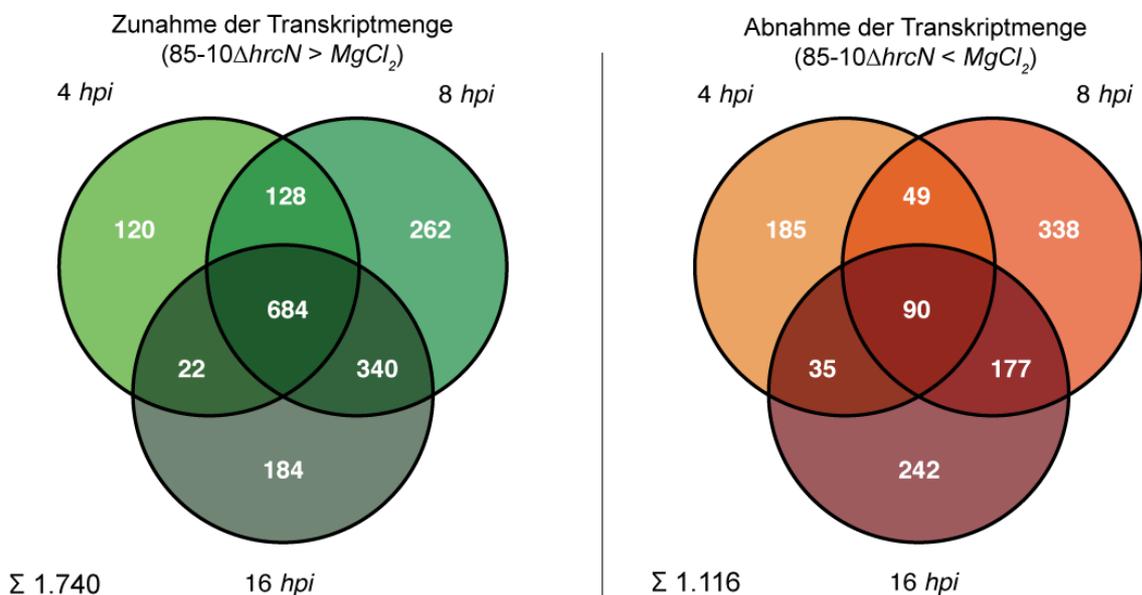


Abb. 4: Einfluss von *Xcv* auf das Transkriptom von *S. lycopersicum*

Venn-Diagramme der zu verschiedenen Zeitpunkten der *Xcv*-Infektion regulierten *S. lycopersicum*-Gene, basierend auf den normalisierten *Microarray*-Daten. Unterschieden werden Gene, die **(A)** mutmaßlich durch translozierte *Xcv*-T3Es reguliert werden (Experiment 1; veränderte Transkriptmenge nach Infektion mit *Xcv* 85-10 im Vergleich zu 85-10 Δ *hrcN*) und **(B)**, Gene, deren Expression nach Infektion mit dem T3S-defizienten *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* im Vergleich zu *MgCl*₂-infiltrierten Pflanzen verändert war und so möglicherweise an der Basalabwehr beteiligt sind (Experiment 2). Gezählt wurden nur Gene, die unterschiedliche Expressionsmuster verglichen zur Kontrolle (45 *mpi* bzw. 0 *hpi*) zeigten. Zusätzlich ist die Summe (Σ) der jeweils regulierten Gene angegeben.

3.1.2 Validierung ausgewählter Gene mittels quantitativer RT-PCR

Zur Validierung der *Microarray*-Daten wurden Transkriptmengen regulierter *S. lycopersicum*-Gene in unabhängigen RNA-Proben aus je drei biologischen Replikaten mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Um beide Datensätze gleichzeitig validieren zu können, wurden 13 *S. lycopersicum*-Gene ausgewählt, welche in beiden Experimenten differentiell exprimiert waren. Es wurden sowohl Gene mit hohen *lfc* berücksichtigt, als auch Gene, deren differentielle Expression nahe dem Signifikanzniveau ($lfc \pm 1$) lag. Liegt das Expressionsniveau von Genen in zu vergleichenden RNA-Proben unterhalb der Detektionsgrenze der *Microarrays*, können fälschlicherweise signifikante *lfc* entstehen. Um zu analysieren, ab welcher durchschnittlicher *Microarray*-basierter Signalintensität berechnete *lfc* unabhängig mittels qRT-PCR reproduzierbar sind, wurden auch Gene mit niedriger Signalintensität analysiert. Für diese Auswahl wurden anhand der *Microarray*-Daten die mittleren Signalintensitäten aller betrachteten Gene nach Infektion mit *Xcv* 85-10 (für Experiment 1) bzw. Infiltration der $MgCl_2$ -Lösung (für Experiment 2) berechnet (\emptyset A). Zur Erstellung unabhängiger Proben wurden *S. lycopersicum*-Blätter mit *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 $\Delta hrcN$ infiziert, bzw. mit einer $MgCl_2$ -Lösung infiltriert und Proben direkt nach der Inokulation oder Infiltration (0 *hpi*), sowie 6, 10 und 24 *hpi* entnommen.

Die qRT-PCR-basierten Daten sind in Tabelle 9 dargestellt und bestätigen die *Microarray*-Daten. Verglichen mit den Daten aus Experiment 1, zeigten die analysierten *S. lycopersicum*-Gene, mittels qRT-PCR, vergleichbare Änderungen der Transkriptmenge, wenngleich qRT-PCR-basiert eine eher schwächere T3SS-abhängige Regulation zu beobachten war. Im Zuge der Basalabwehr (Experiment 2) zeigten dieselben Gene, qRT-PCR-basiert, hingegen eine eher stärkere Änderung der Transkriptmenge. Die *Microarray*-basierte Signalstärke der untersuchten Gene schien keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu haben.

Gezeigte *lfc* ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Normalisierung der qRT-PCR-basierten Daten wurden die beiden Referenzgene *S/PHD* (Solyc06g051420) und *S/CLP1* (Solyc01g009290) mitgeführt, welche in Kapitel 3.2 beschrieben werden.

Tabelle 9: qRT-PCR-basierte Validierung der *Microarray*-Daten für ausgewählte *S. lycopersicum*-Gene

#	Gennummer	Annotation	Ø A (Xcv 85-10)	Ifc T3SS-abh. reg. Gene (WT vs. Δ hrcN)					
				Microarray			qRT-PCR		
				6 hpi	10 hpi	24 hpi	6 hpi	10 hpi	24 hpi
1	Solyc06g074620	<i>Os02g0448600 protein</i>	629	-1,64	-2,40	-1,72	-0,62	-0,59	-1,50
2	Solyc03g083470	<i>Receptor like kinase</i>	575	-1,15	-1,64	-1,51	-0,96	-0,77	-1,19
3	Solyc01g009320	<i>PUB24</i>	4	-1,01	-2,36	-2,68	-1,03	-0,78	-1,47
4	Solyc12g005640	<i>Myb-related TF</i>	118	0,31	-1,69	-3,59	-0,85	-0,82	-1,90
5	Solyc08g008280	<i>WRKY53</i>	2198	-1,30	-2,05	-2,08	-0,66	-1,05	-1,33
6	Solyc08g014570	<i>Ankyrin repeat family protein</i>	385	-1,19	-1,69	-0,19	-0,97	-0,82	-0,14
7	Solyc12g009220	<i>Jasmonate ZIM-dom. protein 1</i>	764	-0,40	-1,81	-2,70	-1,05	-1,55	-1,85
8	Solyc07g048060	<i>Auxin-induced protein</i>	599	-0,24	-1,46	-2,54	-0,65	-1,16	-1,54
9	Solyc03g082370	<i>ACRE 65</i>	5231	-1,39	-2,01	-1,91	-0,88	-1,02	-1,20
10	Solyc05g009120	<i>Os03g0731050 protein</i>	291	-1,15	-1,96	-1,48	-0,77	-0,75	-0,83
11	Solyc06g060690	<i>Receptor-like kinase</i>	2330	-1,13	-1,41	-1,67	-0,69	-0,63	-1,38
12	Solyc04g054690	<i>Laccase 1a</i>	368	-1,47	-1,92	-1,89	-1,00	-0,68	-1,14
13	Solyc03g112030	<i>Cytochrome P450 (CYTP450)</i>	9	-0,22	-1,93	-2,27	-1,09	-0,33	-0,91

#	Gennummer	Annotation	Ø A (MgCl ₂)	Ifc Gene der Basalabwehr (Δ hrcN vs. MgCl ₂)					
				Microarray			qRT-PCR		
				4 hpi	8 hpi	16 hpi	6 hpi	10 hpi	24 hpi
1	Solyc06g074620	<i>Os02g0448600 protein</i>	442	-0,11	1,29	0,69	0,82	0,95	1,90
2	Solyc03g083470	<i>Receptor like kinase</i>	2707	1,18	1,25	1,30	1,78	1,42	4,02
3	Solyc01g009320	<i>PUB24</i>	16	3,32	2,52	2,31	4,02	3,71	5,70
4	Solyc12g005640	<i>Myb-related TF</i>	517	1,53	2,55	1,66	2,60	1,81	3,85
5	Solyc08g008280	<i>WRKY53</i>	11578	3,42	3,06	2,44	3,31	2,13	3,90
6	Solyc08g014570	<i>Ankyrin repeat family protein</i>	1958	2,10	2,10	1,63	0,99	0,88	1,27
7	Solyc12g009220	<i>Jasmonate ZIM-dom. protein 1</i>	3579	0,50	1,59	1,45	1,37	1,50	3,46
8	Solyc07g048060	<i>Auxin-induced protein</i>	4405	1,48	3,90	4,69	3,56	5,32	5,71
9	Solyc03g082370	<i>ACRE 65</i>	16990	1,21	2,25	2,29	2,16	2,82	3,96
10	Solyc05g009120	<i>Os03g0731050 protein</i>	2849	1,58	1,72	1,90	2,24	1,67	3,08
11	Solyc06g060690	<i>Receptor-like kinase</i>	3737	0,52	1,00	0,63	2,78	1,43	3,09
12	Solyc04g054690	<i>Laccase 1a</i>	2284	2,46	3,42	3,51	3,79	2,67	3,99
13	Solyc03g112030	<i>Cytochrome P450 (CYTP450)</i>	141	4,03	4,18	3,86	6,25	3,92	5,79

Ø A – durchschnittliche Signalintensität in *Microarray*-Analysen

Ifc – mittlerer logarithmierter *fold change* zur Basis 2 (aus drei unabhängigen Experimenten)

3.1.3 Vergleich T3SS-abhängig regulierter Gene mit Genen der Basalabwehr von *S. lycopersicum*

Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf der funktionellen Kategorisierung T3SS-abhängig differentiell exprimierter *S. lycopersicum*-Gene lag, wurde das Expressionsverhalten dieser Gene (Experiment 1) genauer betrachtet und mit mutmaßlichen Abwehrgenen (Experiment 2) verglichen. Eine Kategorisierung aller potentiellen Abwehrgene wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Der Vergleich der *Microarray*-Datensätze zeigt, dass 802 (46%) der 1.740 während der Basalabwehr induzierten *S. lycopersicum*-Gene *Xcv*-T3SS-abhängig negativ reguliert wurden (Abb. 5A), wohingegen 166 (15%) der 1.116 während der Basalabwehr in ihrer Transkriptmenge verminderten Gene, *Xcv*-T3SS induziert wurden (Abb. 5B).

Da sich die untersuchten Infektionszeitpunkte in den beiden Experimenten unterschieden (Abb. 3), wurden logarithmierte *fold changes* desselben Gens in den unterschiedlichen Experimenten nicht direkt verglichen. Verglichen wurden Tendenzen der Transkriptmengenänderungen eines Gens, d.h. erhöhte bzw. verminderte Transkriptmengen; Absolutwerte wurden vernachlässigt. Listen aller regulierten Gene befinden sich in Anhang 6 und Anhang 7. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden Auszüge dieser Listen an entsprechender Stelle gezeigt.

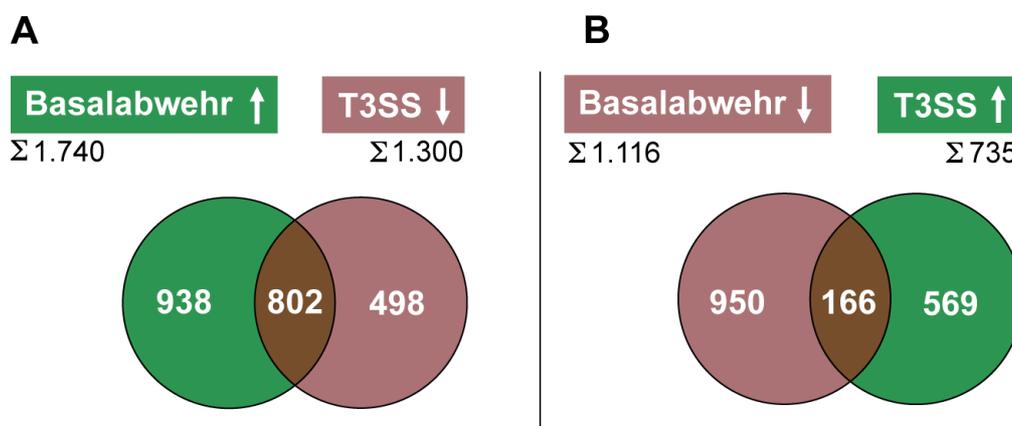


Abb. 5: Vergleich *Xcv*-T3SS-abhängig regulierter Gene mit Gene der Basalabwehr von *S. lycopersicum*

Die anhand der Transkriptomdaten identifizierten T3SS-abhängig in ihrer Transkriptmenge veränderten *S. lycopersicum*-Gene (Experiment 1) wurden den identifizierten potentiellen Genen der Basalabwehr (Experiment 2) als Venn-Diagramme gegenübergestellt. Dabei wurde beobachtet, dass 802 (46%) der 1.740 induzierten potentiellen Abwehrgene T3SS-abhängig negativ reguliert waren. 166 (15%) der 1.116 in ihrer Transkriptmenge verminderten potentiellen Abwehrgene waren T3SS-abhängig induziert

3.1.4 Funktionelle Kategorisierung T3SS-abhängig differentiell exprimierter Gene

Um festzustellen, welche Wirtszellprozesse möglicherweise T3E-abhängig moduliert werden, wurden die regulierten Gene aus Experiment 1 (siehe 3.1.1) funktionell kategorisiert. Dafür wurden, in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Grau (Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg), die durch alle 2.035 *S. lycopersicum*-Gene kodierten Proteine, welche T3SS-abhängig reguliert waren, mittels BLASTp mit *A. thaliana*-Proteinen (www.arabidopsis.org; Stand Juni 2014) verglichen, da zelluläre Funktionen von Genen für *A. thaliana* umfassender beschrieben wurden. Dabei wurden nur *A. thaliana*-Proteine weiter betrachtet, deren Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 40% über mindestens 70% der entsprechenden Proteinsequenz aus *S. lycopersicum* aufwies. Anhand dieser BLAST-Analysen wurden für 1.119 (55%) der 2.035 Xcv-T3SS-abhängig regulierten *S. lycopersicum*-Gene Orthologe in *A. thaliana* identifiziert. Anschließend wurde eine mögliche zelluläre Funktion dieser Gene anhand aktueller Literatur vorhergesagt. Da ein umfassender Überblick über alle Xcv-T3SS-abhängig regulierten *S. lycopersicum*-Gene an dieser Stelle unmöglich ist, wird im Folgenden das Expressionsverhalten einiger Gene, welche charakteristisch für Prozesse des Hormonhaushaltes, der Signalperzeption bzw. -transduktion, Abwehrprozesse sowie des Metabolismus von *S. lycopersicum* sind, tabellarisch dargestellt (Tabelle 10, Tabelle 11, Tabelle 12). Eine mögliche Bedeutung dieser Marker-Gene während der Interaktion von Xcv und *S. lycopersicum*, wird in Kapitel 4.1 diskutiert.

Die funktionelle Kategorisierung regulierter *S. lycopersicum*-Gene ergab, dass Transkriptmengen von Genen, welche in Signalwege bzw. die Synthese von SA und Eth involviert sind, mehrheitlich Xcv-T3SS-abhängig vermindert waren, von Genen der Regulation der ABA- und JA-Antwort aber erhöht (Tabelle 10). Transkriptmengen von Genen der Signalperzeption bzw. -transduktion (bspw. durch Rezeptoren, MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren) sowie Abwehrprozessen (bspw. ROS-Bildung oder Zellwandablagerungen) waren T3SS-abhängig vermindert (Tabelle 11). Gene, welche in Prozesse des Metabolismus (bspw. Photosynthese, Glykolyse oder die Synthese von Sekundärmetaboliten) involviert sind, zeigten eine unterschiedliche T3SS-abhängige Regulation. Dabei waren Photosynthese-Gene mehrheitlich in ihrer Transkriptmenge erhöht, Transkriptmengen von Genen zur Synthese von Sekundärmetaboliten hingegen vermindert (Tabelle 12). Bei der Betrachtung der Expressionsmuster Xcv-T3SS-abhängig regulierter *S. lycopersicum*-Gene wurde zudem beobachtet, dass deren Transkriptmenge während der Basalabwehr gegen den T3SS-defizienten Xcv-Stamm 85-10 Δ *hrcN* häufig invers reguliert war.

Tabelle 10: Expressionsmuster Xcv-T3SS-abh. regulierter Markergene des Hormonhaushaltes von *S. lycopersicum*

	Gennummer ^a	Homologie ^b	T3SS-abh. regulierte Gene (Experiment 1) [lfc] ^c			potentielle Abwehrgene (Experiment 2) [lfc]		
			6 hpi	10 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	16 hpi
SA	Solyc09g015770	WRKY70	-0,58	-1,20	0,03	-0,57	2,50	1,07
	Solyc08g062490	WRKY50	-0,35	-0,72	1,77	2,59	3,33	1,31
	Solyc01g095630	WRKY41	-0,93	-1,64	0,14	0,94	1,01	0,16
	Solyc08g008280	WRKY53	-1,30	-2,05	-2,08	3,42	3,06	2,44
	Solyc06g074030	AtCAF1	-2,17	-2,20	-2,28	0,45	0,55	0,86
	Solyc09g007920	PAL1	-0,62	-1,16	-0,29	0,91	1,08	0,53
	Solyc05g056170	PAL2	-0,48	-1,07	-1,24	1,08	1,34	1,13
	Solyc03g042560	PAL3	-0,67	-1,36	-0,32	1,53	1,52	0,55
Solyc03g071860	PAL4	-0,64	-1,22	-0,18	1,41	1,44	0,43	
JA	Solyc03g116890	WRKY40	-0,26	-1,47	-0,98	-1,04	0,73	0,95
	Solyc12g009220	JAZ	-0,40	-1,81	-2,70	0,50	1,59	1,45
	Solyc09g014990	WRKY33	-1,52	-2,07	-1,19	1,35	1,96	2,11
	Solyc07g042230	ORA47	-0,94	-1,97	-2,83	-0,90	-0,73	-1,93
	Solyc08g078190	ERF5	-1,76	-2,19	-1,08	0,87	0,79	1,33
	Solyc05g052040	ERF5	-1,38	-1,32	-0,15	1,07	0,78	0,68
Eth	Solyc05g051310	ERF104	-1,22	-1,19	-0,99	0,60	0,55	0,73
	Solyc03g093540	ERF105	-1,77	-1,32	-0,52	1,23	0,04	0,26
	Solyc09g089910	ERF14	-0,58	-1,79	-0,45	2,04	2,09	2,77
	Solyc08g078170	ERF1A	-1,68	-2,16	-0,62	1,86	1,11	0,2
	Solyc02g077370	ERF1B	-0,58	-1,95	-1,36	1,97	3,18	2,65
	Solyc08g078180	ERF2	-1,07	-1,10	2,33	1,85	2,33	0,08
	Solyc07g053740	ERF4	-0,85	-1,14	-1,17	-0,64	0,18	-0,08
	Solyc12g005940	ACO1	-0,26	-1,30	-0,98	1,08	1,77	1,44
	Solyc07g049530	ACO2	-0,11	-1,57	-0,82	1,42	2,74	1,58
	Solyc08g081540	ACS2	-0,55	-1,06	-1,54	1,92	2,63	1,46
ABA	Solyc03g095780	PYL4	-0,26	-1,07	-1,17	3,39	4,69	3,45
	Solyc12g098210	ABCG40	-0,40	-1,25	-0,96	1,13	1,95	1,48
	Solyc11g051050	ABAR	0,38	0,73	1,24	0,07	-1,49	-0,70
	Solyc02g090890	ABA1	0,20	0,63	1,51	0,10	-1,39	-0,70
	Solyc04g071960	ABA2	0,04	0,63	1,09	-0,21	-0,85	-0,54
	Solyc01g109140	CYP74A	0,12	0,62	1,11	-0,38	-0,92	0,06

^a nach ITAG2.4 (Stand August 2015) ^b Ortholog aus *A. thaliana* (AS-Identität min. 40% über min. 70% der AS-Sequenz) ^c *lfc* - logarithmischer *fold change* zur Basis 2

orange – signifikant verminderte Transkriptmenge ($lfc \leq -1$) grün – signifikant erhöhte Transkriptmenge ($lfc \geq 1$)

Tabelle 11: Expressionsmuster T3SS-abh. regulierter Markergene der Signaltransduktion und Abwehr von *S. lycopersicum*

	Gennummer ^a	Homologie ^b	T3SS-abh. regulierte Gene (Experiment 1) [lfc] ^c			potentielle Abwehrgene (Experiment 2) [lfc]		
			6 hpi	10 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	16 hpi
Rezeptoren	Solyc02g068820	FLS2	-0,03	-0,92	-1,26	1,59	2,11	1,37
	Solyc06g076910	EFR	-0,18	-1,43	-2,86	4,83	4,71	3,39
	Solyc03g019980	EFR	-0,14	-0,82	-1,50	1,32	2,12	1,63
	Solyc07g049190	CERK1	-0,13	-0,80	-1,29	0,30	0,76	1,02
	Solyc11g072140	WAK1	-1,10	-2,55	-2,32	2,84	3,01	3,47
	Solyc10g076540	WAK2	-1,10	-2,55	-2,32	2,84	3,01	3,47
	Solyc02g089900	LYK4	-0,88	-1,42	-1,75	1,02	1,86	1,47
	Solyc04g014400	RLK1	-0,40	-0,94	-1,81	2,47	2,88	1,95
	Solyc07g008630	EIX2	-0,35	-1,07	-0,87	0,77	1,32	0,96
Solyc03g082450	PEPR1	-0,23	-0,79	-1,20	2,01	1,51	1,06	
Kinasen	Solyc12g096710	BIR1	-1,08	-1,91	-1,03	1,40	1,89	-0,13
	Solyc07g006480	BIR1	-0,66	-1,72	-1,19	1,87	2,56	1,71
	Solyc12g088940	MPKKK5	-0,22	-1,15	-1,59	1,21	1,90	1,20
	Solyc07g064820	MPKKK15	-0,53	-1,43	-2,02	-0,34	1,73	1,49
	Solyc07g051880	MPKKK18	0,28	0,63	1,12	0,79	-0,55	-1,00
	Solyc02g064980	MPKKK19	-0,77	-2,40	-1,98	-1,42	-0,34	-0,31
	Solyc02g090970	MPKKK21	-1,47	-1,71	-1,24	-1,24	-0,83	-1,15
	Solyc06g005170	MPK3	-1,01	-1,35	-0,21	1,65	1,66	1,05
	Solyc08g081490	MPK6	-0,04	-1,02	-1,31	1,02	2,36	1,79
	Solyc12g049360	RIPK	-0,41	-1,03	-0,60	2,12	1,75	2,28
	Solyc09g059430	RIN4	-0,73	-1,58	-0,58	1,15	2,00	1,05
	Solyc02g080040	CRK10	-0,35	-1,20	-1,16	1,54	1,80	1,72
	Solyc02g080020	CRK19	-0,35	-1,20	-1,16	1,54	1,80	1,72
	Solyc03g082470	CRK25	-0,31	-1,04	-1,12	2,14	2,48	2,01
	Solyc02g081470	PRK5	-0,29	-1,14	-1,19	1,56	1,83	1,43
Solyc01g091590	BAP2	-2,53	-2,44	-1,93	1,10	1,56	1,59	
Ca2+-	Solyc08g074980	CDPK1	-0,07	-0,46	-1,61	-0,33	1,00	1,05
	Solyc02g083850	CDPK16	-0,04	-1,32	-2,00	0,40	2,75	1,91
	Solyc04g081910	CDPK29	-0,22	-1,12	-1,55	1,01	2,15	1,25
	Solyc10g079130	CDPK32	-0,29	-1,09	-0,73	0,52	0,86	0,74
ACRE	Solyc03g082350	ACRE-65	-1,00	-1,05	-1,16	-0,08	0,44	0,04
	Solyc08g016150	ACRE-180	-1,30	-2,05	-2,08	3,42	3,06	2,44
Abwehrgene	Solyc09g056430	OXI1	-0,24	-1,14	-1,03	0,62	0,47	1,10
	Solyc03g117980	RBOHD	-0,36	-1,28	-1,41	1,06	1,59	1,91
	Solyc06g068680	RBOHB	-0,14	-1,14	-0,95	0,80	1,19	1,22
	Solyc02g067660	PAD4	-0,46	-1,36	-0,48	2,68	3,27	1,86
	Solyc04g071030	CMPG1	-0,90	-1,98	-1,69	2,21	2,78	2,84
	Solyc11g065600	XTR6	0,41	0,74	1,30	-0,39	-1,02	0,56

^a nach ITAG2.4 (Stand August 2015) ^b Ortholog aus *A. thaliana* (AS-Identität min. 40% über min. 70% der AS-Sequenz) ^c *lfc* - logarithmischer *fold change* zur Basis 2
orange – signifikant verminderte Transkriptmenge (*lfc* ≤ -1) grün – signifikant erhöhte Transkriptmenge (*lfc* ≥ 1)

Tabelle 12: Expressionsmuster T3SS-abh. regulierter Markergene des Metabolismus von *S. lycopersicum*

	Gennummer ^a	Homologie ^b	T3SS-abh. regulierte Gene (Experiment 1) [lfc] ^c			potentielle Abwehrgene (Experiment 2) [lfc]		
			6 hpi	10 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	16 hpi
Photosynthese	Solyc06g069730	LHCA4	0,38	0,92	1,73	-0,23	-1,45	-0,64
	Solyc07g022900	LHC5	-0,03	0,54	1,77	-0,25	-1,08	-0,80
	Solyc07g063600	LHCB3	0,36	0,78	1,18	-0,31	-1,25	-0,78
	Solyc04g050930	NPQ1	0,23	0,45	1,12	-0,33	-0,83	-0,05
	Solyc06g060340	PsbS	-0,09	0,43	1,38	0,41	-1,30	-0,71
	Solyc01g106090	PsbP	-0,11	0,48	1,00	0,09	-0,84	-0,48
	Solyc05g007780	PsbQ	0,08	0,58	1,59	-0,42	-0,99	-0,31
	Solyc04g049450	PDI1	0,26	-0,34	-1,15	0,53	1,07	1,36
	Solyc06g005940	PDI6	0,22	-0,16	-1,33	0,27	0,74	1,30
KH	Solyc10g083290	CWINV	0,12	-1,08	-2,3	1,25	2,87	3,19
	Solyc03g121070	H XK1	0,10	-0,02	-1,29	1,24	0,11	0,49
	Solyc10g079860	PR-Q	-0,09	-0,59	-1,97	4,25	5,12	4,92
ZT	Solyc03g097570	SWEET10	-0,12	-0,09	1,69	-0,57	-0,43	-0,89
	Solyc02g005180	ERD6	0,23	0,50	1,18	-0,09	-0,83	-0,51
SM	Solyc02g093270	CCoAM	-0,41	-1,03	-1,75	0,88	0,95	1,02
	Solyc03g036470	PAL	-1,07	-1,24	-0,21	1,25	1,35	0,70
	Solyc12g100270	CER1	-0,13	-1,39	-3,03	4,53	4,66	4,48

^a nach ITAG2.4 (Stand August 2015) ^b Ortholog aus *A. thaliana* (AS-Identität min. 40% über min. 70% der AS-Sequenz) ^c lfc - logarithmischer *fold change* zur Basis 2

orange – signifikant verminderte Transkriptmenge (lfc ≤ -1) grün – signifikant erhöhte Transkriptmenge (lfc ≥ 1)
KH – Kohlenhydrat-Stoffwechsel ZT – Zuckertransport SM - Sekundärmetabolismus

Um einen Eindruck zu gewinnen, ob verschiedene zelluläre Prozesse abhängig vom Infektionszeitpunkt reguliert wurden, wurde die Anreicherung von GO-Annotationen in allen Schnittmengen regulierter Gene zu den unterschiedlichen Infektionszeitpunkten berechnet (siehe 2.2.3.4). Die Ergebnisse zeigen, dass zu früheren Infektionszeitpunkten (6 und 10 hpi) die Unterdrückung der Basalabwehr im Vordergrund steht. Von 366 zu diesen Infektionszeitpunkten T3SS-regulierten Genen wurden 49 Gene Stressreaktionen, 52 Gene Signalkaskaden, 13 Gene Hormonsignalwegen, drei Gene Zelltodreaktionen sowie vier Gene der Zellwandintegrität zugeordnet (Anhang 8).

Zu späteren Infektionszeitpunkten waren neben Abwehrgenen auch Gene des Primär- und Sekundärmetabolismus T3SS-abhängig reguliert. GO-Term-Analysen ergaben, dass 10 und 24 hpi sowie 24 hpi 141 T3SS-abhängig negativ regulierte Gene Stressreaktionen (davon 108 Gene biotischem Stress), 190 Gene Signalkaskaden (davon 136 Gene Proteinkinasen), 45 Gene sekundärem Metabolismus (23 davon der Lignin-Biosynthese) zuzuordnen sind (Anhang 8). Von 680 T3SS-abhängig 24 hpi induzierten Genen waren 81 Gene der Photosynthese, 33 Gene dem Aminosäuremetabolismus, 14 Gene der Synthese von Tetrapyrolen, 71 Gene der transkriptionellen Genregulation, 51 Gene der Proteinbiosynthese und 5 Gene der Glykolyse zuzuordnen (Anhang 8).

3.1.5 Identifizierung differentiell exprimierter *S. lycopersicum*-Gene nach Expression einzelner Xcv-T3E

Um den Einfluss ausgewählter Xcv-T3E auf das pflanzliche Transkriptom zu untersuchen, wurden XopB, XopG, XopI, XopL, XopQ und XopS in *S. lycopersicum* exprimiert (Experiment 3). Dazu wurden die T3E N-terminal mit GFP fusioniert, *Agrobacterium*-vermittelt in Blättern von *S. lycopersicum* synthetisiert, RNA 48 hpi isoliert und *Microarray*-Analysen durchgeführt (Abb. 7). Als Referenztranskriptom dienten RNA-Proben aus Blattmaterial, in welchem GFP *Agrobacterium*-vermittelt synthetisiert wurde. Da AvrBs3 als Transkriptionsaktivator sogenannter UPA-Gene (*upregulated by AvrBs3*) wirkt (85), diente die Synthese von GFP-AvrBs3-Fusionsproteinen hier als weitere Kontrolle sowie zur Identifizierung bisher unbekannter UPA-Gene. Für alle Proben wurden drei biologische Replikate erstellt. Für jedes Replikat wurden je vier Blattscheiben von vier Pflanzen geerntet und vereinigt. Die Synthese von GFP und der GFP-Fusionsproteine wurde mittels *Immunoblot* verifiziert, wobei GFP-XopG und -XopI immer eine schwache Synthese zeigten (Abb. 6).

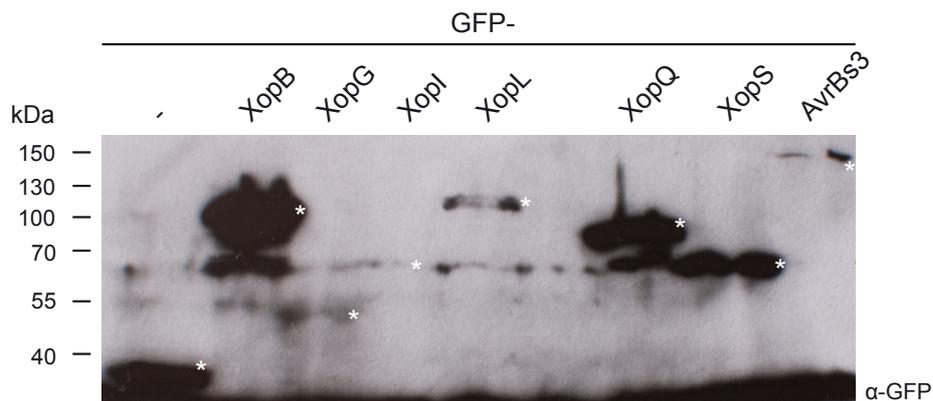


Abb. 6: Immunoblot zur Synthese der GFP-Effektorfusionen in *S. lycopersicum*-Blättern

GFP bzw. die Fusionsproteine GFP-XopB, -XopG, -XopI, -XopL, -XopQ, -XopS oder -AvrBs3 wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *S. lycopersicum*-Blättern synthetisiert. 48 hpi wurden vier Blattscheiben aufgeschlossen und mittels Immunoblot mit Hilfe eines gegen GFP gerichteten Antikörpers analysiert. Die erwarteten Größen der Fusionsproteine sind mit einem Stern (*) markiert. Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Synthese der Fusionsproteine wurde für jedes Infektionsexperiment vor Verwendung der Proben für *Microarray*-Experimente mit ähnlichen Ergebnissen nachgewiesen.

Die Hybridisierung der *Microarray-Chips* wurde analog zu den ersten beiden Experimenten (3.1.1) von der Firma Source BioScience (Berlin) durchgeführt, und in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Grau (Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg) ausgewertet (2.2.3.3). Zunächst wurden die Expressionsmuster aller 34.383 annotierten *S. lycopersicum*-Gene aller Replikate des Datensatzes miteinander verglichen. Dabei zeigten, wie erwartet, die meisten Replikate von Proben nach transienter Expression jedes Effektor-Konstrukts vergleichbare Expressionsmuster (Abb. 7B). Da Replikat 1 nach transienter Synthese von GFP-XopS ein

von den anderen Replikaten stark abweichendes Expressionsverhalten zeigte, wurden Expressionswerte dieser Probe nicht betrachtet.

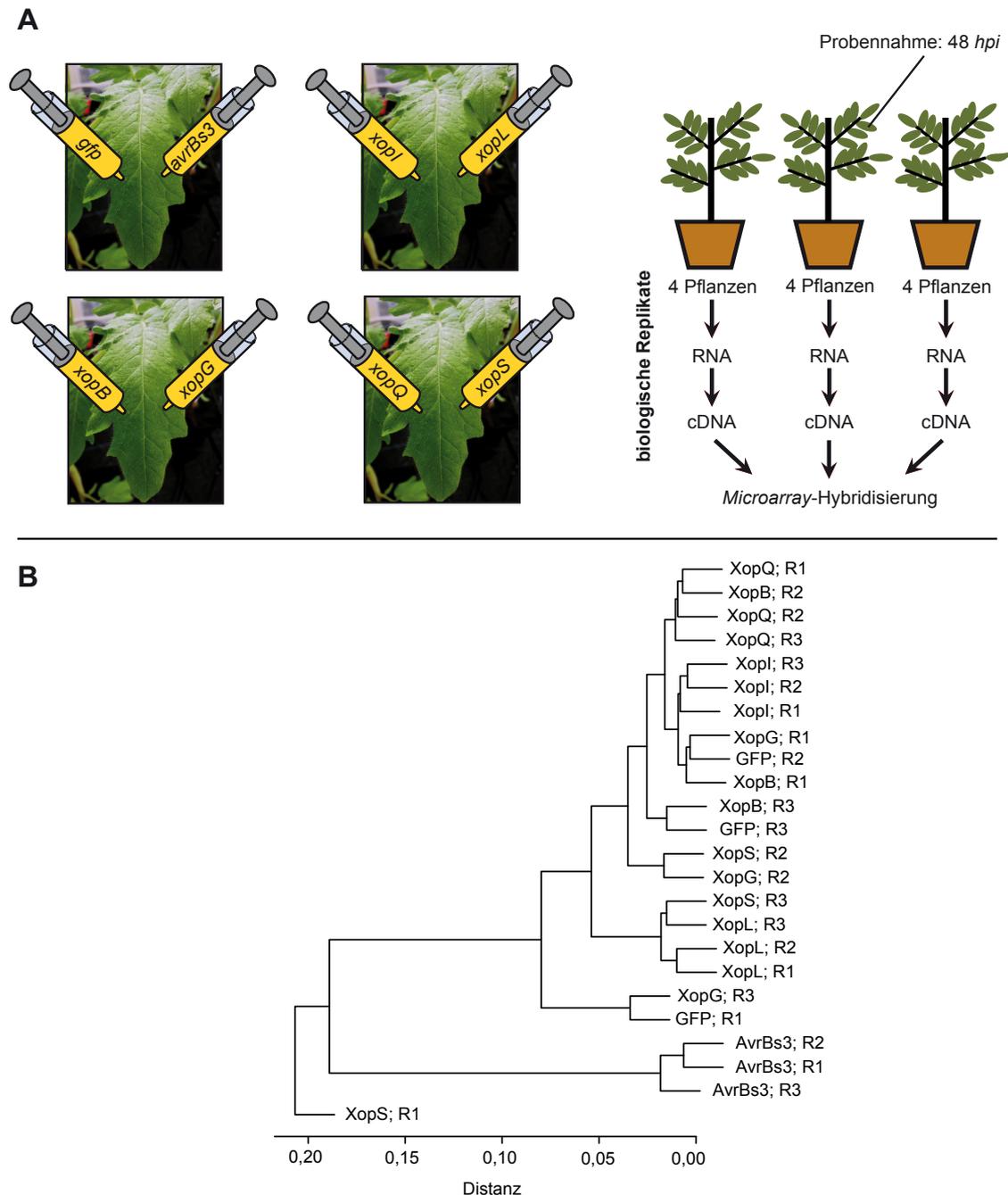


Abb. 7: Experimenteller Ansatz zur Analyse des *S. lycopersicum*-Transkriptoms nach transienter Synthese einzelner Xcv-T3E-Proteine

(A) Zur Identifizierung pflanzlicher Gene, deren Expression durch einzelne Xcv-Effektorproteine beeinflusst wird (Datensatz 3), wurden *S. lycopersicum*-Blätter mit *Agrobacterium*-Stämmen zur transienten Synthese von GFP bzw. GFP-AvrBs3, XopB, XopG, XopI, XopL, XopQ und XopS inokuliert. Nach 48 Stunden wurden je vier Blattscheiben von vier Pflanzen geerntet und zu einem von drei biologischen Replikaten vereinigt. Aus den einzelnen Proben wurde die Gesamt-RNA isoliert und zur cDNA-Synthese und Microarray-Hybridisierung weiterverwendet. (B) Mittels hierarchischen Clustering wurden die Expressionsmuster aller *S. lycopersicum*-Gene zwischen den Replikaten (R1-R3) nach transienter Synthese verschiedener GFP-Effektor-Fusionsproteine verglichen und als Dendrogramm dargestellt. Der Grad der Abweichung der Expressionsmuster wird durch die Distanz beschrieben.

Anschließend wurden, analog zu den vorangegangenen Experimenten, *S. lycopersicum*-Gene identifiziert, deren Transkriptmengen durch die transiente Synthese einzelner Effektor-Konstrukte im Vergleich zur GFP-Kontrolle verändert waren (siehe 3.1.1 und 2.2.3.3). Dabei wurde zwischen Genen unterschieden, deren Transkriptmenge abhängig von einer oder mehreren der getesteten GFP-Effektor-Fusionen erhöht ($lfc > 1$) oder vermindert ($lfc < -1$) war (T3E-abhängige Regulation). Unter der Annahme, dass T3E redundante Funktionen in Wirtszellen erfüllen können, waren diejenigen Gene von Interesse, deren veränderte Transkriptmenge ausschließlich auf eines der Effektor-GFP-Fusionskonstrukte zurückzuführen war (T3E-spezifische Regulation). Dafür wurden neben T3E-abhängig differentiell exprimierten Genen mit Hilfe von Post-Hoc-Tests (Signifikanzfilter 5; siehe 2.2.3.3) auch solche betrachtet, deren Transkriptmenge sich signifikant von denen nach transienter Synthese aller anderen GFP-Effektor-Fusionen unterschied ($\Delta lfc < \pm 1$, T3E-spezifisch differentiell exprimierte Gene) (Tabelle 13). Eine Zusammenfassung aller T3E-abhängig bzw. -spezifisch differentiell exprimierter Gene befindet sich in Anhang 9. Die Mehrzahl der T3E-abhängig bzw. -spezifisch regulierten Gene zeigte erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu Proben nach transienter Synthese von GFP. Die transiente Synthese von GFP-XopB, -XopG, -XopI, -XopL, -XopQ oder -XopS führte in unterschiedlichem Maße zu Änderungen des *S. lycopersicum*-Transkriptoms, wobei GFP-XopL und GFP-XopS die stärksten Effekte hatten, GFP-XopB, -XopG, -XopI sowie -XopQ weniger (Tabelle 13).

Tabelle 13: Differentiell exprimierte Gene von *S. lycopersicum* nach transienter Expression von GFP-XopB, -XopG, -XopI, -XopL, -XopQ oder -XopS

Transkriptmenge	T3E-abhängig		T3E-spezifisch	
	erhöht	vermindert	erhöht	vermindert
XopB	8	0	1	0
XopG	4	1	2	0
XopI	1	0	1	0
XopL	64	2	42	0
XopQ	3	1	0	0
XopS	98	31	55	21

Um die Signifikanz regulierter Gene nach transienter Expression einzelner GFP-Effektor-Fusionskonstrukte zu überprüfen, wurde die Induktion vorhergesagter AvrBs3-Zielgene nach transienter Synthese von GFP-AvrBs3 untersucht. Für die Genom-weite Vorhersage von AvrBs3-Bindestellen wurden mit Hilfe der Software *TAL-getter* (145) die Gensequenzen 2 Kbp vor dem Transkriptionsstart jedes annotierten *S. lycopersicum*-Gens (ITAG Version 2.3; Stand Oktober 2013) untersucht, wobei *mismatches* einbezogen wurden. Die derart erstellte Rangliste der 200 wahrscheinlichsten AvrBs3-Bindestellen (Anhang 10) wurde mit den zuvor unter Berücksichtigung der Signifikanzfilter 1-4 (2.2.3.3) identifizierten AvrBs3-abhängig induzierten *S. lycopersicum*-Genen verglichen. Dabei wurden 26 Gene identifiziert,

die sowohl in ihrer Promotorregion eine mögliche AvrBs3-Bindestelle aufweisen, als auch nach transients Synthese von AvrBs3-GFP in *S. lycopersicum* signifikant induziert wurden (Tabelle 14). So wurden zwei Gene identifiziert, die in BLAST-Analysen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Homologie *UPA20* (*upregulated by AvrBs3*) (85) aus Paprika zeigten. Dies bestätigt, dass anhand der Transkriptomdaten signifikant Effektor-abhängig regulierte Gene identifiziert wurden.

Tabelle 14: AvrBs3-abhängig regulierte *S. lycopersicum*-Gene

Gennummer	Annotation ¹	Homologie ²	Rang ³	<i>lfc</i> ⁴
Solyc02g087440.2	<i>Unknown protein</i>	-	4	10,09
Solyc06g072520.1	<i>Transcription factor</i>	<i>CaUPA20</i> (56%)	55	9,58
Solyc02g077790.1	<i>Unknown protein</i>	-	122	8,91
Solyc03g097820.1	<i>Transcription factor</i>	<i>CaUPA20</i> (83%)	6	8,02
Solyc01g057220.2	<i>Pectinesterase</i>	<i>AT2G26450</i> (45%)	16	6,90
Solyc02g036230.1	<i>Zinc ion binding protein</i>	-	147	4,10
Solyc05g015100.1	<i>Unknown protein</i>	-	92	3,99
Solyc08g005120.2	<i>Cinnamoyl-CoA reductase-like protein</i>	<i>AT2G23910</i> (50%)	64	3,44
Solyc05g016710.1	<i>Unknown protein</i>	-	152	3,15
Solyc08g062450.1	<i>class II heat shock protein</i>	<i>AT5G12020</i> (65%)	83	2,32
Solyc11g017440.1	<i>Snakin-2</i>	-	44	2,32
Solyc02g033110.1	<i>Zinc ion binding protein</i>	-	72	2,17
Solyc11g066750.1	<i>AP-2 complex subunit alpha-1</i>	-	183	2,08
Solyc10g011930.1	<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>	<i>AtPAL1</i> (63%)	109	1,78
Solyc08g078090.1	<i>Lipase</i>	<i>AT4G16820</i> (58%)	63	1,67
Solyc12g096030.1	<i>Mitochondrial carrier-like protein</i>	<i>AT1G72820</i> (68%)	67	1,58
Solyc12g088190.1	<i>Amino acid permease 6</i>	<i>AtAAP6</i> (73%)	195	1,53
Solyc08g016440.2	<i>Unknown protein</i>	-	98	1,45
Solyc00g131610.1	<i>Disease resistance response</i>	<i>AT1G65870</i> (51%)	132	1,42
Solyc03g005980.2	<i>Transmembrane water channel aquaporin Z</i>	<i>AtNLM2</i> (67%)	127	1,36
Solyc01g094640.2	<i>Unknown protein</i>	-	169	1,33
Solyc01g111380.2	<i>Actin depolymerizing factor 5</i>	<i>AT2G16700</i> (82%)	85	1,32
Solyc06g068960.1	<i>Calmodulin</i>	<i>AT1G18210</i> (57%)	17	1,15
Solyc02g089980.2	<i>Ternary complex factor MIP1</i>	<i>AT5G66600</i> (72%)	42	1,14
Solyc04g008530.1	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein expressed</i>	-	107	1,14
Solyc10g084670.1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>	<i>AT4G11420</i> (74%)	154	1,03

¹ ITAG 2.4 Stand August 2015 ² Mind. 40% AS-Identität über 70% der Aminosäuresequenz ³ Position auf Rangliste der 200 Gene aus *S. lycopersicum* mit vorhergesagter AvrBs3-Bindestelle 2 Kbp vor Transkriptionsstart
⁴ logarithmischer *fold change* zur Basis 2 (nach transients Synthese von GFP-AvrBs3 vs. GFP-Kontrolle)

3.1.6 Verifizierung differentiell exprimierter Gene nach Expression von XopL

Um die in 3.1.5 identifizierten T3E-abhängig regulierten Gene zu verifizieren, wurden exemplarisch XopL-spezifisch regulierte Gene mittels qRT-PCR analysiert. Dafür wurden drei unabhängige Infektionsexperimente durchgeführt und die Expressionslevel der Gene 48 *hpi* analysiert. Neun Gene wurden untersucht, deren Transkriptmengen XopL-spezifisch erhöht (sieben Gene) oder vermindert (zwei Gene) waren. Hierbei wurden, analog zu 3.1.2, Gene mit stärkeren und schwächeren *lfc* im Vergleich zur GFP-Kontrolle bzw. möglichst

unterschiedlichen mittleren Expressionsniveaus nach GFP-XopL-Synthese ausgewählt. Dabei zeigten die Transkriptmengen von fünf der neun Gene qRT-PCR-basiert gleiche Tendenzen wie im *Microarray*-Experiment (Abb. 8, Gen 1, 4-7). Für die übrigen vier Gene (Abb. 8, Gen 2, 3, 8, 9) wurde aufgrund hoher Abweichungen zwischen den drei Experimenten, mittels qRT-PCR, kein signifikanter Einfluss von XopL beobachtet. Dabei war kein Einfluss des Expressionsniveaus oder des *lfc* erkennbar. Die Daten lassen vermuten, dass die *Agrobacterium*-basierten Infektionsexperimente biologischen Schwankungen unterliegen, was detailliert in Kapitel 4.1.1 diskutiert wird. Die *Agrobacterium*-basierten Transkriptomdaten geben daher nur Hinweise auf durch einzelne T3E regulierte *S. lycopersicum*-Gene, welche durch qRT-PCR-Analysen weiter untersucht werden sollten.

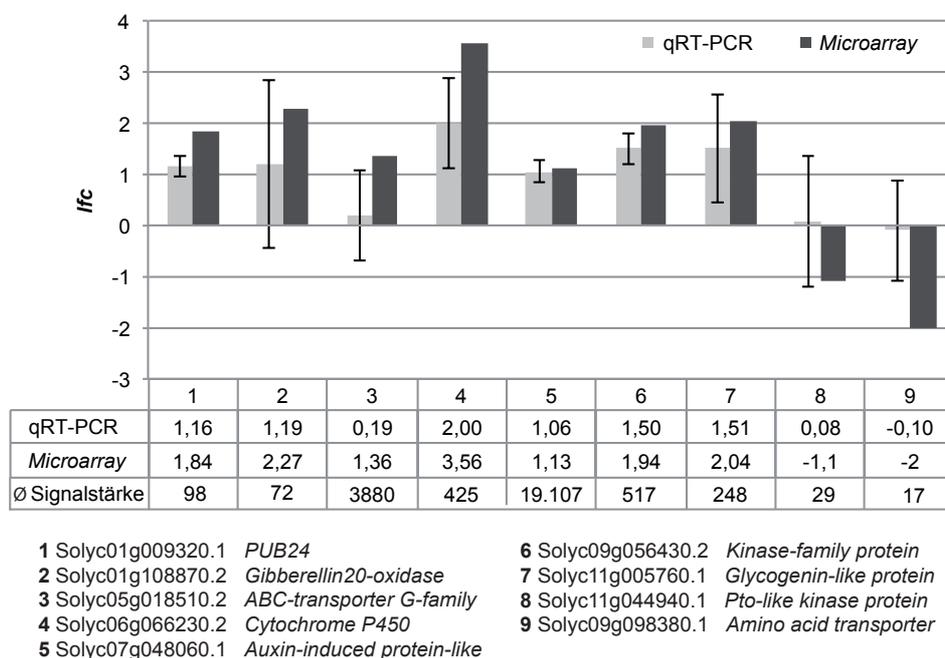


Abb. 8: Verifizierung XopL-spezifisch regulierter Gene von *S. lycopersicum* mittels qRT-PCR

Änderungen der Transkriptmenge neun XopL-spezifisch regulierter Gene (Experiment 3) wurden mittels qRT-PCR analysiert. Dafür wurden in drei unabhängigen Experimenten GFP bzw. das Fusionsprotein GFP-XopL *Agrobacterium*-vermittelt in *S. lycopersicum* synthetisiert und Gesamt-RNA nach 48 Stunden isoliert. Differentielle Expressionslevel sind als Mittelwerte und Standardabweichung logarithmierter *fold changes* zur Basis 2 (*lfc*) der drei unabhängigen Experimenten und der *Microarray*-Daten dargestellt. Das Expressionsniveau der untersuchten Gene ist als Mittelwert der Signalstärke der *Microarray*-Chips gemessenen dargestellt.

3.1.7 Funktionelle Kategorisierung differentiell exprimierter Gene nach Expression einzelner T3E

Anhand der Transkriptomdaten wurden 64 Gene in *S. lycopersicum* identifiziert, deren Transkriptmenge in Abhängigkeit von XopL erhöht, sowie zwei Gene, deren Transkriptmenge vermindert war (Tabelle 13). Post-Hoc-Tests (Signifikanzfilter 5, 2.2.3.3) sagten vorher, dass die Transkriptmenge von 42 Genen XopL-spezifisch erhöht war. 32

XopL-spezifisch regulierte Gene, für die eine zelluläre Funktion vorhergesagt werden kann, sind in Tabelle 15 dargestellt (vollständige Liste in Anhang 9). In der Gruppe von XopL-abhängig regulierten Genen waren keine bekannten GO-Terme angereichert. Der Vergleich mit Experiment 1 zeigte, dass 24 dieser Gene abhängig von einem funktionellen T3SS differentiell exprimiert wurden. Weiterhin wurden 20 der XopL-spezifisch regulierten Gene basierend auf Homologie zu Proteinen aus *A. thaliana* funktionell eingeordnet, wobei drei Gene dem ABA-Signalweg zugeordnet wurden.

Die Transkriptomdaten lassen vermuten, dass die Transkriptmengen von 129 *S. lycopersicum*-Genen in Abhängigkeit von XopS verändert waren (98 vermindert, 31 erhöht; Tabelle 13). Unter Anwendung von Post-Hoc-Tests (Signifikanzfilter 5) wurden 55 bzw. 21 Gene, deren Transkriptlevel erhöht bzw. vermindert war, als XopS-spezifisch differentiell exprimiert vorhergesagt. Ausgewählte XopS-spezifisch regulierte Gene mit bekannter Funktion sind in Tabelle 16 dargestellt. Eine vollständige Liste befindet sich in Anhang 9. Berechnungen von GO-Term-Anreicherung ergaben, dass 17 Gene dieser Gruppe der Organisation der Zellwand zuzuordnen sind.

Im Vergleich zu Proben nach transienter Synthese von XopL- und XopS-Fusionsproteinen wurden in Proben nach transienter Synthese von XopB-, XopG-, XopI- und XopQ-Fusionsproteinen signifikant weniger differentiell exprimierte Gene identifiziert, was eine Berechnung der Anreicherung von GO-Termen unmöglich machte. Dabei waren acht Gene XopB-abhängig differentiell exprimiert (Tabelle 17 und Anhang 9). Mit Hilfe von BLAST-Analysen wurde ein Gen (Solyc05g005340) dem ABA-Signalweg zugeordnet, sowie zwei weitere Gene (Solyc04g052910 und Solyc04g052890) dem Transport von Auxin.

Weiterhin wurden vier XopG-abhängig differentiell exprimierte Gene identifiziert (Tabelle 17 und Anhang 9). Durch BLAST-Analysen wurde eines dieser Gene (Solyc03g045020) dem Aminosäurekatabolismus zugeordnet, ein weiteres Gen (Solyc11g006330) mit unbekannter Funktion zeigte Ähnlichkeit zu LRR-Rezeptor-ähnlichen Kinasen und könnte demnach für einen bisher unbekanntem Pathogenabwehr-relevanten Rezeptor kodieren.

Mit Hilfe der Transkriptomanalysen wurden ein XopI-abhängig sowie drei XopQ-abhängig differentiell exprimierte *S. lycopersicum*-Gene mit unbekannter Funktion identifiziert (Tabelle 17 und Anhang 9).

Tabelle 15: XopL-spezifisch differentiell exprimierte *S. lycopersicum*-Gene

Datensatz 3							Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³	
Gennummer	Annotation ¹	lfc ²	6 hpi	10 hpi	24 hpi	Gennummer				zelluläre Funktion	
Solyc10g079380.1.1	Heat stress transcription factor	5,62	-9,79	-0,06	-1,24						
Solyc06g066230.2.1	Cytochrome P450	3,57	0	-0,04	0,16	AT3G26210.1				regulation of defense response	
Solyc10g079650.1.1	BHLH transcription factor-like	3,29	0,01	-0,28	0						
Solyc02g076830.1.1	S-locus-specific glycoprotein	2,84	-1,06	0,04	-3,03	AT1G78830.1				response to cytokinin; low similarity to Ser/Thr protein kinase	
Solyc04g007620.1.1	Predicted by genscan and genefinder	2,81	-0,99	-1,69	-2,43						
Solyc01g010420.2.1	NPH3 domain containing protein-like	2,76	0,1	-0,26	-0,87	AT1G27100.1				Actin-linking protein; regulation of plant-type hypersensitive response	
Solyc01g097470.2.1	Neurogenic locus notch protein-like	2,67	-0,59	-1,58	-1,76						
Solyc12g017430.1.1	Claathrin assembly protein	2,66	0,01	-0,21	0,52						
Solyc06g083450.2.1	O-methyltransferase 1	2,43	0,44	-0,63	0,68	AT5G54160.1				amino acid biosynthetic process, lignin biosynthesis	
Solyc10g079680.1.1	BHLH transcription factor-like	2,43	-0,33	1,65	-0,31						
Solyc01g107000.1.1	Endo-1 4-beta-xylanase	2,39	0,05	-0,2	-0,25	AT4G33860.1				carbohydrate metabolic process	
Solyc10g074730.1.1	Harpin-induced 1	2,37	0,33	-0,35	-0,98						
Solyc01g108870.2.1	Gibberellin 20 oxidase 2	2,28	0,06	0,36	0,71	AT3G19010.3				regulation of plant-type hypersensitive response	
Solyc01g108880.2.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	2,21	-0,06	0,07	0,8	AT3G19010.1				regulation of plant-type hypersensitive response	
Solyc01g109140.2.1	Cytochrome P450	2,18	-0,21	-2,36	-3,33	AT5G42650.1				AtCYP74A, ABA response, MAPK cascade	
Solyc11g005760.1.1	Glycogenin-like protein	2,04	1,37	0,14	-0,24	AT3G18660.2				cell wall organization	
Solyc09g056430.2.1	Kinase family protein	1,94	-0,24	-1,14	-1,03	AT3G25250.1				defense response	
Solyc01g009920.1.1	U-box domain-containing protein 24	1,84	-1,01	-2,36	-2,68	AT3G11840.1				MAPK cascade	
Solyc03g117270.1.1	F-box family protein	1,8	0,7	-0,33	-0,48						
Solyc09g074890.1.1	Rapid alkalization factor 1	1,8	-0,28	-0,99	-1,3						
Solyc02g079860.1.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	1,69	-0,03	0,16	0,02	AT3G22104.1				protein ubiquitination	
Solyc06g069130.2.1	Kinesin-like protein	1,5	-0,43	-1,61	-0,57	AT1G73860.1				microtubule-based movement	
Solyc08g078510.2.1	GRAM-containing/ABA-responsive protein	1,47	-0,67	-1,1	-0,92	AT5G13200.1				heat acclimation	
Solyc06g060470.1.1	VQ motif family protein	1,45	-0,87	-2,35	-1,63						
Solyc05g018510.2.1	ABC transporter G family member 32	1,37	-0,39	-0,42	-0,48	AT1G15520.1				MAPK cascade, ABA-activated signaling pathway	
Solyc04g040090.2.1	Strictosidine synthase-like protein	1,34	0,27	-0,59	-2,15	AT3G57030.1				response to UV-B, response to sucrose	
Solyc02g083360.1.1	Protein-methionine-s-oxide reductase	1,29	-0,39	-1,1	-0,49	AT2G17705.1				not known	
Solyc03g120840.1.1	Ethylene-responsive transcription factor 4	1,22	0	0,05	-0,8						
Solyc07g048060.1.1	Auxin-induced protein-like	1,14	-0,24	-1,46	-2,54	AT5G47530.1				Auxin-responsive family protein	
Solyc02g071560.2.1	Subtilisin-like protease	1,03	-0,78	-1,1	-1,75	AT5G45650.1				metabolic process, proteolysis	
Solyc11g044940.1.1	Pto-like, Serine/threonine kinase protein	-1,11	0,19	0,45	0,77	AT3G59420.1				ABA-response	
Solyc09g098380.1.1	Amino acid transporter	-2	0,37	-0,22	0,72	AT5G16740.1				amino acid transport	

¹ nach ITAG 2.4 (Stand August 2015) ² logarithmischer fold change zur Basis 2 (XopL vs. GFP) ³ mind. 40% AS-Identität über 70% der Aminosäuresequenz

Tabelle 16: XopS-spezifisch differentiell exprimierte *S. lycopersicum*-Gene

Datensatz 3		Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³		
Gennummer	Annotation ¹	<i>lfc</i> ²	6 <i>hpi</i>	10 <i>hpi</i>	24 <i>hpi</i>	Gennummer	zelluläre Funktion
Solyc07g055990.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7	5,78	0,63	0,48	-1,7	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc09g066370.1.1	Cytochrome P450	5,46	-0,19	1,4	0,16	AT3G26300.1	defense response to other organism
Solyc03g093130.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9	4,95	-0,36	-0,14	-1,6	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc09g066400.1.1	Cytochrome P450	4,73	-0,13	-0,21	1,2	AT3G26290.1	defense response to other organism
Solyc12g007250.1.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2	4,5	0,16	0,16	-0,93	AT4G28850.1	cell wall organization
Solyc09g092520.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8	4,17	-0,11	0,7	0,24	AT3G23730.1	cell wall organization
Solyc07g056000.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7	3,71	-1,45	-0,98	-2,14	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc02g077330.2.1	GDSL esterase/lipase	3,68	0,42	0,1	-0,04	AT5G45950.1	cuticle development
Solyc04g074430.1.1	Phi-1 protein	3,57	-1,23	-0,52	-1,88	AT4G08950.1	response to brassinosteroid, sterol biosynthetic process
Solyc03g093110.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9	3,44	-0,12	0,35	0,24	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc07g063210.2.1	Expansin S2	3,11	0,34	-0,2	-0,17	AT3G15370.1	AtEXP12, plant-type cell wall loosening, plant-type cell wall organization
Solyc12g007270.1.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2	2,89	-0,14	0,42	0,53	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc07g006850.1.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 3	2,8	0,18	1,05	0,09	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc03g120060.2.1	Cytochrome P450	2,5	0,84	1,06	1,49	AT2G26710.1	brassinosteroid metabolic process
Solyc07g006870.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8	1,93	0,24	0,75	0,99	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc05g013220.2.1	Fatty acid elongase 3-keobacyl-CoA synthase	1,63	0,14	0,49	0,98	AT2G26640.1	plant-type cell wall biogenesis
Solyc05g046290.2.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2	1,41	0,19	0,26	-1,16	AT4G25810.1	cell wall organization
Solyc11g010960.1.1	Alcohol dehydrogenase (CAD1)	1,02	0,21	0,6	0,15	AT4G37990.1	lignin biosynthesis, HR formation
Solyc10g079210.1.1	Abscisic acid insensitive 8 homologue	-2,86	0,24	1,77	1,4	AT3G57200.1	cell wall organization
Solyc06g074390.2.1	Fatty acyl coA reductase (FAR4)	-2,26	0,24	-0,53	1,67	AT3G44540.1	suberin biosynthesis
Solyc02g089860.1.1	GNS1/SUR4 membrane family protein	-2,2	0,03	-0,38	-0,3	AT4G36830.1	response to ABA
Solyc06g010010.1.1	Mlo like protein	-2,2	-0,49	-1,06	-2,12	AT3G45290.1	cell death, defense response
Solyc11g044400.1.1	Osmotin 81 (SOSM1)	-1,57	-0,32	-1,56	-2,94	AT4G11650.1	defense response to bacterium
Solyc03g013040.1.1	Peptidase M	-1,49	-0,11	-0,85	-2,18	AT2G15220.1	defense response
Solyc04g079240.2.1	Patatin-like protein 1	-1,16	-0,02	-0,78	-0,38	AT2G26560.1	MAPK-cascade, defense to bacterium

¹ nach ITAG 2.4 (Stand August 2015) ² logarithmischer fold change zur Basis 2 (XopS vs. GFP) ³ mind. 40% AS-Identität über 70% der Aminosäuresequenz

Tabelle 17: Nach transienter Expression von XopB, XopG, XopI oder XopQ differentiell exprimierte *S. lycopersicum* Gene

XopB		Datensatz 3			Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³	
Gennummer	Annotation ¹	<i>ifc</i> ²	6 <i>hpi</i>	10 <i>hpi</i>	24 <i>hpi</i>	Gennummer	zelluläre Funktion	Gennummer	zelluläre Funktion
Solyc02g078070.1	Unknown Protein	1,36	-0,34	-0,52	0,07	-	-	-	-
Solyc09g030370.2	GDSL esterase/lipase At2g30370	1,64	-0,08	-1,03	-1,66	AT2G30310	unbekannt	AT2G30310	unbekannt
Solyc05g005340.2	Leafy cotyledon 1-like protein	1,59	0,01	-0,59	0,11	AT5G47670	ABA-Signalweg	AT5G47670	ABA-Signalweg
Solyc08g067030.2	Os01g0611000 protein (Fragment)	2,44	0,33	0,85	-0,09	AT5G11420	unbekannt	AT5G11420	unbekannt
Solyc06g067910.2	Os01g0611000 protein (Fragment)	2,41	0,38	0,85	-0,02	AT5G11420	unbekannt	AT5G11420	unbekannt
Solyc04g052910.1	Auxin-responsive protein	2,68	0,02	0,71	0,88	AT1G29500	SAUR66; Auxin-Transport	AT1G29500	SAUR66; Auxin-Transport
Solyc04g052890.1	Auxin-responsive protein	2,58	-0,11	0,66	0,84	AT1G29500	SAUR66; Auxin-Transport	AT1G29500	SAUR66; Auxin-Transport
Solyc07g044910.1	Unknown Protein	3,71	1,28	-0,39	0,94	-	-	-	-
XopG		Datensatz 3			Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³	
Gennummer	Annotation ¹	<i>ifc</i> ²	6 <i>hpi</i>	10 <i>hpi</i>	24 <i>hpi</i>	Gennummer	zelluläre Funktion	Gennummer	zelluläre Funktion
Solyc03g045020.2	Aromatic L-amino acid decarboxylase	2,06	-0,24	-0,17	0,64	AT2G20340	Aminosäuremetabolismus	AT2G20340	Aminosäuremetabolismus
Solyc11g006330.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	7,3	0	-0,03	0,08	AT3G47570	unbekannt	AT3G47570	unbekannt
Solyc02g069390.1	Sh4 homologue protein	4,84	0,31	0,1	1,68	AT2G35640	unbekannt	AT2G35640	unbekannt
Solyc02g063180.2	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	1,71	-0,02	0,79	0,69	-	-	-	-
XopI		Datensatz 3			Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³	
Gennummer	Annotation ¹	<i>ifc</i> ²	6 <i>hpi</i>	10 <i>hpi</i>	24 <i>hpi</i>	Gennummer	zelluläre Funktion	Gennummer	zelluläre Funktion
Solyc12g006390.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	2,7	-0,86	-0,96	-1,37	AT5G59530	unbekannt	AT5G59530	unbekannt
XopQ		Datensatz 3			Datensatz 1			Homologie (<i>A. thaliana</i>) ³	
Gennummer	Annotation ¹	<i>ifc</i> ²	6 <i>hpi</i>	10 <i>hpi</i>	24 <i>hpi</i>	Gennummer	zelluläre Funktion	Gennummer	zelluläre Funktion
Solyc09g009250.2	Trihelix transcription factor	1,48	-0,11	-0,07	-0,03	AT5G03680	unbekannt	AT5G03680	unbekannt
Solyc06g068310.1	Jp18	1,94	0,59	0,03	-0,65	AT1G80520	unbekannt	AT1G80520	unbekannt
Solyc07g043490.1	UDP-glucosyltransferase family 1 protein	2,16	0,73	0,93	1,83	AT2G15480	negative Reg. von ROS-Signalwegen und HR während Infektion mit <i>Pst</i>	AT2G15480	negative Reg. von ROS-Signalwegen und HR während Infektion mit <i>Pst</i>

¹ nach ITAG 2.4 (Stand August 2015) ² logarithmischer fold change zur Basis 2 (Xop vs. GFP) ³ mind. 40% AS-Identität über 70% der Aminosäuresequenz

3.2 Genom-weite Identifizierung und Validierung von Referenzgenen in *S. lycopersicum* und *C. annuum* für quantitative RT-PCR-Analysen

Um die Rolle von pflanzlichen Genen in verschiedenen Prozessen zu analysieren, werden Transkripte neben *Microarray*-Analysen und RNA-Seq-Studien überwiegend mittels qRT-PCR untersucht. Dabei werden in qRT-PCR-Analysen Transkriptmengen stabil exprimierter Gene als Kontrollen zur Normalisierung herangezogen. Da traditionell verwendete Referenzgene aber nicht zwangsläufig unter jeder experimentellen Bedingung stabil exprimiert sind, wurden die in dieser Arbeit erstellten Transkriptomdaten genutzt, um geeignete Referenzgene für das Tomate- und Paprika-*Xcv*-Pathosystem zu identifizieren und validieren.

3.2.1 Selektion geeigneter Referenzgene für Expressionsstudien im Tomate-*Xcv*-Pathosystem

Referenzgene sollen unter den getesteten experimentellen Bedingungen möglichst stabil exprimiert werden. Zur Identifizierung geeigneter Kandidaten-Referenzgene aus den Transkriptomdaten wurden die Experimente 1 und 2 verwendet (siehe 3.1.1). Fluktuationen der Mengen einzelner Transkripte in zu vergleichenden Proben können durch den Variationskoeffizienten (K_V) beschrieben werden. Der K_V ist definiert als die Standardabweichung der Expressionswerte aller Datenpunkte (Zeitpunkt und Behandlung), dividiert durch die mittlere Expressionsstärke des zu betrachtenden Gens. Für die Transkriptomdaten beider Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Grau (Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg) Variationskoeffizienten für alle 34.383 *S. lycopersicum*-Gene bestimmt. Um Einflüsse von Signalrauschen aufgrund schwacher Expression einerseits, und Sättigungseffekte der Oligonukleotid-Sonden durch hohe Transkriptmengen andererseits, zu minimieren, wurden Gene ausgeschlossen, deren durchschnittlicher logarithmierter Expressionswert unter 7 oder über 13 lag. Da die Daten durch unterschiedliche Experimente gewonnen wurden, sind die Transkriptomdaten nicht direkt miteinander vergleichbar. Daher wurden die Gene mit der stabilsten Transkriptabundanz separat für beide Datensätze bestimmt, wobei nur Gene mit einem $K_V \leq 1,2$ ausgewählt wurden. Da Daten biologischer Replikate verlässlicher erschienen, wurden Kandidaten-Referenzgene, welche anhand von Experiment 2 identifiziert wurden, anhand ihres K_V aufsteigend sortiert und die 50 besten Kandidaten-Referenzgene gelistet, welche auch in Experiment 1 einen $K_V \leq 1,2$ zeigten (Anhang 11). Für weitere Analysen wurden die 11 Kandidaten-Referenzgene mit dem niedrigsten Variationskoeffizienten ausgewählt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* mit stabiler Transkriptabundanz im *Microarray* und orthologe Gene aus *C. annuum*

Abk.	Annotation ^a	Locus-Nr. <i>S. lycopersicum</i>	Locus-Nr. <i>C. annuum</i>	AS-Ident. [%]	K _v ^b
TAF6	<i>Transcription initiation factor TFIID subunit 6</i>	Solyc10g006100	CA10g01290	90	0,060
UP1	<i>Genomic DNA chromosome 5 TAC clone K19P17</i>	Solyc07g062920	CA07g17500	75	0,063
IMP-β	<i>Importin beta-2 subunit</i>	Solyc01g111780	CA08g19500	95	0,064
PHD	<i>PHD finger family protein</i>	Solyc06g051420	CA00g95420	69	0,080
COX	<i>Subunit VIb of cytochrome c oxidase</i>	Solyc12g057120	CA12g10550	78	0,080
CLP1	<i>Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1)</i>	Solyc01g009290	CA01g13750	94	0,082
UCH	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 1 protein</i>	Solyc09g018730	CA09g10790	95	0,083
PTBL	<i>Polypyrimidine tract-binding protein-like</i>	Solyc02g088110	CA02g28120	93	0,085
UP2	<i>Genomic DNA chromosome 3 P1 clone MSJ11</i>	Solyc08g060860	CA08g03550	79	0,086
LSM7	<i>U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7</i>	Solyc09g009640	CA09g00800	98	0,087
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>	Solyc04g015370	CA05g00980	96	0,088

^a nach ITAG 2.4 (Stand August 2015) ^b Variationskoeffizienten (K_v) basierend auf Datensatz 2 der in dieser Arbeit erstellten Transkriptomdaten von *S. lycopersicum*

Zur funktionellen Kategorisierung der Kandidaten-Referenzgene wurde die Genannotation in *S. lycopersicum* sowie die orthologer Gene aus *A. thaliana* betrachtet. Die meisten Kandidaten-Referenzgene scheinen basale Zellfunktionen zu erfüllen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Funktionelle Kategorisierung der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum*

Gen	Ortholog in <i>A. thaliana</i>	AS Ident. [%]	Funktionelle Kategorie	Referenz
<i>TAF6</i>	AT1G04950	59	Transkription	(146)
<i>IMP-β</i>	AT2G16950	74	Nukleärer Import	(147)
<i>UP1</i>	-	-	unbekannt	-
<i>PHD</i>	AT5G05610	69	Chromatin-Modifikation	(148)
<i>COX</i>	AT1G22450	59	Redox-Prozess	(149)
<i>CLP1</i>	AT3G04680	69	mRNA-Splicing	(150)
<i>UCH</i>	AT1G65650	79	Protein De-Ubiquitinierung	(80)
<i>PTBL</i>	AT3G01150	80	mRNA-Splicing	(151)
<i>UP2</i>	-	-	unbekannt	-
<i>LSM7</i>	AT2G03870	87	Splicing-Komplex	(152)
<i>ACP</i>	AT1G65290	76	Fettsäure-Biosynthese	(153)

3.2.2 Vergleich der Kandidaten-Referenzgene mit traditionell verwendeten Referenzgenen in *S. lycopersicum*

Publikationen der letzten Jahre zeigen, dass vor allem die Gene für Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α), Aktin, Ubiquitin und GAPDH als Referenzgene für qRT-PCR-Analysen in *S. lycopersicum* dienen (103,154,155). Da unter den Kandidaten-Referenzgenen keins dieser üblicherweise verwendetes Referenzgen zu finden ist, sollte geklärt werden, ob diese für das Tomate-Xcv-Pathosystem geeignet sind. Daher wurde basierend auf der Literatur je ein Gen der Genfamilien von EF-1 α , Aktin, Ubiquitin und GAPDH in *S. lycopersicum* ausgewählt (Tabelle 20) und mit den neu identifizierten Kandidaten-Referenzgenen mittels qRT-PCR verglichen. Verwendete Oligonukleotide wurden der Literatur entnommen.

Tabelle 20: Für *S. lycopersicum* und *C. annuum* traditionell verwendete Referenzgene

	Referenzgen für	Abkürzung	Akzessionsnummer	Referenz
<i>S. lycopersicum</i>	Aktin	<i>ACT</i>	TC194780a	155
	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	TC198136a	156
	Elongationsfaktor 1 α	<i>EF-1α</i>	SGN-U212845	157
	Ubiquitin	<i>UBI</i>	TC193502a	156
	α -Tubulin	<i>TUA</i>	AC122540	158
	Ribosomales Protein L8	<i>RPL8</i>	X64562	158
	TATA-bindendes Protein	<i>TBP</i>	SGN-U329249	158
	Cyclophilin	<i>CYP</i>	AK326854	154
<i>C. annuum</i>	Aktin	<i>ACT</i>	AY572427.1	159
	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	GAPCP-2	159
	Elongationsfaktor 1 α	<i>EF-1α</i>	AF242732	160
	β -Tubulin	<i>β-TUB</i>	EF495259.1	159

Die hier erstellten Transkriptomdaten ermöglichen die Analyse der Expressionsniveaus traditionell verwendeter Referenzgene. Dafür wurden die Expressionsniveaus der orthologen Gene aus Experiment 2 der Transkriptomdaten (biologische Replikate, 3.1.1) extrahiert und graphisch dargestellt (Abb. 9). Hier wurden weitere laut Literatur für *S. lycopersicum* verwendete Referenzgene betrachtet: Gene für α -Tubulin, das ribosomale Protein L8, ein TATA-bindendes Protein sowie Cyclophilin (Tabelle 20). Da das Kandidaten-Referenzgen *TAF6* die stabilste Transkriptabundanz in den erstellten Transkriptomdaten hatte, wurde dieses zum Vergleich herangezogen. Wie die Abb. 9 zeigt, weisen alle untersuchten traditionell verwendeten Referenzgene in den Proben von *S. lycopersicum* deutlich stärkere Schwankungen in ihrem Expressionsniveau als *TAF6*.

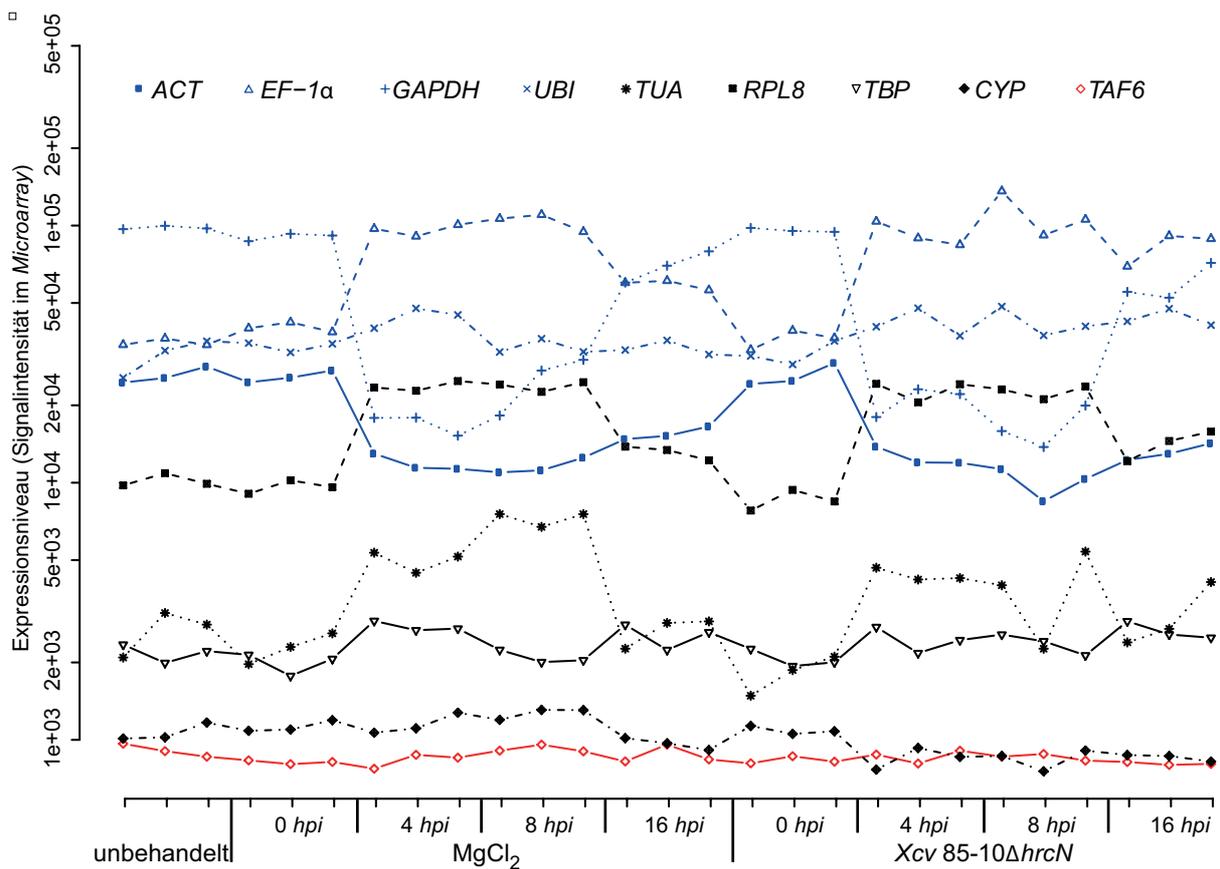


Abb. 9: Transkriptmengen von traditionell verwendeten Referenzgenen und TAF6 aus *S. lycopersicum*

Dargestellt sind die basierend auf den *Microarray*-Analysen ermittelten Expressionsniveaus von acht traditionell verwendeten Referenzgenen sowie dem Kandidaten-Referenzgen *TAF6* (rot) aus *S. lycopersicum* nach der Infektion mit *Xcv 85-10ΔhrcN*, der Infiltration mit einer $MgCl_2$ -Lösung oder unbehandeltem Blattmaterial. Für weitere Analysen herangezogene traditionell verwendete Referenzgene sind blau dargestellt.

3.2.3 Homologie-basierte Identifizierung von Kandidaten-Referenzgenen für das Paprika-*Xcv*-Pathosystem

Um in verschiedenen Modellpflanzen arbeiten zu können, werden geeignete Referenzgene oft anhand orthologer Gene anderer Spezies identifiziert. Mit Hilfe von *BLAST*-Analysen wurden zu den Kandidaten-Referenzgenen orthologe Gene aus *C. annuum* identifiziert (<http://solgenomics.net/tools/blast/>). Dabei wurden nur Proteine betrachtet, deren Aminosäureidentität mindestens 40% über mindestens 70% der Eingabesequenz betrug (Tabelle 18). Um auch im Paprika-*Xcv*-Pathosystem einen Vergleich mit traditionell verwendeten Referenzgenen führen zu können, wurden, analog zu *S. lycopersicum*, Referenzgene der Literatur entnommen und bei folgenden Analysen berücksichtigt (Tabelle 20).

3.2.4 Verifizierung der Kandidaten-Referenzgene und Vergleich mit traditionell verwendeten Referenzgenen im Tomate- bzw. Paprika-Xcv-Pathosystem

Um die Kandidaten-Referenzgene in *S. lycopersicum* und *C. annuum* und darüber hinaus für inkompatible Interaktionen zu verifizieren, wurden für beide Xcv-Pathosysteme je drei unabhängige Infektionsstudien durchgeführt. Inkompatible Interaktionen sollten dabei mit Hilfe bekannter ETI-auslösender Xcv-Avirulenz-Proteine untersucht werden. AvrBs4 aus Xcv 82-8 wird Bs4-abhängig im *S. lycopersicum*-Kultivar *MoneyMaker* erkannt (161), wohingegen AvrBs3 aus Xcv 82-8 Bs3-abhängig in *C. annuum*-ECW-30R-Pflanzen erkannt wird (162). Da beide Effektorproteine im für die *Microarray*-Analysen verwendeten Xcv-Stamm 85-10 nicht natürlich vorkommen, wurden Plasmide zur Expression dieser Avirulenzproteine durch triparentale Konjugation in Xcv 85-10 eingeführt, wodurch beide Xcv-Stämme auf der entsprechenden Wirtspflanze eine HR auslösen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden *S. lycopersicum*- bzw. *C. annuum*-ECW-30R-Pflanzen mit den Stämmen Xcv 85-10, Xcv 85-10 Δ *hrcN* sowie dem inkompatiblen Stamm Xcv 85-10(*pavrBs4*) bzw. Xcv 85-10(*pavrBs3*), infiziert. Als Kontrolle wurde eine MgCl₂-Lösung infiltriert. Die Probenahme erfolgte direkt nach der Behandlung (0 *hpi*) bzw. 6, 10 und 24 *hpi*. Zur Quantifizierung der Transkriptmengen der unterschiedlichen Referenzgene wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dafür wurden für jedes Kandidaten-Referenzgen spezifische Oligonukleotide abgeleitet. Mit Hilfe von Schmelzkurvenanalysen (Anhang 14 und Anhang 15) sowie mittels Gelelektrophorese (Abb. 10) wurde verifiziert, dass alle verwendeten Oligonukleotide ein detektierbares, spezifisches PCR-Produkt amplifizierten.

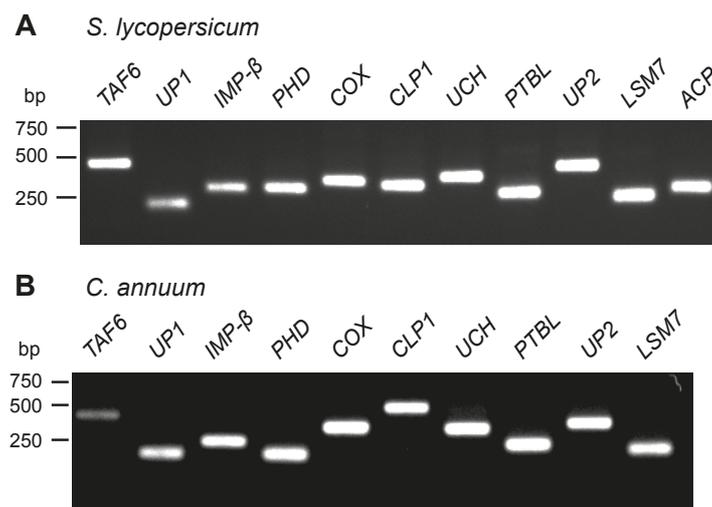


Abb. 10: Gelelektrophorese nach Amplifikation der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum*

Um die Spezifität der Oligonukleotide zu überprüfen, wurden Fragmente der Kandidaten-Referenzgene anhand entsprechender Oligonukleotide von cDNA amplifiziert (40 PCR-Zyklen). PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch (1%) aufgetrennt.

Anschließend wurden mittels qRT-PCR, Expressionswerte (C_t -Werte, *cycle threshold*) für jedes der 11 neu identifizierten Referenzgene und der jeweils vier ausgewählten traditionell verwendeten Referenzgene ermittelt.

Da Referenzgene der Normalisierung von qRT-PCR-Daten dienen, müssen ihre Transkriptmengen möglichst fehlerfrei bestimmbar sein. Liegen diese über oder unter einem bestimmten Bereich, werden die Transkriptmengen zu untersuchender Gene bei der Normalisierung verfälscht. Um verlässliche Daten zu erhalten, sollte der C_t -Wert, als Maß für die Transkriptmenge, zwischen 20 und 35 Zyklen liegen. Wie die Abb. 11A zeigt, liegt der C_t -Wert aller neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* innerhalb des optimalen C_t -Bereiches. Die Boxplots zeigen darüber hinaus, dass im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Referenzgenen Aktin, GAPDH und Ubiquitin, alle neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene vergleichsweise geringere Schwankungen der Transkriptmengen innerhalb der getesteten Proben aufwiesen. Zu den Kandidaten-Referenzgenen orthologe Gene aus *C. annuum* zeigten teilweise höhere C_t -Werte (bspw. *CaTAF6* und *CaCLP1*) und größere Schwankungen ihrer Transkriptmenge innerhalb der getesteten Proben (bspw. *CaTAF6*, *CaIMP- β* und *CaCOX*) (Abb. 11B).

Da die Amplifikation des Kandidaten-Referenzgens *ACP* aus *C. annuum* auch unter Verwendung unterschiedlicher Oligonukleotid-Paare fehlschlug, wurde *CaACP* bei folgenden Analysen nicht weiter betrachtet.

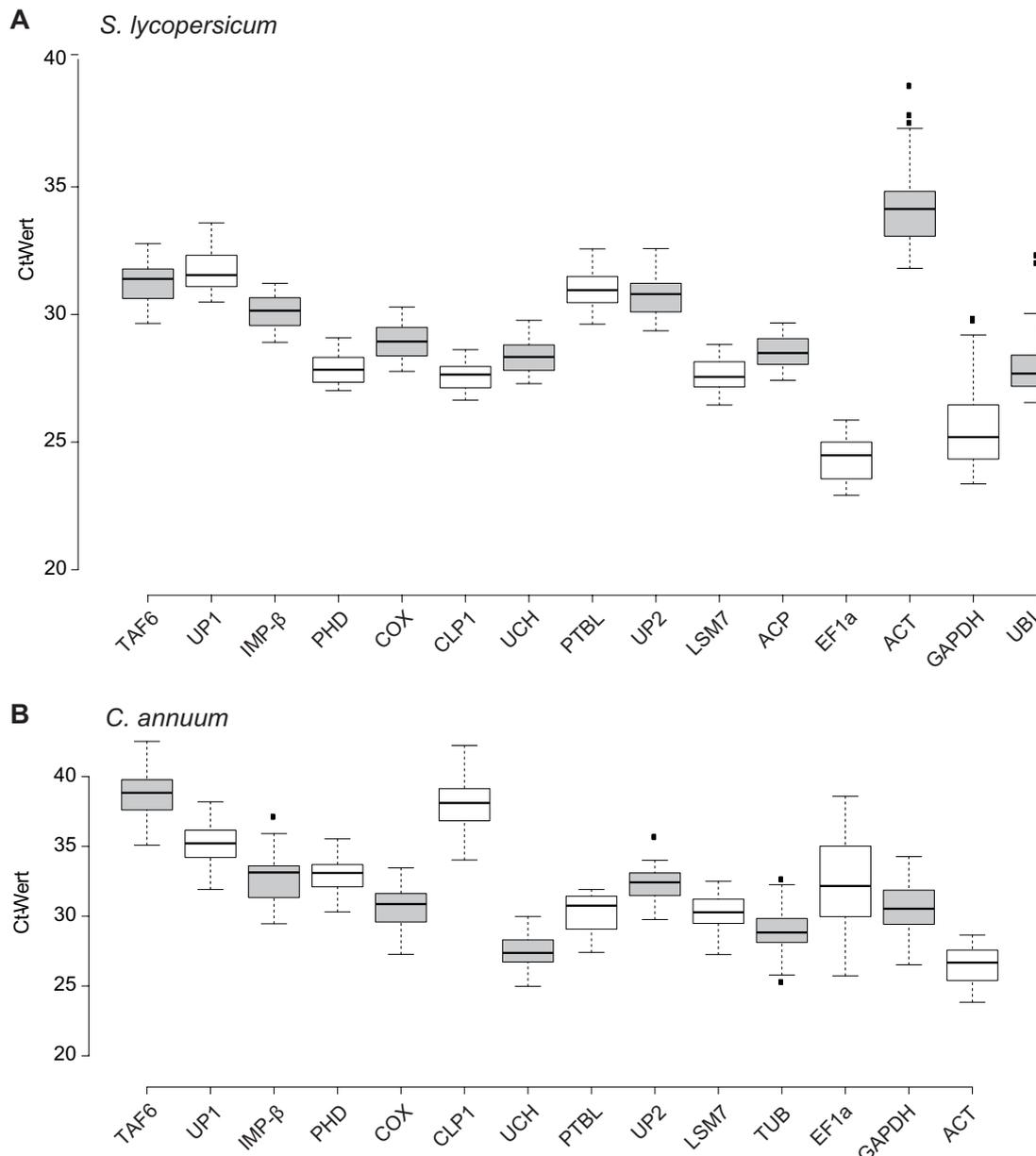


Abb. 11: Transkriptabundanz aller untersuchten Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum*

Mittels qRT-PCR-Analysen wurden die C_T -Werte als Maß der Transkriptmenge der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* (A) und *C. annuum* (B) in je drei biologischen Replikaten bestimmt. Die mittleren C_T -Werte der Kandidaten-Referenzgene wurden in Form von Boxplots grafisch dargestellt.

Um die für *Xcv*-Infektionsstudien optimalen Referenzgene zu bestimmen, wurden die Expressionswerte anhand von drei verschiedenen Algorithmen evaluiert. Der *geNorm*-Algorithmus listet Referenzgene nach dem Stabilitätswert M, welcher hier anhand der durchschnittlichen, paarweisen Expressionsvariation von je zwei Referenzgenen bestimmt wird (163). Je niedriger dabei der M-Wert, desto höher ist die Expressionsstabilität des betrachteten Referenzgenes. In aufeinanderfolgenden Berechnungsschritten wird das jeweilige Gen mit dem höchsten M-Wert ausgeschlossen, bis ein optimales Paar zur Quantifizierung von Transkripten unter den getesteten Bedingungen übrig bleibt.

Der *NormFinder*-Algorithmus erlaubt bei der Berechnung der M-Werte der Referenzgene eine Gruppierung der getesteten Proben, wobei die Variabilität der Transkriptabundanz

innerhalb und zwischen den Gruppen berücksichtigt wird (164). Dadurch ist es möglich, optimale Referenzgene in Hinblick auf den verwendeten *Xcv*-Stamm und die Infektionsdauer zu bestimmen.

Der *BestKeeper*-Algorithmus erlaubt eine Berücksichtigung von Extremwerten, welche bei der Berechnung der mittleren Transkriptmenge der Referenzgene stärker ins Gewicht fallen (165). Da mittels *BestKeeper*-Algorithmus maximal 10 Referenzgene miteinander verglichen werden können, wurde für beide Wirtspflanzen mit Hilfe der Algorithmen *geNorm* und *NormFinder* eine Rangfolge der Kandidaten-Referenzgene erstellt (Abb. 12) und nachfolgend die sechs besten Kandidaten-Referenzgene mit den traditionell verwendeten Referenzgenen mit Hilfe des *BestKeeper*-Algorithmus verglichen (Tabelle 21).

Bei Anwendung des *geNorm*-Algorithmus für *S. lycopersicum* unter Berücksichtigung einer Obergrenze von $M \leq 0,5$ (163), wurden alle neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene sowie *EF-1 α* als für das Tomate-*Xcv*-Pathosystem geeignete Referenzgene beurteilt, wobei *PHD* und *IMP- β* das optimale Referenzgen-Paar sind. Die Transkriptmenge von GAPDH, Aktin und Ubiquitin hingegen unterliegen unter den untersuchten Bedingungen zu großen Schwankungen. Bei der Verwendung des *NormFinder*-Algorithmus und einer Obergrenze von $M \leq 1,5$ (164), wurden alle getesteten Referenzgene, sowohl bei Infektionsbedingungen und -stadien mit verschiedenen *Xcv*-Stämmen, als auch nach Infiltration mit $MgCl_2$ als verlässliche Referenzgene eingestuft. Dabei wurde anhand aufsteigender M-Werte folgende Rangfolge festgestellt: *COX* > *PHD* > *CLP1* > *LSM7*. Nachfolgend wurden sowohl diese Gene, als auch *ACP* und *IMP- β* anhand des Algorithmus *BestKeeper* mit den traditionell verwendeten Referenzgenen verglichen. Dabei wurden *CLP1* und *PHD* als die Referenzgene identifiziert, deren Transkriptmengen den geringsten Schwankungen unterliegen.

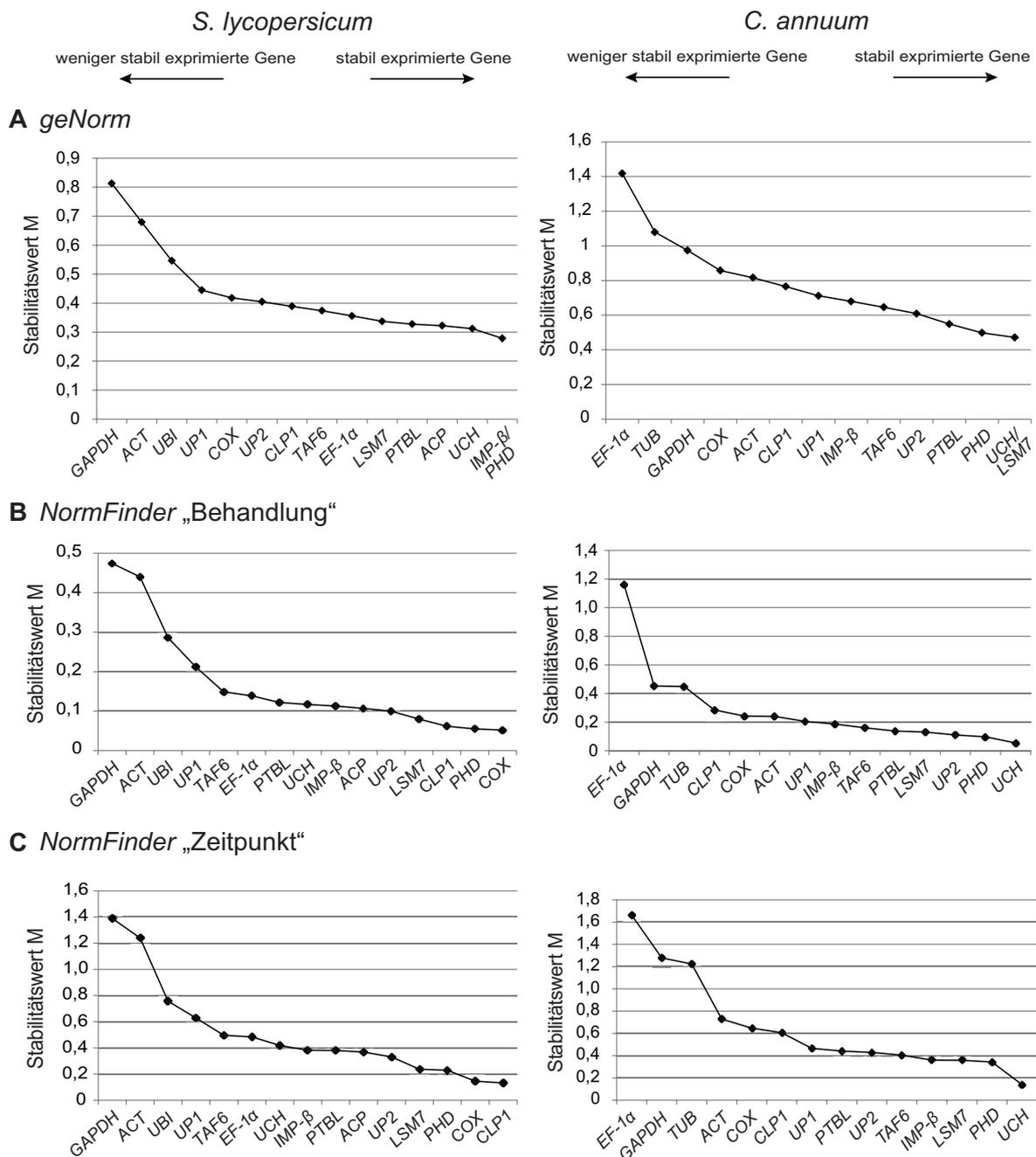


Abb. 12: Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum* mittels *geNorm*- und *NormFinder*-Algorithmus

Mittels qRT-PCR-Analysen wurden die C_T -Werte als Maß der Transkriptmenge der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum* anhand dreier biologischer Replikate bestimmt. Mit Hilfe der Algorithmen *geNorm* (A) und *NormFinder* (B und C) wurde der Stabilitätswert M als Maß für die Expressionsstabilität der Kandidaten-Referenzgene in je 48 Proben berechnet, welche Bedingungen verschiedener Behandlungen (Infektion mit *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* oder *Xcv* 85-10(*pavrBs4* oder *pavrBs3*) bzw. Infiltration mit 10 mM $MgCl_2$) bzw. verschiedene Stadien einer Infektion (0, 6, 10 und 24 *hpi*) widerspiegeln. Bei der Verwendung von *NormFinder* wurden die Proben nach verschiedenen Infektionen ((B) „Behandlung“) bzw. dem Infektionsstadium ((C) „Zeitpunkt“) gruppiert.

Tabelle 21: Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum* mittels BestKeeper-Algorithmus

<i>S. lycopersicum</i>										
Rangfolge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gen	<i>CLP1</i>	<i>PHD</i>	<i>LSM7</i>	<i>ACP</i>	<i>IMP-β</i>	<i>COX</i>	<i>EF-1α</i>	<i>UBI</i>	<i>ACT</i>	<i>GAPDH</i>
Geo MW [C _i]	27,58	27,87	27,62	28,51	30,11	28,94	24,32	27,95	34,16	25,57
Min [C _i]	26,64	27,02	26,45	27,42	28,91	27,77	22,91	26,55	31,81	23,36
Max [C _i]	28,62	29,09	28,83	29,67	31,22	30,29	25,86	32,32	38,96	29,83
SD [± C _i]	0,41	0,47	0,53	0,53	0,55	0,61	0,72	0,86	1,27	1,41
CV [% C _i]	1,5	1,67	1,9	1,86	1,83	2,09	2,97	3,09	3,7	5,5

<i>C. annuum</i>										
Rangfolge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gen	<i>UCH</i>	<i>ACT</i>	<i>UP2</i>	<i>PHD</i>	<i>PTBL</i>	<i>LSM7</i>	<i>IMP-β</i>	<i>TUB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>EF-1α</i>
Geo MW [C _i]	27,33	26,52	32,18	32,9	30,31	30,05	32,71	28,95	30,46	31,97
Min [C _i]	24,98	23,84	29,76	30,31	27,41	27,25	29,46	25,28	26,52	25,73
Max [C _i]	29,98	28,65	35,68	35,54	31,92	32,5	37,12	32,64	34,27	38,6
SD [± C _i]	0,95	1	1,01	1,04	1,09	1,2	1,31	1,34	1,53	2,81
CV [% C _i]	3,48	3,75	3,14	3,17	3,6	4	4	4,61	5	8,73

Geo MW [C_i] - geometrischer Mittelwert des C_i; Min [C_i] bzw. Max [C_i] - Extremwerte des C_i; SD [± C_i] - Standardabweichung des C_i; CV [% C_i]: Variationskoeffizient des C_i;

3.2.5 qRT-PCR-basierte Evaluierung der Kandidaten-Referenzgene in *S. lycopersicum* und *C. annuum* für kompatible und nicht-kompatible Interaktionen

Um die Normalisierung von zu untersuchenden cDNA-Proben anhand der Referenzgene zu verbessern, empfiehlt sich die Verwendung von zwei oder mehr Referenzgenen. Basierend auf den Ergebnissen der verschiedenen Algorithmen wurden drei geeignete Referenzgen-Paare für *S. lycopersicum* ausgewählt und durch weitere Experimente evaluiert: *CLP1* und *PHD*, *COX* und *LSM7*, sowie *IMP-β* und *PHD*. Analog dazu wurden die besten Referenzgen-Paare für *C. annuum* ausgewählt: *UCH* und *LSM7* sowie *UCH* und Aktin. Die verschiedenen Referenzgen-Paare wurden zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge gut untersuchter Zielgene herangezogen. Als Kontrolle dienten die beiden Referenzgene mit der höchsten Variabilität der Transkriptmenge: Aktin und *GAPDH* für *S. lycopersicum* und *EF-1α* und *GAPDH* für *C. annuum*. Um darüber hinaus die Verwendbarkeit der Referenzgen-Paare für sowohl kompatible als auch nicht-kompatible Interaktionen von *Xcv* mit Wirtspflanzen zu untersuchen, wurde für beide Pathosysteme je ein *PTI*- sowie ein *ETI*-induziertes Gen ausgewählt. Die Transkriptmenge von *LRR22* wird im Zuge der *PTI* während der Infektion

von *S. lycopersicum* mit *Pst*-Stämmen erhöht (166). Bei der Infektion von *S. lycopersicum* mit *Xcv* wird dies aber T3E-abhängig bereits 6 *hpi* unterdrückt (kompatible Interaktion) (166,167). Die mRNA von *CaTFT4* akkumuliert in Paprika-ECW-20R-Pflanzen während der *AvrBs2*-induzierten *ETI* 24 *hpi* mit *Xcv* 85-10 (103). Eine ähnliche Akkumulation von *SITFT4* ist in der *S. lycopersicum*-Linie Hawaii 7981 8 *hpi* mit *Xcv* 5746(*AvrXv3*) zu beobachten (103). Um bei den qRT-PCR-Analysen beide Zielgene zum gleichen Infektionszeitpunkt untersuchen zu können, wurde für *S. lycopersicum* die UDP-Glykosyltransferase *SIUGT* (Solyc09g092500) als *ETI*-induziertes Zielgen ausgewählt, welches bereits 6 *hpi* mit *Pst* T3E-abhängig induziert wird (168). Die Analyse dieser differentiell exprimierten Gene wurde mit RNA-Proben von *S. lycopersicum* bzw. *C. annuum* 6 *hpi* mit *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*, *Xcv* 85-10(*pavrBs4*) (bzw. *Xcv* 85-10(*pavrBs3*)) durchgeführt. Dabei wurden die Gene in unterschiedlichen Proben anhand der beschriebenen Referenzgen-Paare normalisiert und relativ zu RNA-Proben nach Infiltration mit 10 mM MgCl₂ quantifiziert.

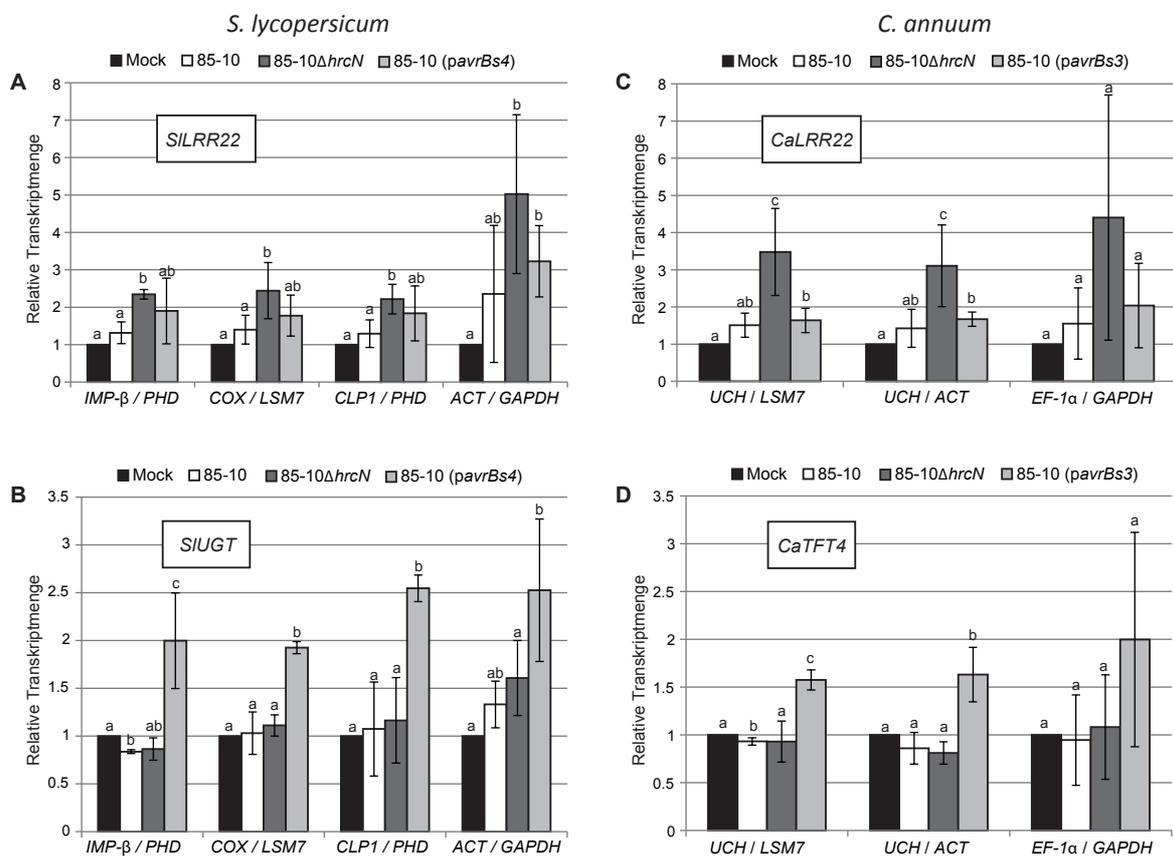


Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher Referenzgen-Paare auf die Bestimmung der Transkriptabundanz von *PTI*- und *ETI*-Genen mittels qRT-PCR

Dargestellt sind Expressionsmuster von *SILRR22* (A) und *SIUGT* (B) bzw. *CaLRR22* (C) und *CaTFT4* (D), 6 *hpi* mit 5×10^8 *cfu/ml* *Xcv* 85-10, 85-10 Δ *hrcN* und 85-10(*pavrBs4*) bzw. 85-10(*pavrBs3*) relativ zu Proben nach Infiltration von 10 mM MgCl₂. Die qRT-PCR-Daten wurden anhand verschiedener Referenzgen-Paare normalisiert. Alle Werte zeigen mittlere Änderungen des mRNA-Niveaus dreier biologischer Replikate, deren Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt ist. Kleinbuchstaben markieren statistisch signifikante Änderungen (studentischer t-Test, $p < 0,05$).

Wie die Abb. 13A zeigt, resultierte die Verwendung von allen neu identifizierten Kandidatengenen in eine 2-fache Induktion von *SILRR22* bei der Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* verglichen mit der $MgCl_2$ -Kontrolle. Konträr dazu zeigte sich bei Verwendung suboptimaler Referenzgene eine 5-fache Induktion. Darüber hinaus bewirkten die Stämme *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10(*pavrBs4*) unter Verwendung der traditionellen Referenzgene Aktin und GAPDH scheinbar eine signifikante 2-fache Induktion von *SILRR22* gegenüber der $MgCl_2$ -Kontrolle, was bei Verwendung der neu identifizierten Referenzgen-Kombinationen nicht der Fall ist. Bei der Analyse der Transkriptlevel von *CaLRR22* waren aufgrund der Wahl der Referenzgene keine signifikanten Unterschiede während der Infektion von *C. annuum*-Blättern mit *Xcv* zu beobachten (Abb. 13C). Bemerkenswert ist aber, dass die Standardabweichungen biologischer Replikate beider Wirtspflanzen bei Verwendung neuer Referenzgen-Kombinationen erheblich kleiner sind.

Die Analyse der ETI-induzierten Gene *CaTFT4* und *SIUGT* zeigten keinen klaren Unterschied in Abhängigkeit von den verwendeten Referenzgenen. Die Transkriptmenge von *CaTFT4* war während der inkompatiblen Interaktion von ECW-30R-Pflanzen mit *Xcv* 85-10(*pavrBs3*) um Faktor 1,5 erhöht, wie es bereits bei der Erkennung von AvrBs3 in ECW-30R-Pflanzen bekannt ist (103). Auch die Änderungen der Transkriptmenge von *SIUGT* zeigten keinen klaren Unterschied in Abhängigkeit von den verwendeten Referenzgenen. In allen Fällen war die Transkriptmenge von *SIUGT* nach der Inokulation des Stamms 85-10 (*pavrBs4*) im Vergleich zu Proben nach Infiltration mit $MgCl_2$ signifikant höher.

Interessanterweise scheint *SIUGT* bei Normalisierung der Proben mit Hilfe von Aktin und GAPDH aber nicht nur durch den avirulenten Stamm *Xcv* 85-10(*pavrBs4*) induziert zu sein, sondern auch in geringfügigem (nicht signifikanten) Maße durch die Stämme *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* (Abb. 13B). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Aktin und/oder GAPDH selbst durch die Infektion mit *Xcv* in ihrem Transkriptlevel reguliert werden. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden die vorliegenden qRT-PCR-Daten verwendet, um die Transkriptlevel von Aktin und GAPDH unter Verwendung der neu identifizierten Referenzgene in *S. lycopersicum*- und *C. annuum*-Blättern während der Infektion mit *Xcv* zu quantifizieren. Wie die Abb. 14A zeigt, waren die Transkriptmengen von GAPDH in der Tat während der Infektion von *S. lycopersicum* mit *Xcv* vermindert. Die Infektion von *C. annuum* zeigte hingegen eine schwache Erhöhung der Transkriptmenge von *CaGAPDH* nach Infektion mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 Δ *hrcN* und 85-10(*pavrBs3*), die, je nach verwendetem Referenzgen, als signifikant oder nicht signifikant beurteilt wurde. Die Transkriptmengen von *SIACT* bzw. *CaEF-1 α* werden durch die Infektion mit *Xcv* nicht verändert.

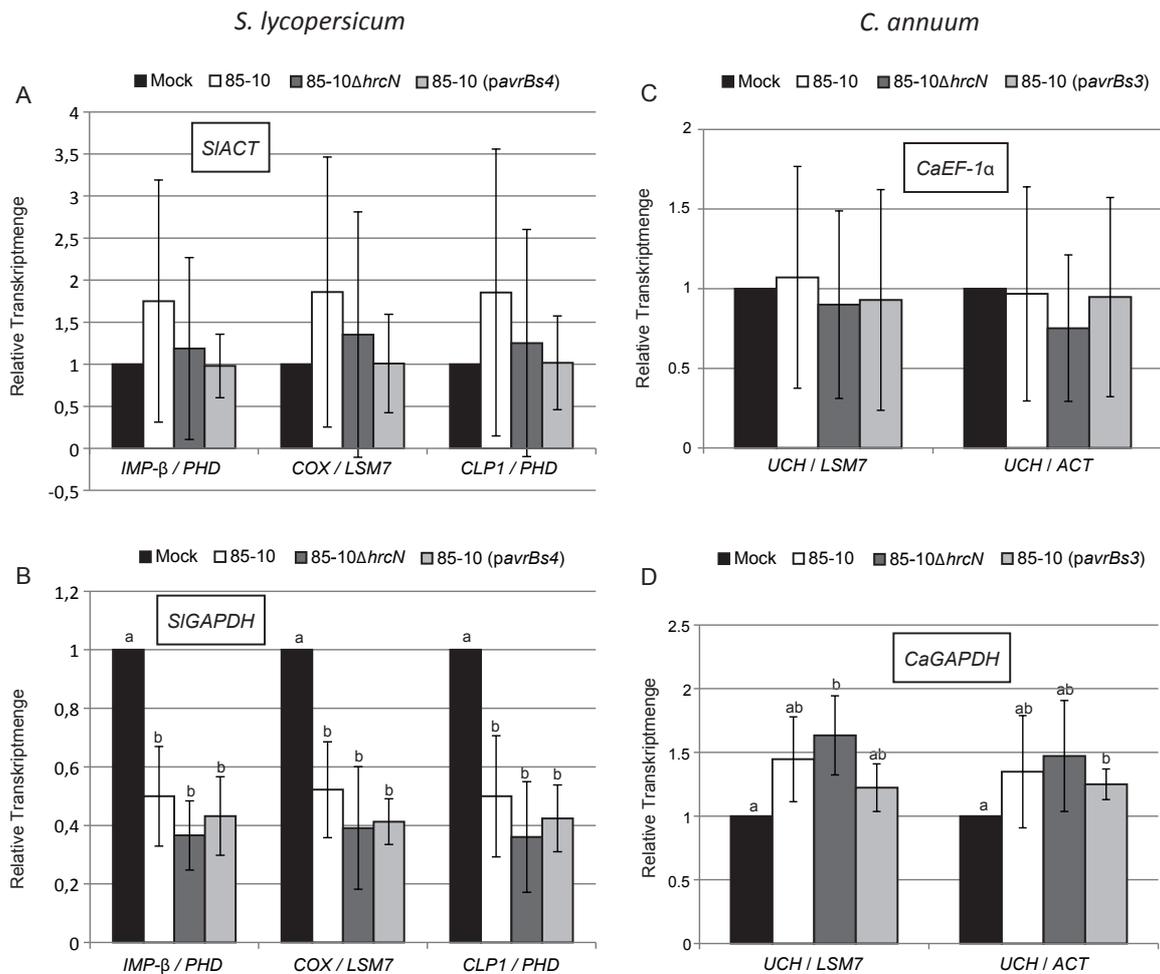


Abb. 14: Relative Expression der Gene für Aktin und GAPDH in *S. lycopersicum* bzw. EF-1α und GAPDH in *C. annuum* nach Infektion mit *Xcv*

Dargestellt sind Expressionsmuster von *SIACT* (A), *SIGAPDH* (B) in Blättern von *S. lycopersicum* cv. MM bzw. *CaEF-1α* (C) und *CaGAPDH* (D) in Blättern von *C. annuum* ECW-20R-Pflanzen, 6 hpi mit 5×10^8 cfu/ml *Xcv* 85-10, 85-10ΔhrcN oder 85-10(pavrBs4) relativ zu Proben nach Infiltration von 10 mM MgCl₂. Die qRT-PCR-Daten wurden anhand verschiedener Referenzgen-Paare normalisiert. Alle Werte zeigen mittlere Änderungen der Transkriptmenge in drei biologischen Replikaten, deren Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt sind. Kleinbuchstaben markieren statistisch signifikante Änderungen (studentischer t-Test, $p < 0,05$).

3.3 Funktionelle Charakterisierung des Effektorproteins Xopl

Die Aminosäuresequenz von Xopl enthält im N-terminalen Bereich ein F-Box-Motiv, welches möglicherweise Skp1-vermittelt der Integration in SCF-Komplexe dient (74,169) und im C-terminalen Bereich Armadillo-*repeats*, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (170). Daher könnte Xopl die Degradation pflanzlicher Proteine mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) vermitteln.

3.3.1 Analyse der Interaktion von Xopl mit Skp1 in pflanzlichen SCF-Komplexen

3.3.1.1 Interaktionsstudien von Xopl mit Skp1-Homologen aus *S. lycopersicum* und *C. annuum*

In vorangegangenen Arbeiten wurde ein Protein aus *N. benthamiana* mit Homologie zu Cullin aus *A. thaliana* als Interaktionspartner von Xopl mittels GFP-*Trap*-System identifiziert. Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)-Experimente deuteten an, dass diese Interaktion von Ca_{EST}Skp1 aus *C. annuum* vermittelt wird, dessen Sequenz auf den damals verfügbaren *EST*-Sequenzen von *C. annuum* (O. Müller und U. Bonas, unveröffentlichte Daten) beruht. Die 2012 bzw. 2014 veröffentlichten Genomsequenzen von *S. lycopersicum* (Annotation nach ITAG-Version 2.3) bzw. *C. annuum* (Annotation des Kultivars CM334), kodieren die Skp1-Proteine Solyc11g042930.1 (*S*/Skp1) und CA08g19370 (*Ca*Skp1) (*S*/Skp1 90,97% identisch zu *Ca*Skp1 100%).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion von Xopl mit Skp1 zunächst *in planta* mittels Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) bestätigt werden. Dazu wurden Konstrukte erstellt, die eine Synthese der Fusionsproteine c-Myc₄-Xopl bzw. c-Myc₄-Xopl_{ΔF-Box} und GFP-*S*/Skp1 bzw. GFP-*Ca*Skp1 erlauben und *Agrobacterium*-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein *Agrobacterium*_{GV3101}-Stamm verwendet, der eine Synthese von GFP vermittelt (lag in der Arbeitsgruppe vor). Drei Tage nach Infektion von *N. benthamiana*-Blättern wurden Proben für Proteinextrakte geerntet. c-Myc₄-Xopl und c-Myc₄-Xopl_{ΔF-Box} wurden mittels c-Myc₄-spezifischem Antikörper immobilisiert (Abb. 15A) und im Immunoblot nachgewiesen. Wie die Abb. 15B zeigt, kopräzipitierten sowohl *S*/Skp1 als auch *Ca*Skp1 mit Xopl in Abhängigkeit von dessen F-Box-Motiv. Das Kontrollprotein GFP kopräzipitierte weder mit c-Myc₄-Xopl noch mit c-Myc₄-Xopl_{ΔF-Box}.

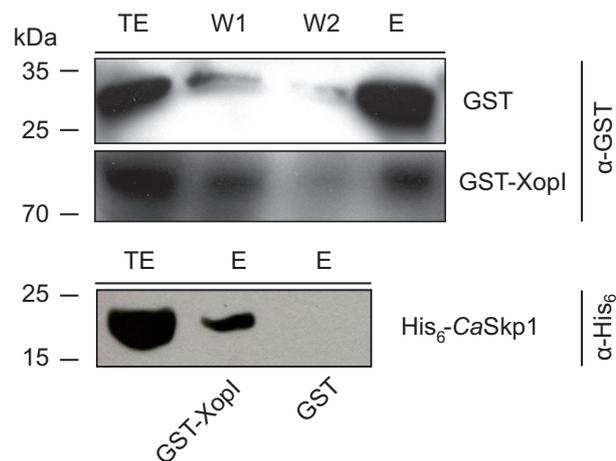


Abb. 16: Analyse der Interaktion von Xopl und CaSkp1 *in vitro* mittels GST-pull-down-Analysen

Immunoblot zur Detektion von Fusionsproteinen in GST-pull-down-Analysen. GST bzw. GST-Xopl wurden rekombinant in *E. coli*_{BL21}-Zellen synthetisiert, immobilisiert und mit *E. coli*_{BL21}-Lysat inkubiert, welches His₆-CaSkp1 enthielt. Die Detektion der GST-Fusionsproteine erfolgte im Totalextrakt (TE), zwei der Waschschritte (W1, W2) und im Eluat (E) mit Hilfe eines GST-spezifischen Antikörpers. Die Detektion von His₆-CaSkp1 erfolgte im *E. coli*_{BL21}-Lysat (TE) sowie in den Eluaten (E) nach Inkubation mit *E. coli*_{BL21}-Lysat mit Hilfe eines His₆-spezifischen Antikörpers. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.3.1.2 Interaktionsstudien mit Xopl und ASK-Proteinen aus *A. thaliana*

In *A. thaliana* kodieren 21 Gene für Skp1-ähnliche Proteine (ASK; *Arabidopsis* *SKP1-like protein*), die in verschiedene SCF-Komplexe integrieren und so unterschiedliche biologische Prozesse steuern (171). Die Expression verschiedener ASK-Proteine ist gewebespezifisch (172) und viele F-Box-Proteine aus *A. thaliana* haben Bindespezifitäten für bestimmte ASK-Proteine (171). Um zu untersuchen, ob Xopl möglicherweise ähnliche Bindespezifitäten hat, wurden Interaktionsstudien mit Xopl bzw. dem Derivat Xopl_{ΔF-Box} und verschiedenen ASK-Proteinen in Hefe durchgeführt. Dafür wurden Konstrukte erstellt, welche eine N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD_{Gal4}) mit Xopl und Xopl_{ΔF-Box} erlauben. Plasmide, welche die Gensequenz je eines von 20 der bekannten 21 ASK-Proteine aus *A. thaliana* N-terminal mit der GAL4-Bindedomäne (BD_{Gal4}) fusionieren wurden von Dr. Marcel Quint (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) zur Verfügung gestellt. Über eine mögliche Interaktion von Xopl mit ASK6 kann keine Aussage getroffen werden, da kein entsprechendes Expressionskonstrukt vorlag. *S. cerevisiae*_{Mav103}-Zellen wurden mit Plasmiden zur Synthese von AD_{Gal4}-Fusionen und BD_{Gal4}-Fusionen ko-transformiert und je zwei Ko-Transformanden auf Reporter-genaktivierung untersucht. Wie die Abb. 17A zeigt, interagierte Xopl ausschließlich mit ASK13, aber nicht AD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box}. Die Synthese aller Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot-Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper für die BD_{Gal4} bzw. AD_{Gal4} nachgewiesen (Abb. 17B).

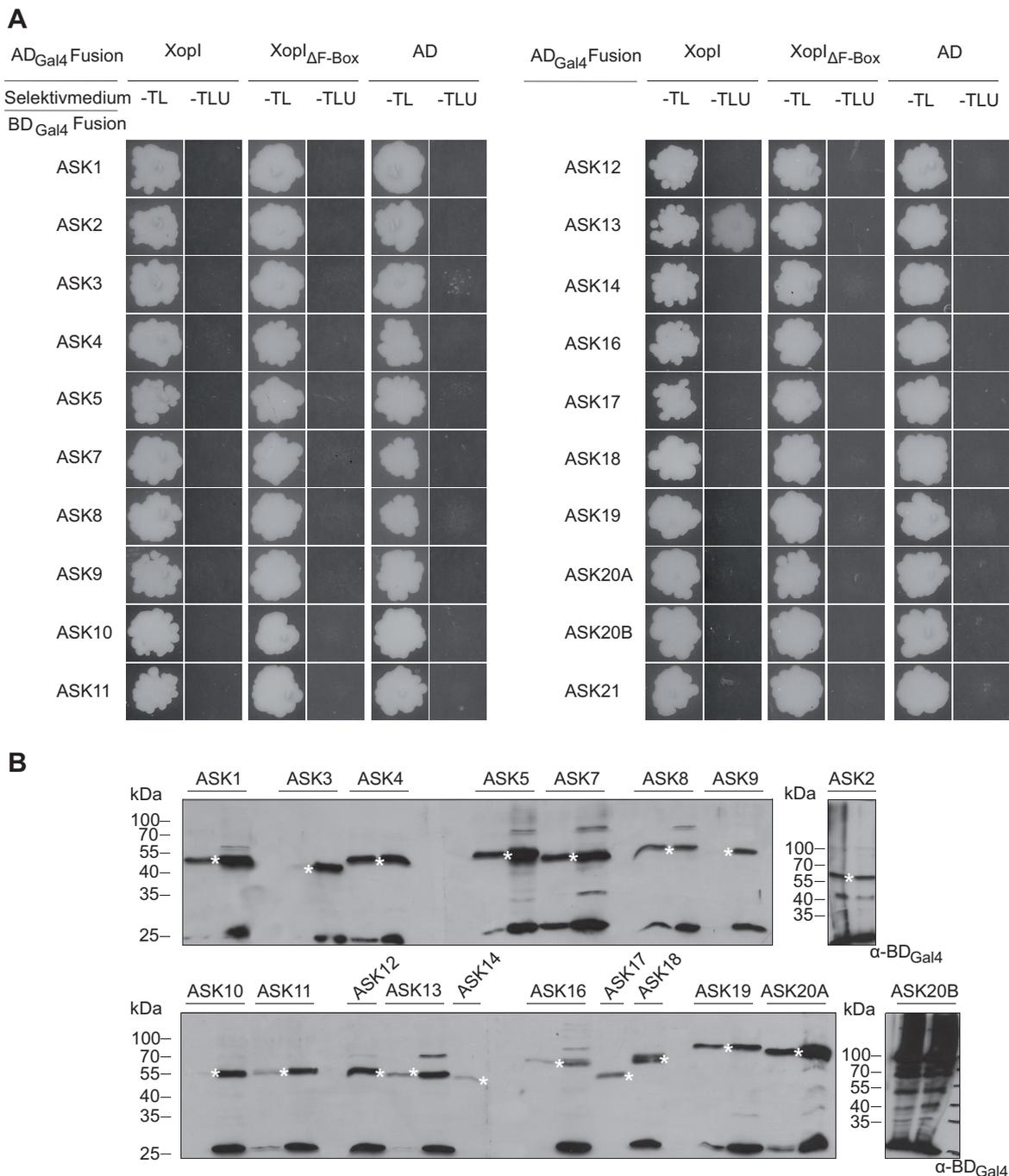


Abb. 17: Analyse der Interaktion von XopI mit ASK-Proteinen aus *A. thaliana* in Hefe

(A) Tropfentest zur Analyse der Interaktion von AD_{Gal4}-XopI, AD_{Gal4}-XopI_{ΔF-Box} bzw. AD_{Gal4} mit 20 ASK-Proteinen aus *A. thaliana*. Transformanten des Hefestammes MaV103, welche Plasmide zur Synthese von AD_{Gal4}-XopI bzw. AD_{Gal4}-XopI_{ΔF-Box} oder AD_{Gal4} (Kontrolle) und BD_{Gal4}-Fusionen der ASK-Proteine enthielten, wurden auf Selektivmedium ohne Tryptophan und Leucin (-TL) bzw. Uracil-Selektivmedium (-TLU) getropft. (B) Immunoblots mit BD_{Gal4}-spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Synthese der Fusionsproteine erwarteter Größen (*). Auszugsweise sind Immunoblots von je 1-2 Ko-Transformanten gezeigt, welche die BD_{Gal4}-ASK-Protein und AD_{Gal4}-XopI exprimierten. In allen Ko-Transformanten wurde die Synthese von AD_{Gal4}-XopI_{ΔF-Box} bzw. AD_{Gal4} nachgewiesen (nicht gezeigt). Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Ko-Transformationen und Analysen der Reporteraktivierung wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.3.1.3 Hefe-Dihybrid-Sichtungen zur Identifizierung potentieller Xopl-Interaktionspartner

Die Interaktion von Xopl mit S/Skp1 und CaSkp1 deutet darauf hin, dass Xopl in pflanzliche SCF-Komplexe integrieren und möglicherweise zur Degradation pflanzlicher Proteine führen kann. Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen der während dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit von Stefanie Mücke, GFP-Trap-Experimente durchgeführt, wobei Aktin und ein Calmodulin-Protein (CaM) als mögliche Interaktionspartner von Xopl und dem Derivat Xopl_{ΔF-Box} identifiziert wurden. Um mögliche weitere Interaktionspartner von Xopl zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit Hefe-Dihybrid-Sichtungen durchgeführt. Dafür wurde eine bereits etablierte cDNA-Bibliothek aus mit Xcv infizierten und nicht infizierten *C. annuum* ECW-10R und -30R-Pflanzen verwendet (173).

3.3.1.4 Sichtung der Paprika-cDNA-Bank mit Xopl-Köderkonstrukten

Die Sichtung der cDNA-Bank erfolgte nach dem Prinzip des MATCHMAKER-GAL4-Hefe-Dihybrid-Systems (Clontech, Heidelberg, Deutschland) (2.2.2.3.4). Als Köderkonstrukte dienten Plasmide, die eine N-terminale Fusion der BD_{Gal4} mit Xopl (BD_{Gal4}-Xopl) bzw. dem Deletionsderivat Xopl_{ΔF-Box} (BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box}) erlauben. Diese Konstrukte wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefanie Mücke erstellt. Sie verifizierte, dass die verwendeten BD_{Gal4}-Xopl-Derivate im *S. cerevisiae*-Stamm MaV103 synthetisiert werden und keine Auto-Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *URA3* und *MEL1* erfolgt. Abweichend zum Protokoll erfolgte die Sichtung der cDNA-Bank mittels Ko-Transformation von *S. cerevisiae*_{MaV103}-Zellen mit den Köderkonstrukten und der cDNA-Bank. Aufgrund der Transformationseffizienzen von $6,3 \times 10^6$ Ko-Transformanden für BD_{Gal4}-Xopl und $5,5 \times 10^6$ Ko-Transformanden für BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box}, wurde bei beiden Sichtungen der Titer der cDNA-Bank ($7,2 \times 10^6$ KBE) knapp abgedeckt. Die Selektion auf das Reportergen *URA3* erfolgte auf Selektivmedium ohne die Aminosäure Uracil. Von erhaltenen Transformanden wurden Plasmide isoliert, welche für cDNA-Fragmente potentieller Interaktoren kodierten, und auf Interaktion mit BD_{Gal4}-Xopl bzw. BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box} untersucht, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Als Kontrolle diente ein BD_{Gal4}-Köderkonstrukt. Dieser Spezifitätstest wurde auf selektiven Medien für die Reportergene *URA3* und *HIS3* durchgeführt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Zahl der durch Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen selektierten und auf Spezifität überprüften Transformanden

Köder	Selektierte Ko-Transformanden	Spezifische Ko-Transformanden
BD _{Gal4} -Xopl	594	50
BD _{Gal4} -Xopl _{ΔF-Box}	106	2

Die in den 52 spezifischen Hefe-Ko-Transformanden enthaltenen Plasmide wurden sequenziert und die Sequenzen mit veröffentlichten cDNA-Sequenzen von *S. lycopersicum* und *C. annuum* verglichen (www.solgenomics.net/blast). Da die Annotation der Genomsequenzen häufig keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion der entsprechenden Proteine *in planta* liefert, wurden ebenfalls *BLAST*-Analysen mit Hilfe der umfangreicheren Datenbank von *A. thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/Blast/>) durchgeführt (Sequenzabdeckung mind. 70%, Aminosäureidentität mind. 40%). Insgesamt wurden so 35 potentiell mit Xopl interagierende Proteine identifiziert (siehe Anhang 1). Aus Zeitgründen wurden zehn der Kandidaten ausgewählt und in voller Länge aus *C. annuum* oder *S. lycopersicum* kloniert (Tabelle 23). Von besonderem Interesse waren Proteine, für die mehrere Klone identifiziert wurden, deren *in planta*-Lokalisierung im Zellkern bzw. im Zytoplasma vorhergesagt wird bzw. die eine Rolle im Zuge der pflanzlichen Immunabwehr spielen.

Tabelle 23: Ausgewählte potentielle Interaktoren von BD_{Gal4}-Xopl oder BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box} aus *C. annuum*

Name	Homologie	Anzahl cDNA-Fragmente	DNA-Homologie ¹ [%]	Länge d. ORF ² [bp]
S/B3DP^{a,b}	Protein mit einer B3-Domäne (<i>S. lycopersicum</i>)	3	92	2499
S/TF_bHLH^a	Transkriptionsfaktor-ähnlich (<i>S. lycopersicum</i>)	2	71	715
S/STPK_HT1^a	Serin/Threonin-Proteinkinase, HT1-ähnlich (<i>S. lycopersicum</i>)	2	92	1239
S/ALP^a	ABC-Transporter-ähnliches Protein (<i>S. lycopersicum</i>)	1	88	810
S/ARF19^a	Auxin-abhängiger Faktor 19 (<i>S. lycopersicum</i>)	1	96	745
S/CaM5^a	Calmodulin 5 (<i>S. lycopersicum</i>)	1	94	450
CaAFP^a	Antifungales Protein (<i>C. annuum</i>)	1	96	258
S/ARC6^a	Hop1-interagierendes Protein THIOI (<i>S. lycopersicum</i>)	1	94	2483
CaCAT^a	Catalase (<i>C. annuum</i>)	1	94	774
S/ARIA^a	<i>ARM repeat protein interacting with ABF2</i> -ähnliches Protein (<i>S. lycopersicum</i>)	1	86	978

^a Interaktor von BD_{Gal4}-Xopl; ^b Interaktor von BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box}; ¹ Homologie zu Paprika- oder Tomaten-Genen von www.solgenomics.net; ² Länge des ORF basierend auf www.solgenomics.net; [S] - *S. lycopersicum*; [Ca] - *C. annuum*

3.3.1.5 Verifizierung der Interaktion von Xopl mit den Kandidaten-Proteinen in Hefe

Da bei der Erstellung der verwendeten Paprika-Bibliothek ca. 1.500 bp cDNA-Fragmente selektiert wurden, sollten die proteinkodierenden Gensequenzen der Kandidaten in voller Länge kloniert und auf Interaktion mit den Köderkonstrukten BD_{Gal4} -Xopl oder BD_{Gal4} -Xopl $_{\Delta F-Box}$ getestet werden. Die Amplifikation und Klonierung erfolgte von cDNA mit *Xcv* infizierter *C. annuum*-Blätter. War dies nicht möglich, wurde cDNA infizierter *S. lycopersicum*-Blätter verwendet. Auf diese Weise wurden die proteinkodierenden Sequenzen von *SIB3DP*, *SIALP*, *SICaM5*, *CaAFP*, *SIARC6* sowie *SIARIA* kloniert. Da die Klonierung von *TF_bHLH*, *STPK_HT1*, *ARF19* und *CAT* fehlschlug, wurden sie nicht weiter bearbeitet.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die mögliche Interaktion von Xopl mit Aktin untersucht, da ein Protein der Aktin-Familie (98% AS-Identität zu *NtAktin54*) mittels GFP-Trap-System als potentieller Interaktor identifiziert wurde (S. Mücke, Bachelorarbeit). *BLAST*-Analysen ergaben 29 Mitglieder der Aktin-Proteinfamilie in *S. lycopersicum* (Anhang 16), die mehrere konservierte Bereiche aufweisen. *SIAktin11* (Solyc06g076090.2) wurde für weitere Interaktionstests ausgewählt, da seine Aminosäuresequenz viele dieser konservierten Bereiche enthält und darüber hinaus 92% identisch zu *NtAktin54* ist.

Für alle klonierten potentiellen Interaktionspartner wurden Expressionskonstrukte erstellt, die eine N-terminale Fusion mit der AD_{Gal4} erlauben. *S. cerevisiae* $_{MaV103}$ - bzw. *S. cerevisiae* $_{PJ69-4A}$ -Zellen wurden mit Plasmid-DNA der Konstrukte für BD_{Gal4} -Xopl, BD_{Gal4} -Xopl $_{\Delta F-Box}$ oder BD_{Gal4} und sowie Plasmid-DNA je eines der AD_{Gal4} -Fusionskonstrukte der potentiellen Interaktoren ko-transformiert. Ein Konstrukt zur Synthese von BD_{Gal4} -Skp1 diente als Positivkontrolle. Je zwei Ko-Transformanden wurden auf Reporterogenaktivierung untersucht. Das Experiment wurde zweimal mit *S. cerevisiae* $_{MaV103}$ -Zellen (*URA3* Reporterogen) und einmal mit *S. cerevisiae* $_{PJ69-4A}$ -Zellen (*ADE2* Reporterogen) mit gleichen Ergebnissen durchgeführt. In allen Fällen interagierten BD_{Gal4} -Xopl und BD_{Gal4} -Xopl $_{\Delta F-Box}$ nur mit *SIARC6* (Abb. 18A). Die Daten deuten darauf hin, dass Xopl F-Box-unabhängig mit *SIARC6* interagiert. Für *SIAktin11*, *CaAFP*, *SIALP* und *SIARIA* wurde keine Interaktion mit Xopl beobachtet. Eine Aussage über die Interaktion von Xopl mit *SICaM5* und *SIB3DP* war nicht möglich, da keine Proteinsynthese detektierbar war (Abb. 18B).

Mit Hilfe eines BD_{Gal4} -spezifischen Antikörpers wurde die Synthese der Köder nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

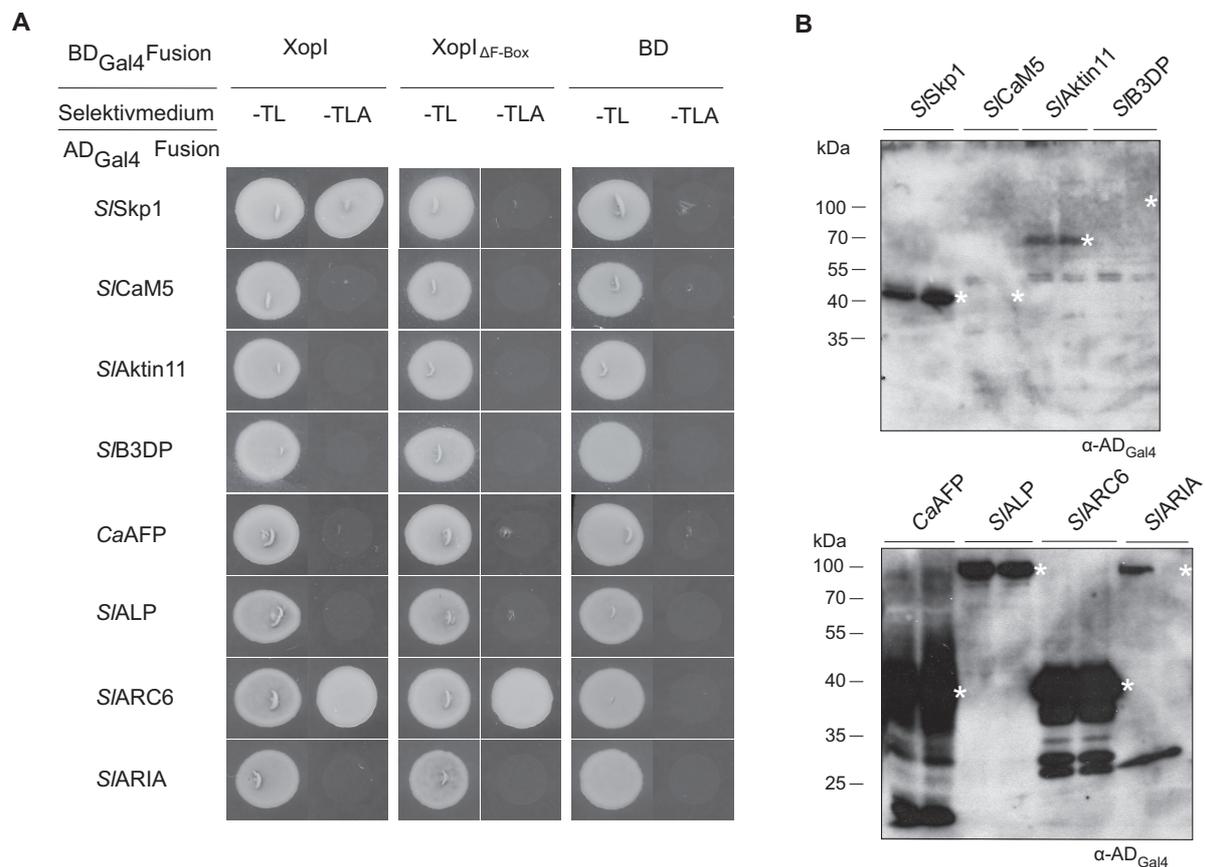


Abb. 18: Analyse der Interaktion von Xopl und den Kandidaten-Proteinen in Hefe

(A) Tropfentest zur Analyse der Interaktion von Xopl bzw. Xopl_{ΔF-Box} mit S/Skp1 (Kontrolle) bzw. den potentiellen Interaktionspartnern S/CaM5, S/Aktin11, S/B3DP, CaAFP, SIALP, S/ARC6 und S/ARIA. *S. cerevisiae*_{PJ69-4a}-Zellen wurden mit Plasmiden zur Synthese von BD_{Gal4}Xopl bzw. BD_{Gal4}Xopl_{ΔF-Box} oder BD_{Gal4} (Kontrolle) und verschiedenen AD_{Gal4}-Fusionsproteinen ko-transformiert und auf Selektivmedium ohne Tryptophan und Leucin (-TL, Kontrolle) bzw. Adenin-Selektivmedium (-TLA, Interaktion) getropft (OD₆₀₀ 1,0). Das Wachstum der Hefezellen wurde nach drei Tagen dokumentiert. (B) Immunoblot-Analysen mit AD_{Gal4}-spezifischen Antikörpern zum Nachweise der Fusionsproteine (*). Auszugsweise sind Immunoblots von je 1-2 Ko-Transformanden gezeigt, welche Plasmide zur Synthese je eines AD_{Gal4}-Interaktor-Konstruktes und BD_{Gal4}-Xopl beinhalten. Extrakte von Ko-Transformanden mit Expressionskonstrukten von BD_{Gal4}-Xopl_{ΔF-Box} bzw. BD_{Gal4} zeigten ähnliche Expressionssignale der AD_{Gal4}-Interaktor-Konstrukte. Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Ergebnisse wurden dreimal mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.

3.3.2 Lokalisierungsstudien der potentiellen Xopl-Interaktoren in *N. benthamiana*

Um zu untersuchen, ob Xopl die Lokalisierung der Kandidatenproteine in der Pflanzenzelle beeinflusst, wurde deren Lokalisierung *in planta* ohne und mit Ko-Expression von Xopl bestimmt. Dafür wurden C-terminale GFP-Fusionen von SIALP, S/ARC6, S/CaM5, S/Aktin11, S/ARIA, CaAFP und S/B3DP *Agrobacterium*_{GV3101}-vermittelt in *N. benthamiana*-Blättern synthetisiert. Ein Konstrukt für die Synthese von GFP diente als Kontrolle. Zur Ko-Expression mit *xopl*, wurden die *Agrobacterium*-Stämme im Verhältnis 1:1 mit einem Stamm gemischt, der die Expression von c-Myc₄-Xopl bzw. c-Myc₄-Xopl_{ΔF-Box} erlaubt. 24 hpi wurden Gewebeproben mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops untersucht (Abb. 19A). Die Synthese der Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot mit GFP- bzw. c-Myc-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 19B).

Wie die Abb. 19A zeigt, lokalisierten *S*Aktin11-GFP, *S*CaM5-GFP und GFP im Zellkern und im Zytoplasma von *N. benthamiana*-Zellen. *S*ALP-GFP und *S*ARIA lokalisierte neben dem Zellkern und Zytoplasma auch in Schließzellen von Spaltöffnungsapparaten. Die Synthese entsprechender Fusionsproteine wurde mittels Immunoblot nachgewiesen (Abb. 19B).

*S*ARC6-GFP lokalisierte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und ko-lokalisierte mit Chloroplasten von Epidermiszellen und Schließzellen von Spaltöffnungsapparaten (Abb. 19A). Obwohl *S*ARC6-GFP mittels Immunoblot nicht nachgewiesen wurde, kann daher vermutet werden, dass *S*ARC6-GFP tatsächlich in Chloroplasten lokalisiert, da GFP allein nicht in Chloroplasten lokalisierte.

Eine Aussage zur Lokalisierung von *S*B3DP-GFP und *Ca*AFP-GFP war nicht möglich, da deren Synthese mittels Immunoblot nicht nachweisbar war und keine GFP-Signale detektiert wurden.

Xopl lokalisiert im Zellkern und im Zytoplasma (174). Keines der untersuchten GFP-Fusionsproteine zeigte nach Ko-Expression mit c-Myc₄-Xopl bzw. Myc₄-Xopl_{ΔF-Box} eine veränderte Lokalisierung in *N. benthamiana*-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisierungsexperimente wurden zweimal mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.

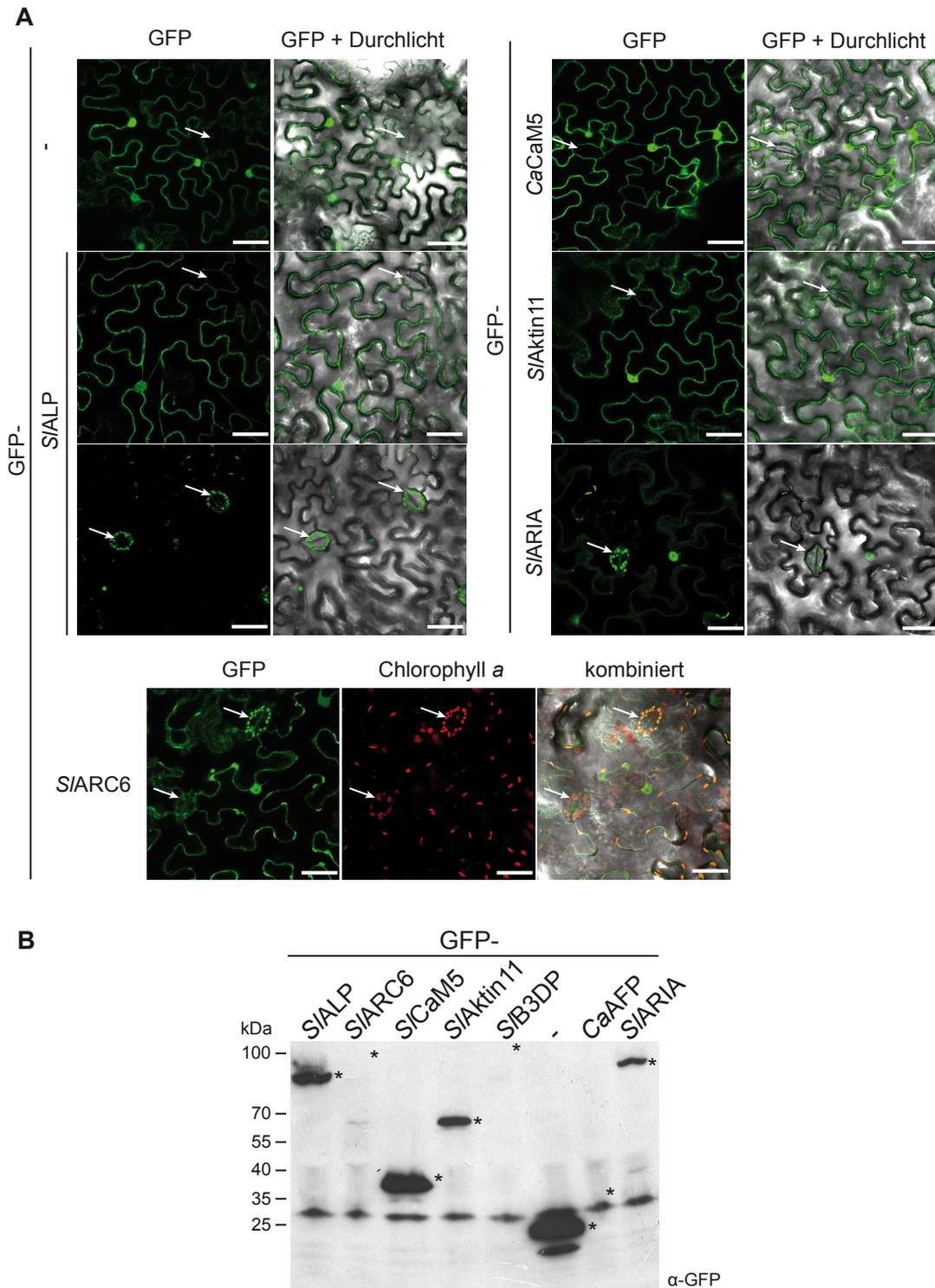


Abb. 19: Lokalisierungsstudien der potentiellen Xopl-Interaktoren in *N. benthamiana*

(A) Lokalisierung der potentiellen Interaktoren: SIALP, S/ARC6, S/CAm5, S/Aktin11, S/ARIA und S/B3DP wurden als C-terminale GFP-Fusionsproteine *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. 24 hpi wurde Blattmaterial mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops unter Verwendung spezifischer Filter für GFP und Chlorophyll-*a* mikroskopisch analysiert. Der Größenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μm . Spaltöffnungsapparate sind mit weißen Pfeilen markiert. **(B)** Immunoblot der unter (A) untersuchten GFP-Fusionsproteine mit Hilfe GFP-spezifischer Antikörper (24 hpi). Erwartete molekulare Massen sind mit einem Stern markiert und in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

3.3.3 Interaktionsstudien von Xopl mit potentiellen Xopl-Interaktoren mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) ist eine verbreitete Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Pflanzen. Potentiell interagierende Proteine werden mit dem N-terminalen (YFP_N, 155 AS) bzw. C-terminalen Teil (YFP_C, 88 AS) des gelb-fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*, YFP) fusioniert. Gelangen diese YFP-Teile bei Interaktion in räumliche Nähe, sind YFP-Fluoreszenzsignale mikroskopisch detektierbar. Hier wurden N-terminale YFP_N-Fusionen von Xopl bzw. Xopl_{ΔF-Box} *Agrobacterium*-vermittelt transient mit N-terminalen YFP_C-Fusionen von S/Skp1 (Kontrolle), S/CaM5, S/Aktin11, S/B3DP, CaAFP, SIALP, S/ARC6 und S/ARIA in *N. benthamiana*-Blättern ko-synthetisiert. YFP_N-Xopl_{ΔF-Box} wurde verwendet, um einen möglichen Abbau der YFP_C-Interaktor-Fusionen über das 26S Proteasom, auszuschließen. YFP_N-LaminC und YFP_C-LaminC sowie YFP_N-AvrBs3 und YFP_C-Importin-α dienten als Kontrollen. Ko-inokulierte Blattbereiche wurden nach vier Tagen mikroskopisch analysiert (Abb. 20A). Proben für Immunoblot-Analysen wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen. (Abb. 20B).

Wie in Abb. 20A dargestellt, interagierte YFP_C-CaSkp1, wie erwartet, mit YFP_N-Xopl, nicht aber mit YFP_N-Xopl_{ΔF-Box}. Dies diente als Kontrolle und als Möglichkeit, technisch bedingte Rauschsignale im YFP-Kanal des konfokalen Fluoreszenzmikroskops zu minimieren. Dafür wurde die Stärke der Anregung auf den Schwellenwert eingestellt, bei dem gerade keine Fluoreszenzsignale nach Ko-Expression von YFP_N-Xopl_{ΔF-Box} und YFP_C-S/Skp1 sichtbar waren.

Die Interaktionsstudien mittels BiFC bestätigen, dass YFP_N-Xopl und YFP_N-Xopl_{ΔF-Box} mit YFP_C-SIALP interagierten. Entsprechende Fluoreszenzsignale wurden interessanterweise ausschließlich in Schließzellen der Stomata beobachtet (Abb. 20A). Es ist allerdings unklar, ob es sich um eine direkte Interaktion handelt, oder ob ein bisher unbekannter Ko-Faktor benötigt wird, der möglicherweise nur in Schließzellen vorkommt.

Als Positivkontrolle wurde die Interaktion zwischen AvrBs3 und Importin-α im Zellkern beobachtet, obgleich die Synthese der Fusionsproteine mittels Immunoblot nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Als weitere Positivkontrolle wurde die Selbst-Interaktion von YFP_N-LaminC und YFP_C-LaminC im Zellkern und im Zytoplasma beobachtet. Weder YFP_N-Xopl noch YFP_N-Xopl_{ΔF-Box} zeigten hingegen eine Interaktion mit YFP_C-LaminC (Negativkontrolle).

Da nur die YFP_C-Fusionsproteine für SIALP, sowie der Kontrollen CaSkp1 und LaminC mittels Immunoblot detektierbar waren, war für die YFP_C-Fusionsproteine S/CaM5, S/Aktin11, S/B3DP, CaAFP, S/ARC6 und S/ARIA keine Aussage bzgl. der Interaktion mit YFP_N-Xopl bzw. YFP_N-Xopl_{ΔF-Box} möglich.

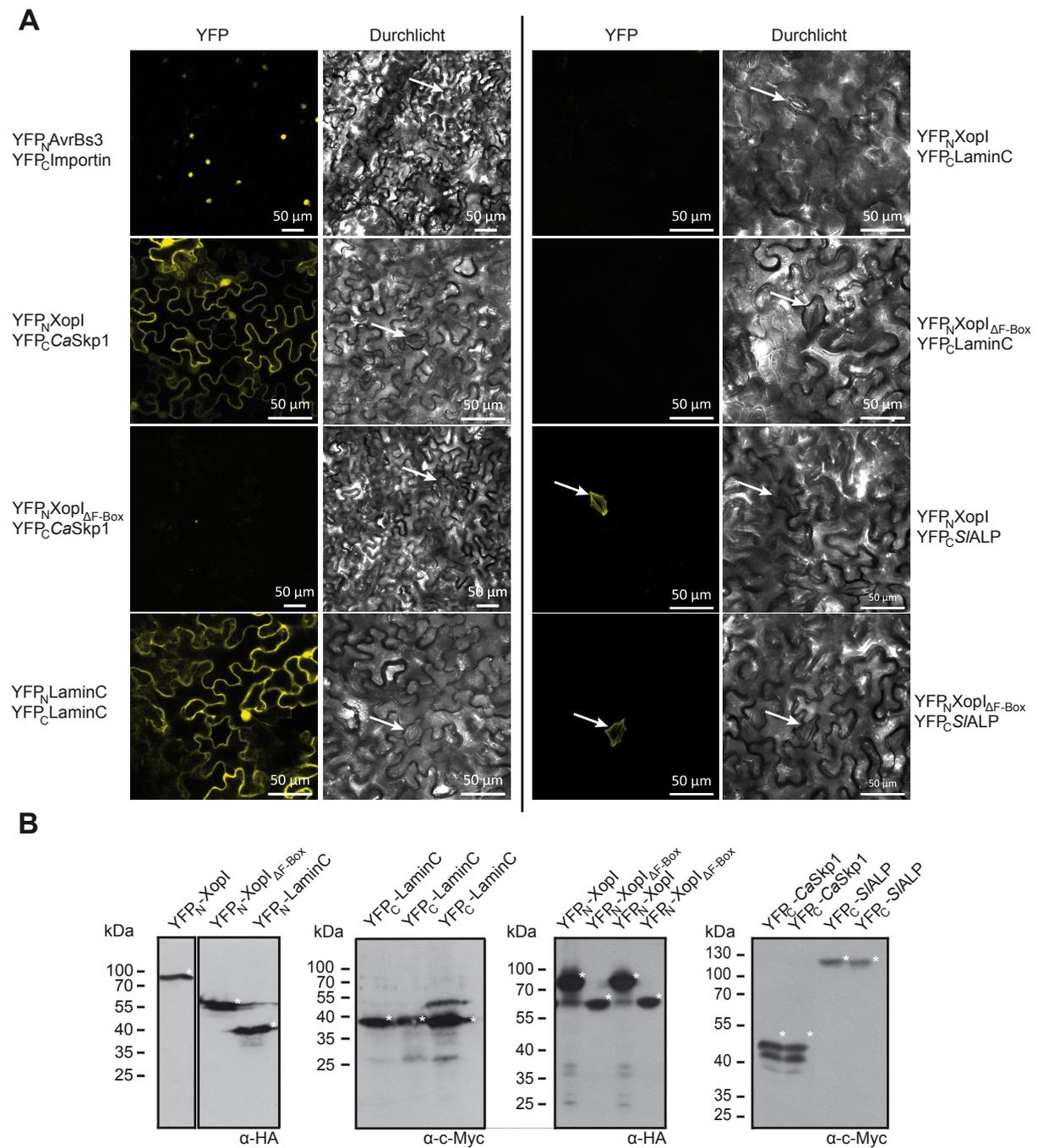


Abb. 20: Analyse der Interaktion von Xop1 mit potentiellen Interaktionspartnern mittels BiFC

(A) Mikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana*-Blättern vier *dpi* nach Ko-Transformation verschiedener N-terminaler Fusionskonstrukte mit dem N-terminalen (YFP_N) bzw. C-terminalen (YFP_C) Teil von YFP und dem *Silencing inhibitor* p19 (OD₆₀₀ je 0,4). Die bei Proteininteraktion emittierte YFP-Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines YFP-spezifischen Filters am konfokalen Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Als Kontrollen dienten sowohl die Interaktionen von AvrBs3 mit Importin- α , von Xop1 mit Skp1 und die Homodimerisierung von LaminC. Untersucht wurde die Interaktion von YFP_N-Xop1 bzw. YFP_N-Xop1 Δ F-Box mit YFP_C-SIALP. Untersuchtetes Pflanzengewebe ist anhand von Durchlichtaufnahmen gezeigt. (B) Immunoblot mit HA- und c-Myc₄-spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Fusionsproteine (*). Molekulare Massen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die BiFC-Analysen wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse aller Interaktions- und Lokalisierungsstudien, welche mit den potentiellen Xopl-Interaktoren durchgeführt wurden, zusammenfassend in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 Zusammenfassung der Lokalisierungs- und Interaktionsstudien potentieller Xopl-Interaktoren

Name	Klonierung	Interaktion in Hefe	Lokalisierung	Interaktion mittels BiFC
S/B3DP	<i>S. lycopersicum</i>	nicht detektierbar	nicht detektierbar	nicht detektierbar
S/TF_bHLH	nicht möglich	-	-	-
S/STPK_HT1	nicht möglich	-	-	-
SIALP	<i>S. lycopersicum</i>	keine Interaktion	Zellkern, Zytoplasma, Spaltöffnungsapparat	Interaktion mit Xopl und Xopl Δ F-Box
S/ARF19	nicht möglich	-	-	-
S/CaM5	<i>S. lycopersicum</i>	nicht detektierbar	Zellkern, Zytoplasma	nicht detektierbar
CaAFP	<i>C. annuum</i>	keine Interaktion	nicht detektierbar	nicht detektierbar
S/ARC6	<i>S. lycopersicum</i>	Interaktion mit Xopl und Xopl Δ F-Box	Zellkern, Zytoplasma, Spaltöffnungsapparat, Chloroplasten	nicht detektierbar
CaCAT	nicht möglich	-	-	-
S/ARIA	<i>S. lycopersicum</i>	keine Interaktion	Zellkern, Spaltöffnungsapparat	nicht detektierbar
S/Aktin11	<i>S. lycopersicum</i>	keine Interaktion	Zellkern, Zytoplasma	nicht detektierbar

3.3.4 Analyse des Einflusses von Xopl auf die Stomata-abhängige Pathogenabwehr von *S. lycopersicum*

Um den Einfluss von Xopl auf die Virulenz von *Xcv* zu untersuchen, wurden *xopl*-Deletionsmutanten in *Xcv* 85-10 erstellt (Abb. 21A) und drei unabhängige *xopl*-Deletionsmutanten in den Apoplasten von Paprika- und Tomaten-Blätter inokuliert. Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm und der T3SS-defiziente Stamm 85-10 Δ *hrcN*. Es wurde weder ein Einfluss von Xopl auf Krankheitssymptome in *C. annuum*-ECW- bzw. *S. lycopersicum*-Pflanzen, noch auf die Ausbildung einer HR in *C. annuum*-ECW-10R-Pflanzen beobachtet (12 *hpi* bis 3 *dpi*, Daten nicht gezeigt).

Wie oben beschrieben, wurde SIALP als ein möglicher Interaktionspartner von Xopl identifiziert. BLAST-Analysen zeigten eine Aminosäureidentität von 73% zu At1g64550 aus *A. thaliana*. T-DNA-Insertionslinien in At1g64550 von *A. thaliana* können die Stomata nach Infektion mit dem Coronatin-defizienten *Pst*-Stamm DC3118 nicht schließen (175). Um zu untersuchen, ob *Xcv* mit Hilfe durch Xopl oder andere T3E-Proteine die stomatale Immunität von Wirtspflanzen beeinflusst, wurden *Dipping*-Infektionsexperimente durchgeführt. Dafür wurden Blätter von *C. annuum* ECW-Pflanzen mit Bakterienlösungen von *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*, *Xcv* 85-10 Δ *xopl* bzw. *Xcv* 85-10 Δ *xopl*-pBRM(*xopl*) inkubiert. Die Ausbildung von Krankheitssymptomen wurde über zehn Tage dokumentiert, wobei keine Unterschiede nach Inokulation der unterschiedlichen *Xcv*-Stämme festzustellen waren (Daten nicht gezeigt).

Um einen Einfluss von *Xcv*-T3E auf Stomata während früher Zeitpunkte einer kompatiblen Interaktion zu untersuchen, wurden Stomata-assays in Anlehnung an ähnliche Experimente in *A. thaliana* (141) in *S. lycopersicum* durchgeführt (siehe 2.2.1.15). Dabei wurde der Einfluss von *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*, drei unabhängigen *xopI*-Deletionsmutanten sowie zwei unabhängigen *xopI*-Komplementationsstämmen auf die Apertur der Stomata untersucht. Mittelwerte der Aperturen jeder Probe von vier unabhängigen Experimenten wurden statistisch ausgewertet (Abb. 21C). Die Stomata zeigten 6 *hpi* mit *xopI*-Deletionsmutanten und auch für *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* signifikant kleinere Aperturen als Stomata nach Infektion mit *Xcv* 85-10. Die ektopische Expression von *xopI* komplementierte den *xopI*-Deletionsphänotypen. Dies bedeutet, dass von allen T3E-Proteinen des Stamms *Xcv* 85-10 vermutlich nur *XopI* die Stomatabewegung beeinflusst.

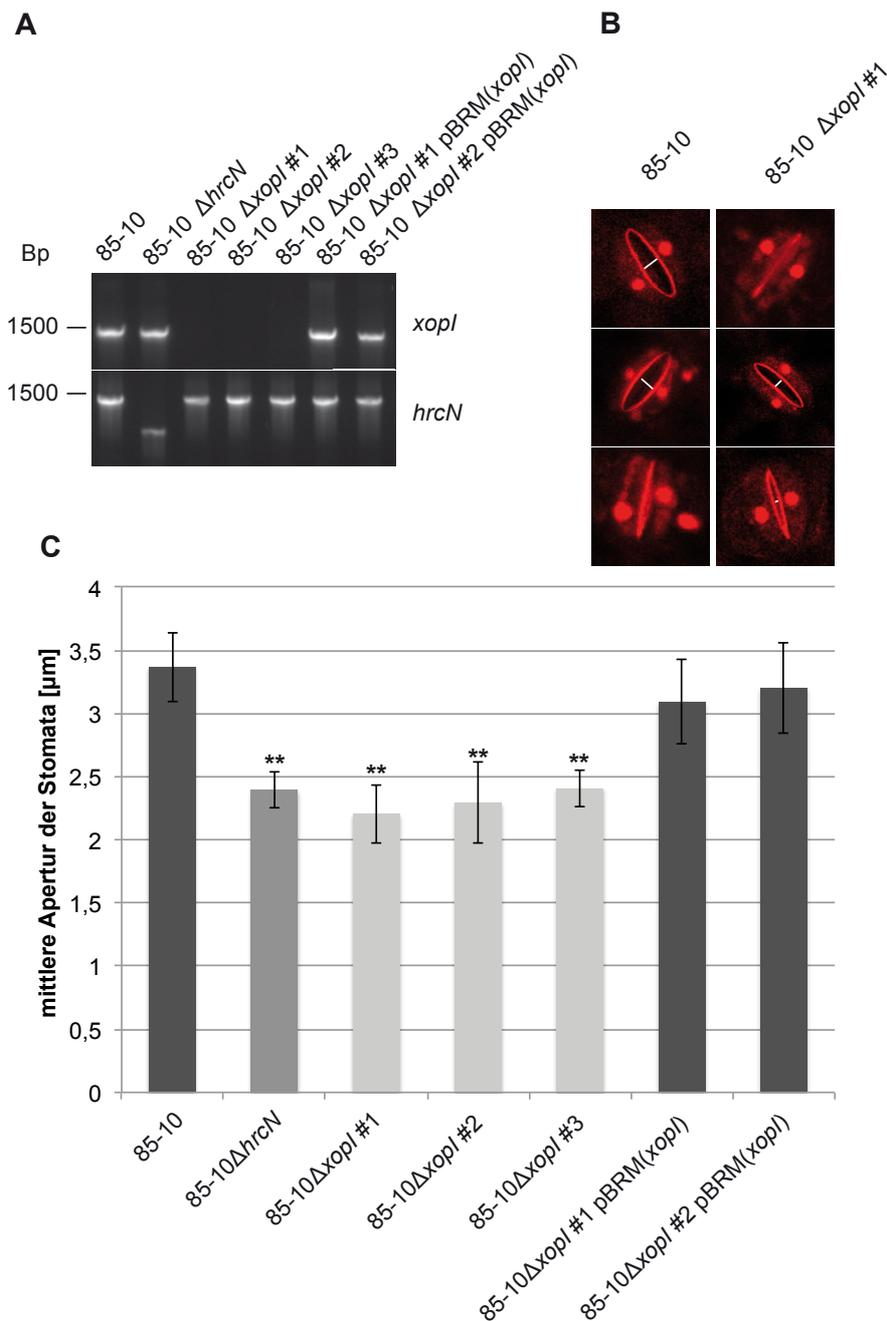


Abb. 21: Xopl beeinflusst die Apertur der Stomata von *S. lycopersicum*

(A) Kolonie-PCR zur Überprüfung der erstellten *xopl*-Deletionsmutanten bzw. *xopl*-Komplementationsstämmen. Mit Hilfe von *xopl*- bzw. *hrcN*-spezifischen Oligonukleotiden wurden Deletionen der für *xopl* oder *hrcN* kodierenden Regionen in *Xcv*-Deletionsstämmen bzw. die Plasmid-basierte Expression von *xopl* in Komplementationsstämmen überprüft. (B) Blattscheiben von *S. lycopersicum*-Blättern wurden zur Visualisierung der Stomata mit einer Propidiumiodid-Lösung gefärbt und anschließend in *Xcv*-Lösungen (OD₆₀₀ 0,3) im Dunkeln unter Gewächshausbedingungen inkubiert. Aperturen einzelner Stomata (weißer Balken) wurden anhand von mikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops vermessen (C) Analyse von Aperturen der Stomata während der Infektion von *S. lycopersicum* mit den *Xcv*-Stämmen 85-10, 85-10 Δ *hrcN*, drei unabhängigen *xopl*-Deletionsmutanten (85-10 Δ *xopl* #1, #2 bzw. #3) und Komplementationsstämmen von zwei der *xopl*-Deletionsmutanten (85-10 Δ *xopl*-pBRM(*xopl*) #1 bzw. #2). Dargestellt sind mittlere Aperturen aus vier unabhängigen Experimenten. Für jedes Experiment wurden je 60 Stomata vermessen. Die Daten wurden anhand von Studentischen t-Tests statistisch analysiert (* entspricht $p < 0,01$).

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Xcv beeinflusst das Transkriptom von *S. lycopersicum*

4.1.1 Kritische Betrachtung der erhobenen Transkriptomdaten

Die *S. lycopersicum* Transkriptom-Analysen erfolgten nach Infektion mit *Xcv* 85-10 (WT) bzw. dem T3SS-defizienten Stamm 85-10 Δ *hrcN*, sowie nach Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* bzw. der Infiltration mit MgCl₂. Die *Microarray*-Daten zeigen, dass von den 34.383 annotierten *S. lycopersicum*-Genen 2.035 Gene *Xcv*-T3E-abhängig differentiell exprimiert wurden. Dagegen waren 2.856 Gene während der Abwehr gegen den nicht-pathogenen *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* reguliert, welche der Einfachheit halber als potentielle Abwehrgene bezeichnet werden. Um differentiell exprimierte Gene zu verifizieren, wurden die Transkriptmengen ausgewählter Gene, welche sowohl T3E-abhängig differentiell exprimiert wurden und als potentielle Abwehrgene gelten, anhand unabhängiger RNA-Proben mittels qRT-PCR analysiert. Da die *Microarray*-Daten dieser Gene mittels qRT-PCR-Analysen mit gleicher Tendenz reproduziert werden konnten (Tabelle 9), ist anzunehmen, dass differentiell exprimierte *S. lycopersicum*-Gene anhand der Signifikanzfilter (2.2.3.3) verlässlich bestimmt wurden. Die Transkriptabundanz zu untersuchender Gene ist ein sowohl für *Microarray*-, als auch für qRT-PCR-Analysen limitierender Faktor. Wird ein Grenzwert unterschritten, ist eine korrekte Transkriptmengenbestimmung unmöglich. Da die vorliegenden Daten jedoch zeigen, dass auch *fold changes* regulierter *S. lycopersicum*-Gene mit geringen Transkriptmengen (Signalintensität < 30) mittels qRT-PCR quantifizierbar waren (Tabelle 9; z.B. *PUB24* und *CYTP450*), war ein Ausschluss von Genen mit geringen Transkriptmengen nicht notwendig. Allerdings ist zu beachten, dass nur ein Teil der Pflanzenzellen in den infizierten Blattbereichen tatsächlich infiziert wird. Es ist daher wahrscheinlich, dass die wirklichen Transkriptmengenänderungen bezogen auf infizierte *S. lycopersicum*-Zellen höher sind. Zudem ist es möglich, dass Gene mit Änderungen der Transkriptmenge unterhalb der Signifikanzschwelle ($lfc < +/- 1$) biologisch relevant sein könnten.

Da im *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* das Gen für die zur Assemblierung des T3SS essentiellen ATPase deletiert ist (47), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Bakterien dieses Stammes Oberflächenproteine fehlen, die im Falle des WT-Stamms eine pflanzliche Abwehrreaktion auslösen. Zudem ist nicht bekannt, ob der WT-Stamm, anders als 85-10 Δ *hrcN*, 45 Minuten nach der Infektion Komponenten des T3SS sekretiert, welche die Basalabwehr induzieren könnten, z.B. das Pilusprotein HrpE. Daher wurde dies bei der

Auswertung der *Microarray*-Daten nicht berücksichtigt, und differentiell exprimierte Gene werden als *Xcv*-T3E-abhängig reguliert bezeichnet. Möglicherweise ist für weitere Studien der *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrpF*, der aufgrund der Deletion des Translokoproteins HrpF keine T3E-Proteine transloziert (176), als Kontrolle besser geeignet.

Um *S. lycopersicum*-Gene zu identifizieren, die durch einzelne *Xcv*-T3E-Proteine in ihrer Transkriptmenge verändert werden, wurden Transkriptomanalysen nach *Agrobacterium*-vermittelter transientser Synthese N-terminaler GFP-Effektor-Fusionsproteinen durchgeführt. Da bekannt ist, dass AvrBs3 die Genexpression von *UPA20* in *C. annuum* und *S. lycopersicum* induziert (85), wurde AvrBs3 als Kontrolle mitgeführt. Die beobachtete Induktion von zwei *UPA20*-ähnlichen Genen (Tabelle 14) bestätigt, dass signifikant T3E-abhängig regulierte Gene identifiziert wurden. Um die Daten experimentell zu verifizieren, wurden exemplarisch die Transkriptmengen einiger XopL-abhängig regulierter Gene mittels qRT-PCR in unabhängigen RNA-Proben untersucht. Aufgrund hoher Standardabweichungen zwischen den einzelnen Infektionsexperimenten konnte jedoch nur für fünf der neun Gene eine XopL-abhängige Regulation bestätigt werden (Abb. 8). Hohe Standardabweichungen könnten ein Zeichen für schwankende Transformationseffizienz sein, welche u.a. durch die Stärke der pflanzlichen *PTI*-Antwort beeinflusst wird (177,178). Andererseits sind während der *PTI* induzierte Abwehrgene wahrscheinlich Ziele von *Xcv*-T3E. Beispielsweise unterdrücken XopB und XopS die Induktion des *PTI*-Markergens *AtNHL10* (119). Die *Microarray*-Daten zeigen, dass die Transkriptmenge von *SINHL10* (Solyc10g081980) sowohl 6, 10 und 24 *hpi* T3SS-abhängig vermindert war, nach der *Agrobacterium*-vermittelten Synthese von GFP-XopB- oder -XopS war jedoch keine Veränderung der Transkriptmenge von *SINHL10* nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass der verwendete *Agrobacterium*-Stamm GV2260 schwache *PTI*-Reaktionen in *S. lycopersicum* auslöst und Effekte einzelner T3E auf *PTI*-induzierte Gene nicht beobachtet werden konnten. Da Transkriptmengen von *PTI*-Genen durch T3E eher reduziert werden werden (81), wäre dies eine Erklärung dafür, dass nach *Agrobacterium*-vermittelter Synthese der Effektorstrukturen nur wenige negativ regulierte Gene detektiert wurden (Tabelle 13).

Nach transientser Synthese von GFP-XopB, -XopG, -XopI und -XopQ wurden nur wenige differentiell exprimierte Gene identifiziert, deren biologische Funktion zudem meist unbekannt ist (Tabelle 17). Da nicht erkennbar ist, ob diese Effektoren unter den experimentellen Bedingungen nur geringen Einfluss auf das pflanzliche Transkriptom haben, oder dies aufgrund schwacher *PTI*-Induktion nicht bestimmbar war, wird auf eine Diskussion dieser Daten verzichtet. Zudem ist zu bemerken, dass GFP-XopG und -XopI in *S. lycopersicum*-Blättern *Agrobacterium*-vermittelt schwach synthetisiert waren. In weiteren Studien könnte der Einfluss einzelner *Xcv*-T3E auf die Transkriptmenge pflanzlicher Gene möglicherweise durch Infektionsstudien mit in diesen T3E-Genen deletierten *Xcv*-Stämmen analysiert werden.

4.1.2 *Xcv*-T3E-Proteine supprimieren die Immunantwort von *S. lycopersicum*

Blätter von *S. lycopersicum* wurden mittels Transkriptomstudien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 und 85-10 Δ *hrcN* untersucht. Dabei zeigten die Proben 16 bzw. 24 *hpi* mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* ein deutlich verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu Proben direkt nach der Infektion (Abb. 3A und B). Zudem unterschieden sich die Expressionsmuster 24 *hpi* mit dem WT und 85-10 Δ *hrcN* (Abb. 3A), d.h. *Xcv*-T3E verändern pflanzliche Abwehrprozesse. Dies wurde auch in mit *Pst* infizierten *A. thaliana*-Blättern gefunden (81,179). Interessanterweise waren die Expressionsmuster von *S. lycopersicum* sowohl 45 *mpi* mit dem WT bzw. 85-10 Δ *hrcN* als auch 24 *hpi* mit dem WT sehr ähnlich (Abb. 3A). Dies legt nahe, dass *Xcv* mit Hilfe translozierter T3Es pflanzliche Abwehrprozesse (zumindest auf Transkriptebene) innerhalb von 24 Stunden supprimiert.

In den *Microarray*-Studien wurden nach der Infektion mit dem T3SS-defizienten Stamm *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* 2.856 potentielle Abwehrgene von *S. lycopersicum* identifiziert, von denen insgesamt 1.105 (38%) T3E-abhängig invers reguliert wurden (Abb. 5). Insgesamt sind 54% der 2.035 T3E-abhängig differentiell exprimierten *S. lycopersicum*-Gene potentielle Abwehrgene. Dies zeigt, dass durch die Aktivität von *Xcv*-T3E-Proteinen in der kompatiblen Interaktion mit *S. lycopersicum* die Transkriptmenge essentieller Abwehrgene vermindert und damit *ETS* vermittelt wird, wie es bereits z.B. für *Pst*-T3E während der Interaktion mit *A. thaliana* beobachtet wurde (81,180). Beispielsweise ist die Aktivierung von *AtMPK3* und *AtMPK6* ein essentieller Teil der *PAMP*-induzierten *MAPK*-Kaskade, welche nach *Pst* DC3000-Perzeption über die Akkumulation von *AtWRKY6*-Transkripten weiterführende Abwehrreaktionen auslösen und zu Zelltodreaktionen führen (181). Die *Pst*-T3E *AvrPto* und *AvrPtoB* tragen bei der kompatiblen Interaktion mit *A. thaliana* wesentlich dazu bei, die *PTI* zu unterdrücken und *ETS* zu vermitteln (182). Die in dieser Arbeit erhaltenen Transkriptomdaten zeigen, dass die Transkriptmenge der Orthologen *SIMP3* und *SIMP6* bereits 6 *hpi* *Xcv*-T3E-abhängig vermindert war (Tabelle 11). Zudem waren *SIMP3/6* nachgeschaltete Gene, wie *SIWRKY6*, ebenfalls negativ reguliert, wodurch zu vermuten ist, dass bisher unbekannte *Xcv*-T3E *MPK3/6*-Signalwege inhibieren. Solche komplexen Signalkaskaden lassen zudem vermuten, dass eine frühzeitige Regulation der Transkriptmenge einzelner *S. lycopersicum*-Gene durch *Xcv*-T3Es die Transkriptmenge einer Vielzahl nachgeschalteter Gene beeinflusst, was die während der Infektion ansteigende Zahl regulierter Gene (Abb. 4) erklärt.

4.1.3 *Xcv*-T3E-abhängig regulierte Gene sind oft Teil pflanzlicher Hormonsignalwege

Die Überwindung der basalen Abwehr ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion der Pflanze. Die Induktion der Basalabwehr geht einher mit dem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration

in Zellkern und Zytoplasma, der reversiblen Proteinphosphorylierung, der Regulation von Transkriptionsfaktoren, Änderungen in der Aktivität von Membranproteinen wie Rezeptoren, sowie der Produktion von reaktiven NO- bzw. Sauerstoffspezies (183). Viele dieser Abwehrmechanismen werden durch Phytohormone (wie SA, JA, Eth sowie ABA) beeinflusst (26), wobei, stark vereinfacht, SA hauptsächlich die Immunantwort gegen bakterielle, JA gegen fungale Pathogene vermittelt. Eth und ABA dienen der Feinabstimmung hormoneller Abwehrreaktionen (184). Die hier erhobenen Transkriptomdaten bestätigen, dass im Zuge der *PTI* von *S. lycopersicum* die SA- und Eth-Antwort induziert und die ABA- und JA-Antwort gehemmt wird. Die Infektion mit dem *Xcv*-WT hemmt hingegen durch eine T3E-abhängige inverse Regulation der Phytohormon-Antwort die Basalabwehr (Tabelle 10).

Essentiell für phytohormon-gesteuerte Abwehrprozesse sind oft WRKY-Transkriptionsfaktoren (185), die gute Markergene für Phytohormonsignalwege darstellen. Die vorliegenden Transkriptomdaten zeigen, dass 23 WRKY-Transkriptionsfaktoren T3E-abhängig negativ reguliert waren. Die Transkriptmengen von 12 der 23 WRKY-Gene waren in der Immunantwort gegen *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* erhöht, z.B. *SIWRKY70*, *SIWRKY50*, *SIWRKY41*, und *SIWRKY53*, deren Orthologe in *A. thaliana* in SA-Signalwege involviert sind (186-189). Neben WRKY-Transkriptionsfaktoren legt insbesondere die *Xcv*-T3E-abhängige negative Regulation von *SICAF1a*, das für einen Regulator des mRNA-Degradations-Komplexes CCR4-CAF1-NOT kodiert (190), eine persistente Unterdrückung der SA-Antwort nahe. *Knock-out*-Mutanten von *AtCAF1a* zeigten verminderte SA-abhängige Expression von PR-Genen bei Pathogenbefall (191,192). Da zudem die Transkriptmenge einiger Gene mit Homologie zu für die SA-Synthese essentiellen Phenylammoniumlyasen (193) vermindert war (*SIPAL1-4*), kann vermutet werden, dass T3E ebenfalls die SA-Biosynthese hemmen. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptions-Repressor XopD aus *Xcv*-WT, durch dessen Aktivität SA-Konzentrationen *in planta* vermindert werden (194). SA-Signalwege werden vermutlich zusätzlich unterdrückt, indem zu SA antagonistisch wirkende JA-Signalwege gefördert werden, bspw. durch T3E-abhängige negative Regulation der JA-Repressoren *SIWRKY40* und *SIJAZ*, ähnlich wie während fungaler Infektionen von *A. thaliana* (184,195). Dem gegenüber steht die persistente T3E-abhängige Verminderung der Transkriptmenge von *SIWRKY33*, der einen essentiellen Regulator der SA-JA-Homöostase kodiert. *Knock-out*-Mutanten von *AtWRKY33* zeigten erhöhte Expression SA-abhängig regulierter PR-Gene und eine abgeschwächte JA-Antwort (196). Zudem war die Transkriptmenge des für die JA-Biosynthese essentiellen Transkriptionsfaktors *SIORA47* sowie des positiven JA-Regulators *SIERF5* (184,197,198) T3E-abhängig vermindert, was Suppression der JA-Signalwege hinweist. Insgesamt legen die Daten nahe, dass die Quervernetzung von SA- und JA-Signalwegen in *S. lycopersicum* einer komplexen T3E-abhängigen Modulation unterliegt, die bisher unverstanden ist.

Auch andere phytopathogene Bakterien beeinflussen die pflanzliche SA-Antwort, bspw. *Pst* mit Hilfe des JA-Ile-ähnlichen Phytotoxins Coronatin, welches vom JA-Rezeptor erkannt wird und die SA-Biosynthese hemmt (199). Zur SA-Antwort antagonistische Hormonsignalwege werden bspw. durch *PstAvrPtoB* oder *PstAvrRpt2* aktiviert: *PstAvrPtoB* stimuliert die ABA-Synthese (200), wohingegen *PstAvrRpt2* erhöhte AUX-Konzentrationen *in planta* verursacht (201). Andere T3E supprimieren die SA-Biosynthese, bspw. lokalisiert *PstHop11* in Chloroplasten und hemmt hier über Bindung an HSP70 die SA-Akkumulation (72). Da die vorliegenden Transkriptomdaten zeigen, dass *Xcv*-T3E-Proteine sowohl die SA-Biosynthese unterdrücken als auch antagonistische Hormonsignalwege aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass neben *XopD* andere *Xcv*-T3E die SA-Antwort von *S. lycopersicum* beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass *Xcv*-T3E-Proteine auch Eth-Signalwege beeinflussen, welche mit SA-, JA- und ABA-Signalwegen vernetzt sind und die Feinabstimmung hormonbasierter Abwehrreaktionen modulieren (184). Insgesamt wurden 21 Eth-responsive Transkriptionsfaktoren (ERF) T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge vermindert, wovon elf als potentielle Abwehrgene identifiziert wurden. Dazu zählen *SIERF104* und *SIERF105*, deren Orthologe in *A. thaliana* MKP6-abhängig an der *PTI* beteiligt sind (202). Zudem war die Transkriptmenge von *SIERF14* T3E-abhängig vermindert. *AtERF14* ist ein wichtiger positiver Regulator der Eth-Antwort gegen *Pst*, aber auch fungale Pathogene, und reguliert die Expression von *AtERF1* und *AtERF2*, zwei essentiellen Regulatoren von PR-Genen (203). Orthologe Gene aus *S. lycopersicum*, *SIERF1A*, *SIERF1B* und *SIERF2* waren ebenfalls T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge vermindert. Die Transkriptomdaten zeigen zudem, dass die Transkriptmenge von *SIERF4* T3E-abhängig vermindert war, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Desumoylierung von *SIERF4* durch *XopD* zurückzuführen ist, wodurch die Transkript- und Proteinstabilität verringert wird (204). Reduzierte *SIERF4*-Proteinmengen hemmen die Transkription der zur Eth-Synthese essentiellen ACC-Oxidasen *SIACO1* und *SIACO2* sowie der ACC-Synthase *SIACS2* (204), was die Transkriptomdaten bestätigen (Tabelle 10).

Die Transkriptomdaten weisen auch darauf hin, dass *Xcv*-T3E ABA-Signalwege beeinflussen (Tabelle 10). Während früher Phasen bakterieller Infektionen (bspw. von *A. thaliana* durch *Pst*) wird die Apertur von Stomata ABA-vermittelt verringert, um das Eindringen von Bakterien zu verhindern, wohingegen in späteren Infektionsphasen Kalloseablagerungen und die SA-Antwort ABA-abhängig gehemmt werden (205). *AtPYL4* ist ein ABA-Rezeptor in Schließzellen (206), wohingegen *AtABCG40* die ABA-Aufnahme in Schließzellen vermittelt (207). Orthologe Gene in Tomate waren ab 10 *hpi* T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge vermindert (Tabelle 10), was vermuten lässt, dass T3E sowohl die ABA-Perzeption, als auch -Aufnahme in Schließzellen unterdrücken. Im Gegensatz dazu waren die Transkriptmengen des ABA-Rezeptors *SIABAR* und der für die ABA-Synthese essentiellen Gene *SIABA1* und *SIABA2* (205) 24 *hpi* T3E-abhängig erhöht. Zudem deutet die T3E-abhängige negative

Regulation von *SIWRKY40* und *SIWRKY41* sowohl auf eine Unterdrückung der SA-Antwort, aber auch positive Regulation von ABA-Signalwegen hin, was bereits für das *Pst-A. thaliana*-Pathosystem beschrieben wurde (185,208). Zusammen deuten die Daten darauf hin, dass zu frühen Infektionszeitpunkten *Xcv*-T3E-abhängig die stomatale Immunität unterdrückt wird, während zu späteren Infektionszeitpunkten die Aktivierung von ABA-Signalwegen und die ABA-Synthese im Vordergrund steht. Dies stimmt damit überein, dass T3E anderer Pathogene durch eine positive Regulation von ABA-Signalwegen die Suszeptibilität der Wirtspflanze erhöhen. Beispielsweise begünstigt das *AvrXccC* aus *Xcc* in *A. thaliana* die Akkumulation von ABA (209). Aus *Pst* ist dagegen bekannt, dass die T3Es *AvrPtoB* und *HopM1* die ABA-Signalwege von *A. thaliana* modulieren und so osmotisch günstige Bedingungen für bakterielles Wachstum schaffen (210).

Die hier erhaltenen *Microarray*-Daten lassen vermuten, dass *XopL* möglicherweise ABA-Signalwege beeinflusst (Tabelle 15). *XopL*-spezifisch war die Transkriptmenge des Gens mit Homologie zu *AtCYP74A* erhöht, einem negativen Regulator der SA-Synthese sowie positiven Regulator von ABA-Signalwegen (211). Zudem induzierte *XopL* ein zum ABA-Transporter *AtABCG40* (207) orthologes Gen. In weiterführenden Studien könnten Hormonmessungen von *S. lycopersicum* nach transienter Expression von GFP bzw. GFP-*XopL* durchgeführt werden.

4.1.4 *Xcv*-T3E hemmen pflanzliche Signalwege der *PTI*

Allen pflanzlichen Abwehrmechanismen geht die Integration von Umweltsignalen voraus. Der Perzeption von Pathogenen folgt die Signaltransduktion, wobei eine Vielzahl von Proteinkinasen und Phosphatasen an der Induktion der *PTI*- oder *ETI* beteiligt sind. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Proteinkinasen mit 243 regulierten *S. lycopersicum*-Genen stark von *Xcv*-T3E beeinflusst waren, wobei 179 (74%) dieser Proteinkinasen als potentielle Abwehrgene identifiziert wurden. Da 178 (73%) Proteinkinasen bereits 6 und/oder 10 *hpi* T3E-abhängig reguliert waren, kann vermutet werden, dass *Xcv*-T3E zu möglichst frühen Infektionszeitpunkten pflanzliche Signalwege beeinflusst.

Für die *PAMP*-Perzeption sind membranständige Rezeptorproteine (*PRR*) essentiell, welche, wie *AtFLS2* nach *Pst*-Infektion, häufig nach Perzeption endozytiert und degradiert werden (212). Werden *AtFLS2*-abhängig SA- und Eth-Immunantworten aktiviert, wird über positive *feedback loops* die Transkript- und damit Proteinmenge von *AtFLS2* erhöht und somit die *PAMP*-Antwort verstärkt (213). Da die vorliegenden Transkriptomdaten zeigen, dass 176 der 243 *Xcv*-T3E-abhängig regulierten Kinasen von *S. lycopersicum* laut Annotation (ITAG2.4, Stand Oktober 2015) Rezeptor-ähnlich sind, wird die Perzeption von (bisher unbekannt) *PAMPs* *Xcv*-T3E-abhängig vermutlich direkt oder indirekt durch Abschwächung der SA- und Eth-Immunantwort modelliert. Gut untersuchte *PRR* sind *AtFLS2*, *AtEFR* bzw. *AtCERK1*, die

bakterielles Flagellin, EF-Tu bzw. Peptidoglykan aus *Pst* perzipieren (213,214). Neuere Studien gehen davon aus, dass bakterielle *PAMPs* wie Peptidoglykan auch vom Chitin-Rezeptor *AtLYK4* perzipiert werden können (215) und auch die bei bakterieller Lyse der Zellwand entstehende Oligogalakturonsäure (OG) durch *DAMP*-Rezeptoren wie bspw. *AtWAK1* und *AtWAK2* die *PTI* auslösen (216). *AtWAK2* löst durch Phosphorylierung von *AtMPK6* eine Vielzahl pflanzlicher Abwehrmechanismen aus (217), *AtWAK1* hingegen fördert über Komplexbildung mit *AtKAPP* die *ROS*-Bildung (218). Da die Transkriptmengen der in *S. lycopersicum* orthologen Gene *SIFLS2*, *SIEFR*, *SICERK1*, *SIWAK1*, *SIWAK2* und *AtLYK4* sowohl während der Immunantwort gegen *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* induziert, als auch *Xcv*-T3E-abhängig vermindert waren, ist zu vermuten, dass in Tomate über positive *feedback loops*, ähnlich wie in *A. thaliana*, die Proteinmenge dieser Rezeptoren erhöht wird, *Xcv*-T3Es dies aber unterdrücken. Darüber hinaus deuten die Daten an, dass aus anderen Pathosystemen bekannte *PAMP*- und *DAMP*-Rezeptoren, auch im *Xcv*-Tomate-Pathosystem in die *PTI* involviert sind, obwohl für *Xcv* bisher keine *PAMPs* beschrieben wurden. Für *Xac* wurde hingegen beschrieben, dass der Rezeptor *AtRLP1* das proteinogene *PAMP* eMax aus Sekretionsüberständen perzipiert (219). *AtRLP1* weist Homologie zu *SIEIX2* auf, einem Rezeptor für fungale Xylanasen (219). Da interessanterweise die Transkriptmengen von *SIRLP1* und *SIEIX2* sowohl *Xcv*-T3E-abhängig vermindert, als auch während der Basalabwehr induziert waren, werden vermutlich sowohl eMax, als auch *Xcv*-Xylanasen wie möglicherweise *XynC* (101) im *Xcv*-Tomate-Pathosystem durch *SIRLP1* bzw. *SIEIX2* erkannt, was T3E-abhängig unterdrückt wird. Darüber hinaus lassen die Daten vermuten, dass *SWAK1* und *SWAK2* an der *DAMP*-Perzeption nach Zellwandabbau durch bspw. T2SS-abhängig sekretierte Enzyme von *Xcv* (220) beteiligt sind.

Neben Rezeptorkinasen waren auch die Transkriptmengen einiger nachgeschalteter Proteinkinasen *Xcv*-T3E-abhängig vermindert (Tabelle 11). Der Abfolge im jeweiligen Signalweg folgend zählen dazu neben *SIBIR1*, einem positiven Regulator FLS2-abhängiger *PTI*-Reaktionen (17), einige zur Signalweiterleitung essentielle *MAP*-Kinasen wie *MAPKKK5*, *SIMAPKKK15*, *SIMAPKKK18*, *SIMAPKKK19*, *SIMAPKKK21*, *SIMPK3* sowie *SIMPK6*. Zu diesen *MAP*-Kinasen orthologe Gene aus *A. thaliana* sind maßgeblich an der *PTI* und *ETI* beteiligt, bspw. über *ROS*-Bildung, die Alkalisierung des Apoplasten, Expression von PR-Genen, Aktivierung von *CDPKs*, Transkriptionsfaktoren und Hormonsignalwegen (221). An der Pathogenperzeption sind häufig auch *ACRE*-Gene (*Avr9/Cf9-rapid elicited proteins*) aus *S. lycopersicum* und *N. tabacum* beteiligt, die oft für Signalwegkomponenten kodieren bspw. *MAPKs* bzw. *CDPKs* aktivieren (222,223). Die hier erhaltenen Transkriptomdaten zeigen, dass *Xcv*-T3E die Transkriptmenge von *ACRE-65*, *ACRE-180* sowie sieben weiterer *ACRE*-ähnlicher Gene negativ beeinflussen.

Die Transkriptomdaten bestätigen die Bedeutung von *MAPK*-abhängigen Signalwegen für das *Xcv*-Tomate-Pathosystem und vermitteln, dass *Xcv* eine Vielzahl von Strategien

entwickelt hat, diese zu unterdrücken. Diese Unterdrückung durch T3Es erfolgt wahrscheinlich auf Proteinebene aber auch sowohl indirekt über *feedback loops*, als auch direkt auf Transkriptebeine, wie bereits für XopD beschrieben (4.1.3). Ein Beispiel für einen direkten Einfluss auf Transkriptmengen von Immunrezeptoren aus *A. thaliana* zeigt die Interaktion von *PstHopU1* mit dem RNA-bindenden Protein *AtGRP7*, wodurch die Bindung von *AtFLS2*-Transkripten verhindert wird (224). Ein Beispiel für einen Einfluss von Xcv-T3E auf Proteinebene von Signalwegkomponenten ist die Interaktion von XopN mit der Rezeptor-ähnlichen Kinase *S/TARK1* und *S/TFT1*, wodurch die *PTI* inhibiert wird (155,167). Aus *A. thaliana* ist bekannt, dass *PstHopAl1* bzw. *PstAvrPto* mit *AtMPK4* bzw. *AtFLS2* interagieren, wodurch deren Kinaseaktivität irreversibel gehemmt wird (62,225).

Pflanzliche Signalwege sind oft abhängig von dem *second messenger* Ca^{2+} , wodurch bspw. ROS-Bildung, stomatale Immunität und Hormonsignalwegen durch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPKs) beeinflusst werden (226). Dass auch Xcv-T3Es darauf Einfluss nehmen, zeigt die negative Transkriptregulation von *S. lycopersicum*-Genen mit Homologie zu *AtCDPK1*, *AtCDPK16*, *AtCDPK29* und *AtCDPK32*. CDPK1 ist an der SA-Antwort und CDPK32 an der ABA-Antwort und stomataler Immunität beteiligt (226).

Die Transkriptomdaten lassen auch vermuten, dass Zelltodreaktionen, welche sowohl im Zuge der *PTI*, als auch *ETI* ausgelöst werden, T3E-abhängig unterdrückt werden. Beispielsweise waren die Transkriptmengen von zu *AtCRK10*, *AtCRK19* sowie *AtCRK25* orthologen Gene T3E-abhängig vermindert, wobei CR-Kinasen (*cyteine-rich kinases*) in *A. thaliana* oft an der ROS-Bildung und HR-Induktion im Zuge der *PTI* beteiligt sind (227). Interessanterweise war auch die Transkriptmenge eines zu *AtPRK5* orthologen Gens vermindert, einer Rezeptorkinase, welche Spaltprodukte von *AtGRI* durch die Metacaspase 9 perzipiert und Zelltodreaktionen auslöst (228). Neben der Unterdrückung der HR während *PTI*-Reaktionen, deutet die negative Regulation von *SIBAP2* auch die HR-Unterdrückung während *R*-Gen-vermittelter Immunantworten an. Zusammen mit *AtBAP1* und *AtBON1* beeinflusst das Ortholog *AtBAP2* *ETI*-induzierte Zelltodreaktionen nach *Xcc*-Infektion (209,229). Da zudem die Transkriptmenge von zu *AtRIPK* und *AtRIN4* orthologen Genen vermindert war, könnten Xcv-T3E auch die HR durch *AtRPM1*-ähnliche *ETI*-Reaktionen (63) unterdrücken.

4.1.5 Xcv-T3E beeinflussen zu späteren Infektionszeitpunkten den Metabolismus von *S. lycopersicum*

Zu späten Zeitpunkten der Infektion T3E-abhängig regulierte Gene stellen die größte sowie eine sehr diverse Gengruppe dar. Ab zehn Stunden nach der Infektion mit *Xcv* waren 680 bzw. 857 *S. lycopersicum*-Gene T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge erhöht bzw. vermindert (Abb. 4, Anhang 6). Da im Gegensatz zu früheren Infektionszeitpunkten hier

signifikant mehr Gene T3E-abhängig in ihrer Transkriptmenge erhöht waren, kann vermutet werden, dass zu späteren Infektionszeitpunkten neben der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmechanismen auch der Wirtsmetabolismus zum Vorteil von *Xcv* beeinflusst wird. Greifen Pathogene gezielt in den Wirtsmetabolismus ein, wird vermutlich sowohl die Pathogenabwehr geschwächt als auch die Nährstoffversorgung zugunsten des Pathogens verbessert. Obwohl, wie bei anderen Pathosystemen, weitgehend unbekannt ist, welche *Xcv*-T3E den Metabolismus beeinflussen, lassen die Transkriptomdaten einen Einfluss von T3E auf die Photosynthese, den Zuckertransport und die Synthese von Sekundärmetaboliten vermuten (Tabelle 12).

Der pflanzliche Metabolismus wird unterteilt in den Primärmetabolismus (bspw. Photosynthese sowie Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel) und den Sekundärmetabolismus (bspw. Biosynthese abwehrspezifischer Komponenten wie Kallose, Lignin, Phytoalexinen oder SA). Da während der Pathogenabwehr der Sekundärmetabolismus mit einem erhöhten Energiebedarf einhergeht, wird der Energiehaushalt meist durch Reduktion der Photosyntheserate oder durch Aufnahme von bspw. Zucker aus dem Apoplasten ausgeglichen (230-232). Im Zuge dessen wird bspw. die Photosynthese in Blättern von *A. thaliana* nach *Pst*-Infektion inhibiert (Photoinhibition) (231), was aufgrund der Pathogenabwehr-relevanten ROS-Bildung (in Chloroplasten) zunächst nicht eingängig erscheint (232). Bedingt durch die Photoinhibition einerseits und hohen Energieverbrauch andererseits, kommt es aber zur Verschiebung des *Source-Sink*-Verhältnisses in infiziertem Gewebe, wodurch sowohl die Expression abwehrspezifischer Gene als, auch die Produktion von Sekundärmetaboliten verstärkt wird (230).

In den erhaltenen Transkriptomdaten war besonders auffällig, dass 10 und/oder 24 *hpi* die Transkriptmenge von 81 Photosynthese-Genen *Xcv*-T3E-abhängig erhöht war (Tabelle 12), was erhöhte Photosyntheseraten wahrscheinlich macht. Während der Immunabwehr gegen den T3SS-defizienten *Xcv*-Stamm 85-10 Δ *hrcN* waren 20 (25%) dieser Gene in ihrer Transkriptmenge vermindert. Darunter befinden sich Gene, welche für die Photosynthese essentielle Lichtsammelkomplexe des Photosystem I oder II kodieren, bspw. *SILHCA4*, *SILHC5* oder *SILHCB3* (179). Weitere *Xcv*-T3E-abhängig induzierte Gene sind *SINPQ1*, *PsbS* und *PsbP*, welche durch die Xanthophyllbiosynthese die Photosynthese beeinflussen (233) bzw. essentiell für die Aktivität des Photosystems II sind (234). Zudem lässt die *Xcv*-T3E-abhängig verminderte Transkriptmenge zu *AtPDI1* und *AtPDI6* orthologer Gene eine Suppression der Photoinhibition vermuten (235). Zusammen deuten die Daten an, dass T3E-abhängig die Photosyntheserate erhöht wird, möglicherweise um die Nährstoffversorgung von *Xcv* zu verbessern. Da für *Pst*-T3E hingegen eine Suppression sowohl Photosynthese-relevanter Gene als auch verminderte ROS-Bildung in Chloroplasten durch Inhibition des Photosystem II beschrieben wurde (81,179,236), könnte dies ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Pathosystemen sein. Dies könnte auf *PstHopN1* zurückzuführen sein, einer

Cystein-Protease, welche durch Degradation von *AtPsbQ* die ROS-Bildung durch das Photosystem II hemmt (73). *SIPsbQ* wird dagegen *Xcv*-T3E-abhängig in seiner Transkriptmenge (und vermutlich Proteinmenge) erhöht. Durch Messung der Photosyntheseraten und ROS-Bildung in *S. lycopersicum* nach Infektion mit dem *Xcv*-WT und 85-10 Δ *hrcN*-Stamm könnte dies weiter untersucht werden.

Entsteht durch Infektion in Pflanzengewebe ein erhöhter Energiebedarf, ist Saccharose die Haupttransportform von Kohlenhydraten von *Source*- zu *Sink*-Gewebe. Hohe Saccharose-Konzentrationen im Apoplasten begünstigen sowohl die Photoinhibition als auch die Pathogenabwehr, indem die Aktivität von Zellwand-Invertasen (CWINV) gesteigert wird (237). Darüber hinaus ist die Hexokinase 1 (HXK1) als Zucker-Sensor ein Schlüsselenzym der Glykolyse und reguliert die Expression von bspw. PR-Genen (232). Da die Transkriptmengen der Gene *SICWINV*, *SIPR-Q* und *SIHXK1* 24 *hpi* vermindert waren, weist dies darauf hin, dass *Xcv*-T3E Zucker-abhängige Abwehrmechanismen hemmen. Obwohl bekannt ist, dass *XopB* die Transkriptmengen von *CaCWINV*- und *CaPR-Q*-Aktivität vermindert (238), zeigen die *Agrobacterium*-basierten Transkriptomdaten dieser Arbeit keinen Einfluss von *XopB* auf die Transkriptmenge *SICWINV*. Wie bereits beschrieben (4.1.1), ist aber unklar, ob der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ähnliche *PTI*-Reaktionen wie *Xcv* 85-10 auslöst.

Andererseits wird die Saccharose-Konzentration im Apoplasten vermutlich durch die Induktion von drei Genen der *MtN3*-Familie (Noduline, *SWEET*-Gene) gefördert, welche den Efflux von Saccharose, *in planta* steuern (239). Eines dieser Gene zeigt Homologie zum Saccharose-Transporter *AtSWEET10*, welcher nach *Pst*-Infektion von *A. thaliana* jedoch T3E-unabhängig induziert wird (239). Ein weiteres Gen kodiert für einen *AtERD6*-ähnlichen membranständigen Zuckertransporter. Diese Daten legen nahe, dass *Xcv*-T3E einerseits den Saccharose-Import in Pflanzenzellen und damit Saccharose-abhängige Abwehrmechanismen hemmt, andererseits aber die Saccharose-Konzentration im Apoplasten möglicherweise zur eigenen Nährstoffversorgung erhöht.

Die Transkriptomdaten deuten auch darauf hin, dass T3E-abhängig die Induktion des Sekundärstoffwechsels und die Synthese Abwehr-relevanter Sekundärmetabolite abgeschwächt werden. Durch Berechnung der Anreicherung von GO-Termen, wurden bspw. 21 Gene identifiziert, die zu späten Infektionszeitpunkten T3E-abhängig den Phenylpropanoid-Metabolismus beeinflussen. Mit Hilfe des Shikimat- und Phenylpropanoid-Wegs synthetisieren Pflanzen Phytoalexine, SA, Lignin, Kallose sowie aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tryptophan (240,241). T3E-abhängig wurden fünf Gene, welche für Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferasen kodieren und 13 Gene, die für Phenylammoniumlyasen (PAL) kodieren, negativ reguliert aber durch Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* induziert. T3E hemmen somit vermutlich die Synthese und Einlagerung von Zellwandkomponenten. Zudem wird so womöglich eine Unterbrechung des Nährstoffflusses

in den Apoplasten während der Immunantwort T3E-abhängig unterdrückt, was auch für das *Pst-A. thaliana*-Pathosystem bekannt ist (81).

Mit Hilfe der *Agrobacterium*-basierten Transkriptomdaten nach transienter Synthese von GFP-XopS wurden 17 Gene identifiziert, welche der Organisation der Zellwand zuzuordnen sind. Fünf dieser Gene waren *Xcv*-T3E-abhängig reguliert und kodieren für Xyloglukan-Endotransglukosylasen. Homologe *A. thaliana*-Proteine sind Regulatoren der Zellwand-Komposition (242). Ebenfalls an der Organisation der Zellwand beteiligt sind Expansine wie *AtEXP12* (243), zu dem ein XopS-spezifisch reguliertes Gen Homologie zeigte. Ein weiteres Gen kodiert für ein Protein mit Homologie zu *AtFAR4*, das an der Synthese von primären Alkoholen zur Einlagerung von Suberin beteiligt ist (244). In weiteren Studien könnte mittels Mikroskopie untersucht werden, ob die Dicke bzw. Lignifizierung der Zellwände von *S. lycopersicum* bzw. *C. annuum* bei Infektion mit *Xcv* bzw. einem in *xopS* deletierten Stamm signifikante Unterschiede aufweisen. Lignin könnte unter UV-Licht zur Autofluoreszenz angeregt werden (245). Darüber hinaus könnte mit Hilfe von Anilinblau-Färbungen untersucht werden, ob XopS-abhängig Ablagerungen von Kallose an Infektionsstellen von Wirtspflanzen verringert wird

4.1.6 Modell der *Xcv*-T3E-abhängigen Veränderung der Abwehr von *S. lycopersicum*

Die Transkriptomdaten zeigen, dass *Xcv* das Transkriptom von *S. lycopersicum* durch translozierte T3Es weitreichend verändert. Wie bereits für das *Pst-A. thaliana*- und *Pst-S. lycopersicum*-Pathosystem gezeigt wurde (81,179,180), sind betroffene pflanzliche Prozesse hauptsächlich die Immunabwehr, der Hormonhaushalt, die Signalperzeption und –transduktion sowie der Primär- und Sekundärmetabolismus. In dem vereinfachten Modell in Abb. 22 sind die für die einzelnen Kategorien spezifischen Markergene sowohl während der Basalabwehr (Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN*) als auch unter dem mutmaßlichen Einfluss aller *Xcv*-T3Es (Infektion mit dem *Xcv*-WT) zusammengefasst.

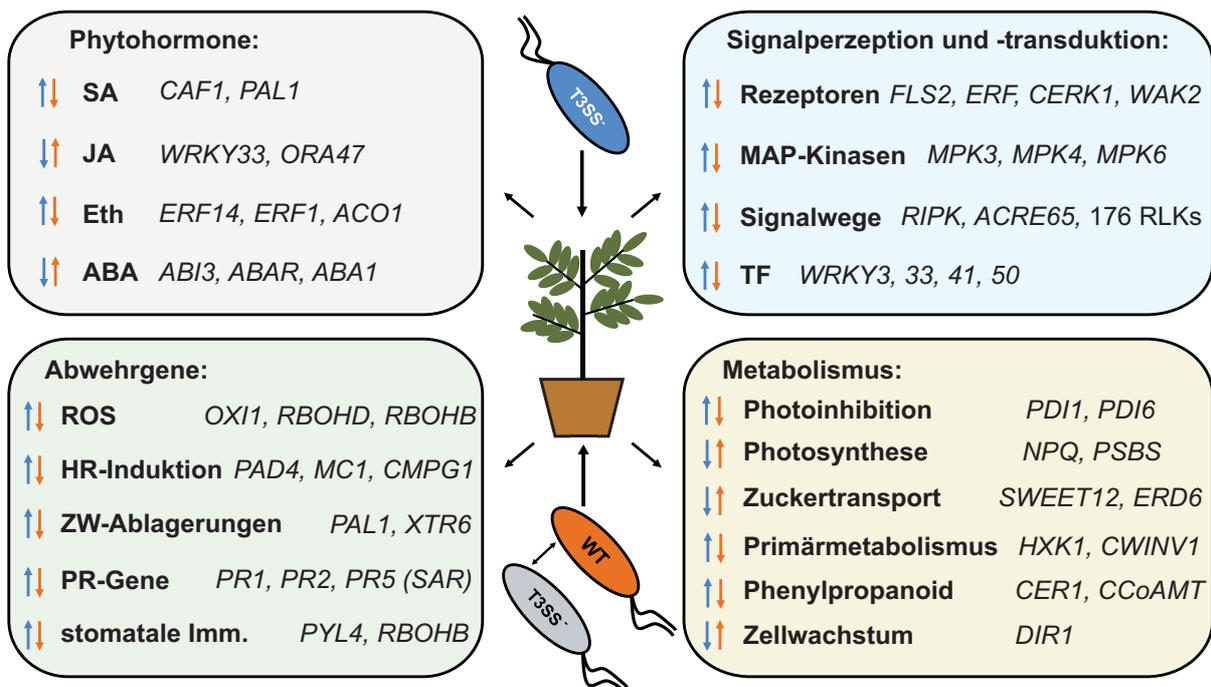


Abb. 22: Schema Xcv-T3E-abhängig beeinflusster Prozesse von *S. lycopersicum*

Xcv-T3SS-abhängig transkriptionell veränderte Prozesse von *S. lycopersicum* wurden stark vereinfacht in Phytohormon-abhängige Abwehrprozesse, Signaltransduktion, allgemeine Pathogenabwehr und Metabolismus unterteilt. Gezeigt ist die Inhibition (↓) bzw. Induktion (↑) dieser pflanzlichen Prozesse anhand der Transkriptmengenänderung ausgewählter Markergene während der Basalabwehr (blaue Pfeile, Infektion mit T3SS-defizientem Xcv-Stamm 85-10 Δ hrcN oder MgCl₂) verglichen mit der mutmaßlichen Veränderung durch Xcv-T3Es (orange Pfeile, Infektion mit WT-Stamm Xcv 85-10 oder Xcv 85-10 Δ hrcN) anhand der *Microarray*-Daten.

4.1.7 Ausblick

Weiterführende Experimente sollten den Einfluss einzelner Xcv-T3E auf verschiedene Prozesse von *S. lycopersicum* adressieren. Neben den in 4.1.1 diskutierten Schwierigkeiten, ist ein wesentlicher Nachteil von Transkriptomstudien nach *Agrobacterium*-vermittelter Synthese einzelner Effektorproteine, dass kinetische Studien nicht sinnvoll sind, wohingegen Einflüsse einzelner T3Es nach Infektion mit Xcv-T3E-Deletionsmutanten zeitlich besser aufgelöst werden könnten. Aufgrund der hohen Kosten für weiterführende *Microarray*- oder RNAseq-basierten Transkriptomstudien wären Expressionsanalysen mittels *NanoString*-Technologie (246) denkbar. Dabei könnten ausgewählte Xcv-T3E-abhängig differentiell exprimierter Gene analysiert werden.

Da die zelluläre Funktion sowohl der Xcv-T3E als auch der Mehrheit T3E-abhängig regulierter Gene bisher nicht beschrieben wurde, greifen T3E vermutlich in bisher unbekanntem Prozessen von *S. lycopersicum* ein. Gen-*Silencing*-Experimente wären ein erster Schritt, den Einfluss einzelner Gene auf die Virulenz von Xcv zu adressieren. Da die Genomsequenz von *C. annuum* seit 2014 verfügbar ist (247), könnte dies auch im Xcv-*C. annuum*-Pathosystem erfolgen (173).

Insbesondere Phytohormon-abhängige Signalkaskaden sind essentiell für pflanzliche Immunreaktionen. Hormonmessungen von *S. lycopersicum*-Pflanzen nach Infektion mit den *Xcv*-WT, *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* sowie Deletionsmutanten in einzelnen Effektorgenen könnten wichtige Hinweise auf den Einfluss einzelner T3Es auf Hormonsignalwege geben. Ähnliches gilt für Konzentrationsbestimmungen reaktiver Sauerstoffspezies.

Die durchgeführten Transkriptomstudien identifizierten eine Vielzahl unbekannter T3E-abhängig regulierter Transkriptionsfaktoren (50 Gene) und (Rezeptor-ähnlicher) Proteinkinasen (235 Gene) (Anhang 6). In weiteren Studien könnte für eine Auswahl dieser Gene die Rolle bei der Infektion mit *Xcv* untersucht werden. Um möglichst Abwehr-relevante Gene zu untersuchen, könnten zunächst Transkriptionsfaktoren (6 Gene), Kinasen (7 Gene) und Rezeptoren (9 Gene) analysiert werden, deren Transkriptmengen bereits 6 *hpi* und 10 *hpi* T3E-abhängig reguliert waren (Anhang 6). Die Identifizierung möglicherweise gebundener DNA-Sequenzen dieser Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von DNA-Sequenzierung-gekoppelter Chromatin-Immunopräzipitation (ChiP-Seq) (248) könnte genauere Einblicke in bisher unbekannte Signalkaskaden ermöglichen. Da insbesondere Proteinkinasen an der Weiterleitung von Signalen der Immunantwort beteiligt sind, wäre auch eine Identifizierung potentieller Phosphosubstrate (249,250) einiger Proteinkinasen denkbar. Darüber hinaus könnten Interaktionspartner membranständiger Rezeptorproteine in Hefe mittels „Split-Ubiquitin“-System (251) oder durch biochemische Interaktionsstudien bspw. mittels „GFP-Trap“-System (252) identifiziert und damit Signalkaskaden der Pathogenabwehr näher analysiert werden.

4.2 Die Transkriptomdaten identifizieren bisher unbekannte Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* und *C. annuum*

Referenzgene kodieren meist für Proteine basaler Zellfunktionen und werden weitläufig als stabil exprimiert bzw. unter den meisten Versuchsbedingungen als nicht reguliert angesehen. Bekannte Beispiele für *S. lycopersicum* sind *Aktin*, *Ubiquitin*, *GAPDH*, *EF-1 α* , *α -Tubulin* oder *Cyclophilin*. Sowohl in *S. lycopersicum* als auch in *C. annuum* wurden Kandidaten-Referenzgene bisher aufgrund von Homologie zu bekannten Referenzgenen ausgewählt und analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass verschiedene Referenzgene (oft *housekeeping*-Gene) abhängig von experimentellen Bedingungen sowie untersuchtem Pflanzengewebe zu bevorzugen sind (156,158,160,253-258). Beispielsweise sind in *S. lycopersicum*-Blättern unter Licht-, Kälte- und Stickstoff-Stress, *GAPDH* und *EF-1 α* geeignete Referenzgene (156). Unter Infektionsbedingungen mit verschiedenen Viren, wie beispielsweise dem *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), zeigten Blätter von *S. lycopersicum* die geringsten

Schwankungen in Transkriptmengen von *Aktin*, *GAPDH* und *Ubiquitin* (256). In *C. annum* wurden ebenfalls *GAPDH* und *EF-1 α* sowohl in verschiedenen Geweben wie Blättern, Wurzeln und Blüten, als auch unter Einfluss verschiedener Hormone (bspw. SA) oder abiotischem Stress (bspw. Hitze-, Kälte- oder Trockenstress) als geeignete Referenzgene identifiziert (160). Die Transkriptomdaten von *S. lycopersicum* dieser Arbeit zeigen hingegen, dass acht traditionell verwendete Referenzgene, darunter auch *Aktin*, *GAPDH*, *Ubiquitin* sowie *EF-1 α* , unter *Xcv*-Infektionsbedingungen erheblichen Schwankungen unterliegen (Abb. 9). Betrachtet man darüber hinaus alle annotierten Gene der *Aktin*-, *GAPDH*, *Ubiquitin*- und *EF-1 α* -Genfamilien in *S. lycopersicum* (Anhang 12 und Anhang 13), ist zu erkennen, dass auch die Transkriptmengen vieler anderer Gene dieser Familien erheblichen Schwankungen unterliegen und daher vermutlich als Referenzgene für das Tomate-*Xcv*-Pathosystem ungeeignet sind. Dieses Bild wird durch die durchgeführten qRT-PCR-Analysen bestätigt (Abb. 12 und Abb. 13). Insbesondere *GAPDH* und *Aktin* zeigen unter Verwendung der Algorithmen *GeNorm* und *BestKeeper* in *S. lycopersicum* instabile Transkriptmengen. Darüber hinaus zeigen die qRT-PCR-Daten, dass *GAPDH* unter *Xcv*-Infektionsbedingungen differentiell exprimiert wird (Abb. 14). Sowohl *GAPDH* als auch *Aktin* sind demnach als Normalisierungskontrollen für das Tomate-*Xcv*-Pathosystem ungeeignet. Mit Hilfe der Transkriptomdaten wurden für das Tomate-*Xcv*-Pathosystem elf Kandidaten-Referenzgene identifiziert, von denen lediglich *SIPTBL* Homologie zu einem bekannten Referenzgen zeigt. Interessanterweise wurde *AtPTB* (At3g01150; 79% Aminosäureidentität zu *SIPTBL*) durch die Auswertung von 90 Transkriptomdatensätzen zur Analyse der Infektion von *A. thaliana* mit verschiedenen virulenten und avirulenten *Pst*- und *P. infestans*-Stämmen als geeignetes Referenzgen unter biotischem Stress identifiziert (259).

Der Vergleich des Expressionsverhaltens von acht traditionell verwendeten Referenzgenen (Tabelle 18) mit dem besten neu identifizierten Kandidaten-Referenzgen (*TAF6*) (Abb. 9) bestätigt, dass die Transkriptmenge von *TAF6* geringeren Schwankungen unterliegt und somit im Tomate-*Xcv*-Pathosystem, verglichen mit traditionell verwendeten Referenzgenen, wahrscheinlich besser geeignet ist.

Die elf neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene erfüllen, basierend auf der Annotation bzw. Homologie zu bekannten Proteinen aus *A. thaliana*, überwiegend basale Zellfunktionen, wie Redox-Prozesse (*COX*), mRNA-Prozessierung (*LSM7*, *CLP1*, *PTBL*), Regulation der Transkription bzw. Chromatin-Dynamik (*PHD*), nukleärer Import (*IMP- β*) und die Fettsäurebiosynthese (*ACP*) (Tabelle 18). Interessanterweise wurden unter den 50 potentiell am stabilsten exprimierten Gene keine Gene des Metabolismus (bspw. Glykolyse, der Photosynthese oder weitere Gene des Fettsäurestoffwechsels) identifiziert, was bestätigt, dass der Metabolismus durch *Xcv* beeinflusst wird (4.1.5).

4.2.1 PHD und LSM7 sind das für das Tomate-Xcv-Pathosystem optimale Referenzgen-Paar

Die Evaluierung der qRT-PCR-Analysen mit Hilfe der Algorithmen *NormFinder*, *GeNorm* bzw. *BestKeeper* zeigt, dass alle neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene unter den untersuchten experimentellen Bedingungen (Zeitpunkt der Infektion, Infektion mit unterschiedlichen *Xcv*-Stämmen) stabile Transkriptmengen aufweisen. Die Rangfolge der besten Referenzgene unterschied sich dabei in Abhängigkeit vom verwendeten Algorithmus (Abb. 12 sowie Tabelle 21), was in ähnlichen Studien gleichermaßen beobachtet wurde (154,255,258,260).

Weiterhin wurden verschiedene Referenzgen-Paare zur Normalisierung bei der qRT-PCR-basierten Transkriptmengenbestimmung sowohl eines bekannten *PTI*-Genes (*SILRR22*) als auch *ETI*-Genes (*SIUGT*) untersucht (Abb. 13). Im Vergleich zur Verwendung traditionell verwendeter Referenzgene resultierte die Verwendung neu identifizierter Referenzgene sowohl in geringeren *fold changes*, als auch in geringeren Standardabweichungen biologischer Replikate. Die Verwendung der vier untersuchten traditionellen Referenzgene (*Aktin*, *GAPDH*, *Ubiquitin* und *EF-1 α*) führte hingegen zu weniger stabilen Transkriptmengen und höheren Standardabweichungen unter diesen experimentellen Bedingungen. Dies zeigt deutlich, dass die höheren Schwankungen der Transkriptmengen traditionell verwendeter Referenzgene die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse negativ beeinflusst.

Basierend auf diesen Daten empfiehlt sich die Verwendung der Referenzgene *SIPHD* und *SILSM7* zur künftigen Normalisierung von qRT-PCR-Daten für das Tomate-*Xcv*-Pathosystem.

4.2.2 UCH und PHD sind ein für das Paprika-Xcv-Pathosystem geeignetes Referenzgen-Paar

Da es nicht immer möglich ist, Transkriptomanalysen mit den jeweils verwendeten Modellorgansimen durchzuführen, werden, basierend auf Sequenzvergleichen, Kandidaten-Referenzgene in nahe verwandten Spezies bestimmt und anschließend experimentell evaluiert (253,261-263). Daher wurden in dieser Arbeit zu den Kandidaten-Referenzgenen orthologe Gene aus *C. annuum* identifiziert und als Normalisierungskontrollen für qRT-PCR-Analysen unter *Xcv*-Infektionsbedingungen evaluiert. Sowohl mit Hilfe der Algorithmen *NormFinder*, *GeNorm* und *BestKeeper* als auch analog zu *S. lycopersicum* durch qRT-PCR-Analysen je eines *PTI*- bzw. *ETI*-induzierten Genes von *C. annuum*, wurden *CaUCH* und *CaPHD* als das optimale Referenzgen-Paar unter den getesteten Bedingungen identifiziert (Abb. 12, Abb. 13, Tabelle 21). Interessanterweise zeigte in *C. annuum* auch *CaACT* eine relativ stabile Transkriptmenge nach Infektion mit *Xcv*, wenngleich die meisten neu identifizierten Kandidaten als Referenzgene offensichtlich besser geeignet sind. Dies steht

der Beobachtung entgegen, dass *CaACT* (anhand von Oligonukleotiden derselben Sequenz) unter verschiedenen abiotischen Stresssituationen bzw. der Aktivierung von Pflanzenhormon-abhängigen Signalwegen, deutlich instabilere Transkriptmengen zeigt und unter diesen Bedingungen als Referenzgen ungeeignet ist (257). Ebenso erwies sich *CaEF-1 α* als das Kandidaten-Referenzgen in *C. annuum* mit der instabilsten Transkriptmenge, wohingegen das gleiche Gen bisher als sehr stabiles Referenzgen unter abiotischen Stresssituationen in *C. annuum* beschrieben wurde (160). Dies unterstützt nochmals die Annahme, dass Referenzgene unter verschiedenen experimentellen Bedingungen sehr stabile Transkriptmengen zeigen, aber auch differentiell exprimiert sein können (264). Dabei muss aber beachtet werden, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Linien von *C. annuum* verwendet wurden, wodurch eine Veränderung der Transkriptstabilität von z.B. *ACT* oder *EF-1 α* nicht ausgeschlossen werden kann.

Wenngleich die Sequenzhomologie-basierte Identifizierung neuer Referenzgene deutliche Vorteile gegenüber der Verwendung bekannter bzw. vermuteter *housekeeping*-Gene hat, zeigt die Expressionsstabilität der neu identifizierten Referenzgene deutliche Unterschiede zwischen *S. lycopersicum* und *C. annuum* (Abb. 12, Tabelle 21). Dieses Bild wird ebenfalls durch die Darstellung der C_t -Werte der qRT-PCR-Analysen (Abb. 11) bestätigt. Die mit Hilfe des Algorithmus *NormFinder* berechneten M-Werte der Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* sind signifikant niedriger, verglichen mit Werten für *C. annuum*. Wird der Algorithmus *BestKeeper* verwendet, ist ausschließlich *CaUCH* ein verlässliches Referenzgen. Daher ist anzunehmen, dass mit Hilfe von Transkriptomanalysen mit *Xcv* infizierter *C. annuum*-Blätter möglicherweise besser geeignete Referenzgene identifiziert werden könnten.

Bei Betrachtung der vorliegenden Daten, wurden anhand der Transkriptomdaten geeignete Referenzgene zur Normalisierung von qRT-PCR-Daten sowohl für das Tomate-, als auch das Paprika-*Xcv*-Pathosystem identifiziert und validiert. Darüber hinaus könnten anhand dieser Referenzgene Homologie-basiert geeigneter Referenzgene andere Pflanzenspezies unter Infektionsbedingungen identifiziert werden.

4.3 Funktionelle Charakterisierung des Xcv-Effektorproteins Xopl

4.3.1 Xopl integriert vermutlich in spezifische SCF-Komplexe

SCF-Komplexe dienen der Übertragung von Ubiquitin an einen Lysin-Rest eines Zielproteins, oft zur Markierung für Proteindegradation durch das 26S-Proteasom (74). Vorangegangene Arbeiten und in dieser Arbeit durchgeführte Interaktionsstudien mittels BiFC, GST-*pull-down*- bzw. Ko-IP-Analysen zeigen, dass Xopl sowohl mit S/Skp1, als auch CaSkp1 interagiert (74). Im Vergleich zum Menschen und *S. cerevisiae* (je ein Skp1-Protein) bzw. *Drosophila* (sieben Skp1-Homologe), exprimiert *A. thaliana* 21 Skp1-Homologe (ASK) (265,266). BLAST-Analysen identifizierten 17 Skp1-Homologe in *C. annuum* (E -value $< 1^{-10}$; Aminosäureidentität mindestens 40% über mindestens 70% der Sequenz; Anhang 17). Die BLAST-Analysen bestätigen zudem, dass *S. lycopersicum* 19 Skp1-homologe Proteine enthält, was kürzlich für auch für *S. pimpinellifolium* gezeigt wurde (267). Die Transkriptmengen der 19 Skp1-homologen Gene (SSK) der Wildtomate (*S. pimpinellifolium*) sind gewebespezifisch und abhängig von Umwelteinflüssen (267), ähnlich wie ASK-Transkriptmengen (268). SSK1 (AS-Sequenz identisch zu S/Skp1) zeigte die höchste Transkriptmenge in Blüten und Blättern, dem Infektionsort vieler Pathogene. Die Genexpression von SSK1 wird bei abiotischem Stress und insbesondere nach Behandlung mit SA und ABA induziert, sodass eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort vermutet wird (267). Interaktionsstudien von Xopl mit 20 ASK-Proteinen in *S. cerevisiae* zeigen, dass Xopl F-Box-abhängig ausschließlich mit ASK13 interagiert (Abb. 17). Da die Aminosäuresequenzen von S/Skp1 (=SSK1) und CaSkp1 die höchste Homologie zu ASK13 zeigen (Abb. 23), integriert Xopl vermutlich in SCF-Komplexe in Blättern von Wirtspflanzen, wobei S/Skp1 bzw. CaSkp1 bevorzugte Interaktionspartner sein könnten, da diese in Blättern vermutlich stärker exprimiert werden als andere Skp1-Homologe. In zukünftigen Experimenten sollten die Transkriptmengen Skp1-ähnlicher Gene in *S. lycopersicum*- bzw. *C. annuum*-Blättern mittels qRT-PCR verglichen werden. Zudem könnte untersucht werden, ob Xopl ausschließlich mit S/Skp1 aus *S. lycopersicum* interagiert. Da sich die AS-Sequenzen der 19 Skp1-Proteine zwischen *S. lycopersicum* und *S. pimpinellifolium* nicht unterscheiden, könnten dafür die kürzlich publizierten Expressionskonstrukte der SSK aus *S. pimpinellifolium* (267) verwendet werden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass sich S/Skp1, CaSkp1 und ASK13 von ASK-Proteinen, welche nicht mit Xopl interagierten (ASK1, ASK2, ASK4), hauptsächlich im Bereich nach AS 66 unterscheiden (Abb. 23). Dies legt nahe, dass möglicherweise ein zur Interaktion mit Xopl essentielles Motiv in diesem Bereich lokalisiert ist und nur in ASK13 vorkommt. Daher sollte untersucht werden, worauf die Spezifität der Interaktion zwischen Xopl und S/Skp1 bzw. CaSkp1 beruht. Für Interaktionsstudien könnten bspw. Skp1-

Varianten erstellt werden, die zwischen den Aminosäuren 75 und 76, basierend auf der Sequenz von ASK1 und ASK2, weitere Aminosäuren eingefügt werden. Darüber hinaus könnten Gen-*silencing*-Experimente dazu beitragen, die Rolle von *S*/Skp1 und *Ca*Skp1 während der Infektion mit *Xcv* zu untersuchen.

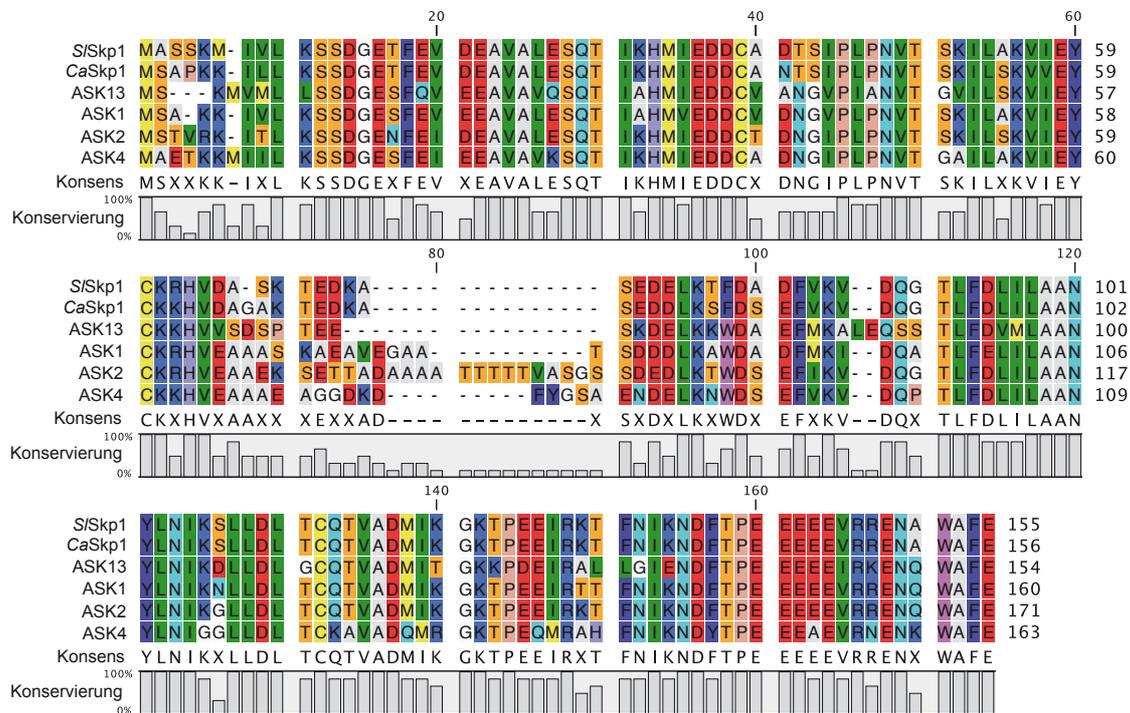


Abb. 23: Vergleich der Proteinsequenzen von *Ca*Skp1, *S*/Skp1 und ausgewählten ASK-Proteinen aus *A. thaliana*

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der mit XopI interagierenden Proteine *S*/Skp1, *Ca*Skp1 und ASK13 sowie homologer ASK-Proteine, welche möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Sequenzen im Bereich ab AS 66, nicht mit XopI interagieren (ASK1, ASK2, ASK4).

4.3.2 *S*/ALP und *S*/ARC6 sind mögliche pflanzliche Zielproteine von XopI

Hefe-Dihybrid-Sichtungen einer Paprika cDNA-Bibliothek mit XopI bzw. XopI_{ΔF-Box} identifizierten insgesamt 52 spezifische Kandidaten mit Homologie zu 35 Proteinen (Anhang 1). Zwei dieser Proteine interagierten sowohl mit XopI als auch mit XopI_{ΔF-Box} (darunter *S*/B3DP), aber kein Protein interagierte ausschließlich mit XopI_{ΔF-Box}. Von diesen potentiellen Interaktoren interagierten XopI und XopI_{ΔF-Box} mit *S*/ARC6 in Hefe (Abb. 18) sowie mit *S*/ALP *in planta* mittels BiFC (Abb. 20). Interessanterweise war die Interaktion mit *S*/ALP ausschließlich in Schließzellen des Spaltöffnungsapparates sichtbar, weshalb ein bisher unbekannter Faktor für die Interaktion notwendig sein könnte, welcher spezifisch in Schließzellen vorkommt.

Da sowohl in Hefe, als auch mittels BiFC *in planta* eine Interaktion von XopI mit *S*/Aktin11, *S*/B3DP, *S*/ARIA, *S*/CAM5 und *Ca*AFP weder bestätigt noch widerlegt werden konnte, sollten weitere Interaktionsstudien mittels *GST-pull-down*-Analysen sowie *in planta* mittels Ko-IP- oder „*Split-Luciferase*“-Experimenten (269) durchgeführt werden. Da XopI-Interaktoren

wahrscheinlich Proteasom-abhängig degradiert werden, könnten Proteinmengen über Immunoblot-Analysen nach transientser Synthese der Interaktoren untersucht werden. Um zu adressieren, ob Proteine XopI-abhängig über das 26S-Proteasom degradiert werden, könnte dabei der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet werden. Immunoblot-Analysen mit einem gegen Ubiquitin gerichteten Antikörper könnten die Ubiquitinierung von XopI-Interaktoren zeigen.

Viele F-Box-Proteine regulieren die Verfügbarkeit von Transkriptionsfaktoren und sind somit an der Regulation von pflanzlichen Signalwegen beteiligt (270-272). Beispielsweise regulieren SCF^{COI1}, SCF^{TIR1} bzw. SCF^{SLY1} die Expression JA-, AUX- bzw. GA-responsiver Gene (74) und interagieren SSK1 (=S/Skp1) (267). Die Transkriptomanalysen nach transientser Synthese von GFP-XopI lassen jedoch keine eindeutige Aussage über den Einfluss von XopI auf das Transkriptom von *S. lycopersicum* zu (4.1.1). Die Sichtung der Paprika-cDNA-Bibliothek identifizierte drei mit XopI interagierende Transkriptionsfaktoren (S/B3DP, S/TF_bHLH und S/ARF19) (Tabelle 23). Interessanterweise wurde S/B3DP in voneinander unabhängigen Hefe-Dihybrid-Sichtungen sowohl als Interaktionspartner von XopI, als auch von XopI_{ΔF-Box} identifiziert. Sowohl die mögliche Interaktion von XopI mit diesen potentiellen Interaktionspartnern, als auch der Einfluss von XopI auf das pflanzliche Transkriptom sollte weiter untersucht werden.

4.3.2.1 Interaktionspartner suggerieren eine XopI-vermittelte Suppression der stomatalen Immunität von Wirtspflanzen

Interaktionsstudien wiesen darauf hin, dass XopI mit S/ARC6 (Abb. 18) und S/ALP (Abb. 20) interagiert. AtARC6 wurde als ein Protein der inneren Chloroplastenmembran identifiziert und ist an der Teilung von Chloroplasten beteiligt (273). Chloroplasten sind auch an der Regulation der Stomata durch Ca²⁺-Signale beteiligt (274). Die in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisierungsstudien zeigen, dass das zu AtARC6 orthologe Protein S/ARC6 im Zellkern, Zytoplasma, Spaltöffnungsapparaten als auch in Chloroplasten lokalisiert ist (Abb. 19), d.h. eine Interaktion mit XopI ist möglich.

Weiterhin wurde die Interaktion von XopI und XopI_{ΔF-Box} mit dem ABC-Transporter-ähnlichen Protein S/ALP bestätigt (Abb. 20), welches Homologie zu AtABCF3 zeigt (73% AS-Identität). AtABCF3 besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen ABC-Transporter-Proteinen keine Transmembrandomäne und ist im Zellkern, Zytoplasma und in Spaltöffnungsapparaten lokalisiert (175), was auch für S/ALP beobachtet wurde (Abb. 19). In AtABCF3 mutierte *A. thaliana*-Pflanzen können ihre Stomata nach Infektion mit *Pst* DC3000 nicht schließen (175).

Neben S/ARC6 und S/ALP können weitere potentielle XopI-Interaktionspartner mit der stomatalen Immunität in Verbindung gebracht werden. Dazu zählt S/ARIA, welches

Homologie zu *AtARIA* zeigt (76% AS-Identität). *AtARIA* steuert durch Bindung des Transkriptionsfaktors ABF2 die Expression von ABA-responsiven Genen und nimmt über ABF2 indirekt Einfluss auf die Apertur von Stomata (275,276). Der potentielle Xopl-Interaktor CaCat weist Homologie zu der Katalase *AtCat1* aus *A. thaliana* auf (85% AS-Identität), welche über die MAPK-Kinase *AtMEK1* vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Stresssituationen die Apertur der Stomata verringert (277). *SISTPK_HT1* zeigt Homologie zu *AtHT1* (51% AS-Identität), einer Proteinkinase, die in Abhängigkeit der CO₂-Konzentration in Blättern die Apertur der Stomata reguliert (278-280).

Sowohl in Hefe-Dihybrid-Sichtungen dieser Arbeit, als auch durch GFP-Trap-Experimente im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefanie Mücke wurde ein Calmodulin-Protein als möglicher Interaktionspartner von Xopl identifiziert, welches Homologie zu *AtCaM5* hat (99,3% AS-Identität zu *SiCaM5*; 91% AS-Identität zu *NbCaM* der GFP-Trap-Experimente). *AtCaM5* bindet *in planta* *AtIQM1* und reguliert so die Apertur von Stomata, abhängig von der Lichtperiode oder auch der Behandlung mit ABA (281). Die GFP-Trap-Experimente ergaben auch eine Anreicherung von *NtAktin54* in Proben, welche Xopl enthielten. Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielt auch eine wesentliche Rolle während des Öffnens oder Schließens von Spaltöffnungen und wird ebenfalls in Abhängigkeit der Lichtperiode und der ABA-Konzentration reguliert (282).

4.3.2.2 Xopl beeinflusst die Apertur von Stomata von *S. lycopersicum* nach Infektion mit *Xcv*

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien lassen einen Einfluss von Xopl auf die stomatale Immunität vermuten. Tatsächlich zeigten Stomata infizierter Tomatenblätter eine gleichermaßen signifikant reduzierte Apertur nach Infektion mit sowohl einem T3SS-defizienten, als auch in *xopl* deletierten *Xcv*-Stamm (Abb. 21). Daraus ist zu schließen, dass Xopl, aber vermutlich kein weiteres *Xcv*-T3E-Protein, die durch *Xcv*-Perzeption induzierte stomatale Immunität abschwächt. Allerdings bleibt unklar, ob *Xcv* über andere, T3E-unabhängige Mechanismen die Apertur der Stomata von Wirtspflanzen unterdrückt. Ein bekannter Mechanismus ist die Imitation von JA-Isoleucin (JA-Ile) durch Coronatin-ähnliche Faktoren in *Pst* bei der Infektion von *A. thaliana* (27,283). Über die Stimulation des JA-Signalweges wird der SA-Signalweg unterdrückt, welcher bei Pathogen-Perzeption einen schnellen Verschluss der Stomata auslöst (283). Coronatin-ähnliche sekretierte Faktoren wurden auch für einige *Xanthomonas*-Spezies wie *Xcc* (284), aber nicht für *Xcv* beschrieben. Um dies zu adressieren, könnte untersucht werden, ob *Xcv*-Sekretionsüberstände in der Lage sind, die stomatale Immunität von *S. lycopersicum* nach Infektion mit einem Coronatin-defizienten *Pst*-Stamm oder *PTI*-Induktion durch *flg22*, zu unterdrücken. Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob durch die Einführung eines *xopl*-Expressionskonstrukts in

einen Coronatin-defizienten *Pst*-Stamm, die Pathogen-abhängige Öffnung der Stomata von *S. lycopersicum* wiederhergestellt werden kann.

Die potentiellen Interaktoren von Xopl lassen vermuten, dass Xopl möglicherweise mehrere Stomata-regulierende Signalwege beeinflussen könnte (Abb. 24). Durch VIGS potentieller Xopl-Interaktoren in Wirtspflanzen von *Xcv* könnte der Einfluss der Interaktoren sowohl auf die Apertur von Stomata, als auch auf die Virulenz von *Xcv* (bspw. Wachstum und Symptombildung) untersucht werden.

Neben der PAMP-Perzeption sind Phytohormone wie ABA, SA, JA und AUX in die Regulation der Stomata involviert (285), wobei oft durch ROS-Bildung die Ca^{2+} -Konzentration steigt und, gesteuert durch Ionenkanäle, der Turgor zum Öffnen oder Schließen der Schließzellen verändert wird (27,33,175,286). Durch Rekrutierung von ARIA oder ARF19 zu pflanzlichen SCF-Komplexen könnte Xopl Einfluss auf diese Hormonsignalwege nehmen. Um dies zu adressieren, könnten Tomatenpflanzen, deren Synthese von ABA (Linien *sitiens* bzw. *notabilis* (287)), SA (nahG-defiziente Linie (288)) bzw. JA (*jai1*-Linie (289)) reduziert ist, mit *Xcv* bzw. einem in *xopl* deletiertem *Xcv*-Stamm infiziert und anschließend die Apertur von Stomata untersucht werden.

Da die stomatale Immunität oft mit ROS-Bildung einhergeht, könnte in künftigen Studien die ROS-Konzentration in mit *Xcv*- oder *Xcv* 85-10 Δ *xopl*-infizierten Tomatenpflanzen als auch in *N. benthamiana* nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression von Xopl bzw. Xopl $_{\Delta$ F-Box, gemessen werden.

Da BiFC-Analysen nahe legen, dass Xopl *in planta* mit SIALP interagiert (Abb. 20), ist SIALP ein wichtiger Kandidat für weitere Studien. Obwohl AtABCF3-defiziente *A. thaliana*-Pflanzen abgeschwächte stomatale Immunität zeigen (175), ist die molekulare Funktion von AtABCF3 und SIALP bisher unbekannt. Wird die Interaktion von Xopl und SIALP durch weitere Interaktionsstudien wie bspw. Ko-IP-Analysen oder „Split-Luciferase“ (269) bestätigt, könnten durch Hefe-Dihybrid-Sichtungen mit einem AD_{Gal4}-SIALP-Fusionskonstrukt, weitere Proteine einer Signalkaskade der stomatalen Immunität identifiziert werden.

Da die Verringerung der Apertur der Stomata auch mit einer Reorganisation von Aktinfilamenten einhergeht, sollte eine mögliche Interaktion von Xopl mit Proteinen der Aktin-Familie weiter untersucht werden. Da Lokalisierungsstudien vermuten lassen, dass SIAktin11 in *N. benthamiana* nicht in Stomata lokalisiert (Abb. 19) und in Hefe nicht mit Xopl interagiert (Abb. 18), könnten weitere Proteine der Aktin-Familie auf Interaktion mit Xopl überprüft werden.

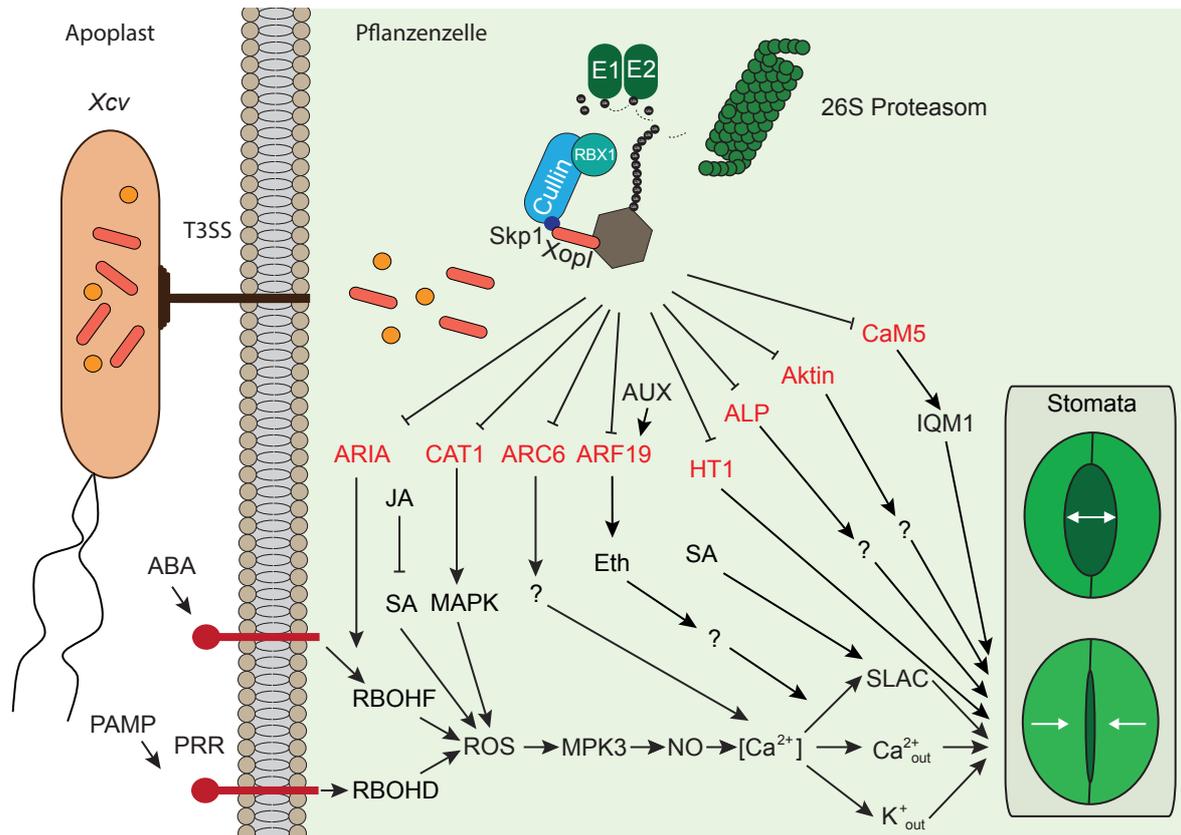


Abb. 24: Modell zum Einfluss von Xopl auf Stomata susceptibler Wirtspflanzen

Dargestellt ist, wie Xopl anhand der potentiellen Interaktoren die stomatale Immunität beeinflussen könnte. Nach Perception von Xcv wird der Turgor in Schließzellen vermindert und die Stomata verschlossen um das Eindringen von Xcv in den Apoplasten zu verhindern. Zentrale Mechanismen für diesen Verschluss beruhen auf der Perception von PAMPs über Rezeptoren (PRR) oder ABA, wodurch abhängig von NADPH-Oxidasen (RBOHF/RBOHD) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden. Durch eine Signalkaskade über MPK3 und Stickoxid (NO) wird die Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Ca^{2+} -Signale induzieren die Öffnung von K_{out}^{+} - und Ca_{out}^{2+} -Kanälen bzw. langsamen Anionkanälen (SLAC) in Schließzellen. Der Ausstrom von K^{+} , Ca^{2+} und Anionen senkt den Turgor und damit die Apertur der Stomata. Abhängig von verschiedenen Proteinen wie ARIA, CAT1, ARC6 oder ALP und Phytohormonen wie JA, SA, Aux oder Eth werden verschiedene Bereiche dieses Signalweges reguliert. Unabhängig davon beeinflussen HT1 oder CaM5 auf bisher unbekannter Weise die stomatale Immunität, welche auch mit einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts einhergeht. Nach der Translokation rekrutiert Xopl die potentiellen Interaktionspartner (rot) zu pflanzlichen SCF-Komplexen (Skp1, Cullin mit RBX1, Xopl), woraufhin diese vermutlich 26S-Proteasom-abhängig degradiert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. **Dodds PN, Rathjen JP.** 2010. "Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions". *Nat. Rev. Genetics* **11**:539-548.
2. **Heath MC.** 2000. "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses". *Curr. Opin. Plant Biol* **3**:315-319.
3. **Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB.** 2006. "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**:601-611.
4. **Gohre V, Robatzek S.** 2008. "Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity". *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**:189-215.
5. **Zipfel C.** 2009. "Early molecular events in PAMP-triggered immunity". *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:414-420.
6. **Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J.** 2004. "Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes". *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* **101**:15811-15816.
7. **Zipfel C, Felix G.** 2005. "Plants and animals: a different taste for microbes?". *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:353-360.
8. **Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G.** 2004. "The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants". *Plant Cell* **16**:3496-3507.
9. **Jones JDG, Dangl JL.** 2006. "The plant immune system". *Nature* **444**:323-329.
10. **Zipfel C.** 2014. "Plant pattern-recognition receptors". *Trends in Immunology* **35**:345-351.
11. **Macho AP, Zipfel C.** 2015. "Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors". *Curr. Opin. Microbiol.* **23**:14-22.
12. **Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L.** 2011. "Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity". *Science* **332**:1439-1442.
13. **Lin W, Ma X, Shan L, He P.** 2013. "Big roles of small kinases: The complex functions of receptor - like cytoplasmic kinases in plant immunity and development". *J. Integr. Plant Biol.* **55**:1188-1197.
14. **Macho AP, Zipfel C.** 2014. "Plant PRRs and the activation of innate immune signaling". *Mol. Cell* **54**:263-272.
15. **Boller T, Felix G.** 2009. "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors". *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:379-406.
16. **Tena G, Boudsocq M, Sheen J.** 2011. "Protein kinase signaling networks in plant innate immunity". *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**:519-529.
17. **Segonzac C, Zipfel C.** 2011. "Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria". *Curr. Opin. Microbiol.* **14**:54-61.
18. **Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C.** 2002. "Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature". *Tr. Plant Sci.* **7**:301-308.
19. **Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R.** 2003. "ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense". *Plant Cell* **15**:165-178.
20. **Fiil BK, Petersen K, Petersen M, Mundy J.** 2009. "Gene regulation by MAP kinase cascades". *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:615-621.
21. **O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP.** 2012. "Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism". *Planta* **236**:765-779.
22. **Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Sodi AM, Soldatini GF.** 2003. "Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone". *J. Exp. Bot.* **54**:2529-2540.
23. **Tsuda K, Katagiri F.** 2010. "Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity". *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**:459-465.
24. **Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM.** 2002. "Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms". *Plant Phys.* **128**:491-501.
25. **Thaler JS, Bostock RM.** 2004. "Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects". *Ecology* **85**:48-58.

26. **Bari R, Jones JDG.** 2009. "Role of plant hormones in plant defence responses". *Plant Mol. Biol.* **69**:473-488.
27. **Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY.** 2006. "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion". *Cell* **126**:969-980.
28. **Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG.** 2006. "A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling". *Science* **312**:436-439.
29. **Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S.** 2008. "Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice". *Plant Cell* **20**:228-240.
30. **Albersheim P, Jones TM, English PD.** 1969. "Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes". *Annu. Rev. Phytopathol.* **7**:171-194.
31. **Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J.** 2011. "Callose deposition: a multifaceted plant defense response". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**:183-193.
32. **Kwon C, Bednarek P, Schulze-Lefert P.** 2008. "Secretory pathways in plant immune responses". *Plant Physiol.* **147**:1575-1583.
33. **Sawinski K, Mersmann S, Robatzek S, Bohmer M.** 2013. "Guarding the green: pathways to stomatal immunity". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**:626-632.
34. **Hedrich R.** 2012. "Ion channels in plants". *Physiol. Rev.* **92**:1777-1811.
35. **Denny TP.** 1995. "Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis". *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**:173-197.
36. **Ray SK, Rajeshwari R, Sharma Y, Sonti RV.** 2002. "A high - molecular - weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non - fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence". *Mol. Microbiol.* **46**:637-647.
37. **Strange RN.** 2007. "Phytotoxins produced by microbial plant pathogens". *Nat. Prod. Rep.* **24**:127-144.
38. **Toth IK, Birch PRJ.** 2005. "Rotting softly and stealthily". *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:424-429.
39. **Lagaert S, Beliën T, Volckaert G.** "Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes". *Elsevier* **20**:1063-1073
40. **Büttner D, Bonas U.** 2010. "Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors". *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:107-133.
41. **He SY, Nomura K, Whittam TS.** 2004. "Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens" *Mol. Cell Res.* **1694**:181-206.
42. **Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M.** 2004. "Conserved features of type III secretion". *Cell. Microbiol.* **6**:805-816.
43. **Büttner D, Bonas U.** 2006. "Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion". *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:193-200.
44. **Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, Stall RE.** 1991. "Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:88.
45. **Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U.** 2001. "cDNA - AFLP analysis unravels a genome - wide hrpG - regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *Mol. Microbiol.* **41**:1271-1281.
46. **Koebnik R, Kruger A, Thieme F, Urban A, Bonas U.** 2006. "Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes". *J. Bacteriol.* **188**:7652-7660.
47. **Lorenz C, Buttner D.** 2009. "Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *J. Bacteriol.* **191**:1414-1428.
48. **Büttner D, Bonas U.** 2002. "Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell". *EMBO Journal* **21**:5313-5322.
49. **Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, Bonas U.** 2004. "HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III - dependent protein secretion". *Mol. Microbiol.* **54**:755-768.
50. **Beth Mudgett M.** 2005. "New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants". *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**:509-531.
51. **Flor HH.** 1971. "Current status of the gene-for-gene concept". *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
52. **Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ.** 2006. "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response". *Cell* **124**:803-814.

53. **Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH.** 2011. "Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy". *Plant Cell* **23**:4-15.
54. **Greenberg JT, Yao N.** 2004. "The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions". *Cell. Microbiol.* **6**:201-211.
55. **van der Hoorn RAL, Kamoun S.** 2008. "From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors". *Plant Cell* **20**:2009-2017.
56. **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**:645-648.
57. **Tsiamis G, Mansfield JW, Hockenull R, Jackson RW, Sesma A, Athanassopoulos E, Bennett MA, Stevens C, Vivian A, Taylor JD.** 2000. "Cultivar - specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo - blight disease". *EMBO Journal* **19**:3204-3214.
58. **Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR.** 2009. "The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**:1069-1080.
59. **Feng F, Zhou J-M.** 2012. "Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors". *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**:469-476.
60. **Deslandes L, Rivas S.** 2012. "Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets". *Tr. Plant Sci.* **17**:644-655.
61. **Göhre V, Spallek T, Häweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield JW, Robatzek S.** 2008. "Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB". *Curr. Biol.* **18**:1824-1832.
62. **Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J.** 2008. "*Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases". *Curr. Biol.* **18**:74-80.
63. **Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M.** 2012. "A *Xanthomonas* uridine 5 [prime]-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases". *Nature* **485**:114-118.
64. **Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J.** 2007. "A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants". *Cell Host & Micr.* **1**:175-185.
65. **Deslandes L, Rivas S.** 2012. "Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets". *Tr. Plant Sci.* **17**:644-655.
66. **Nomura K, DebRoy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY.** 2006. "A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease". *Science* **313**:220-223.
67. **Melotto M, Underwood W, He SY.** 2008. "Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases". *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**:101.
68. **Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP.** 2014. "The Bacterial Effector HopX1 Targets JAZ Transcriptional Repressors". *PLoS Biol.* **12**:2e1001792
69. **Zhou Z, Wu Y, Yang Y, Du M, Zhang X, Guo Y, Li C, Zhou J-M.** 2015. "An *Arabidopsis* Plasma Membrane Proton ATPase Modulates JA Signaling and Is Exploited by the *Pseudomonas syringae* Effector Protein AvrB for Stomatal Invasion". *Plant Cell* **27**:2032-2041.
70. **Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JDG.** 2007. "Pathological hormone imbalances". *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:372-379.
71. **Jiang S, Yao J, Ma K-W, Zhou H, Song J, He SY, Ma W.** 2013. "Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors". *PLoS Path.* doi:9(10): e1003715.
72. **Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT.** 2007. "AJ domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses". *Curr. Biol.* **17**:499-508.
73. **Rodríguez - Herva JJ, González - Melendi P, Cuartas - Lanza R, Antúnez - Lamas M, Río - Alvarez I, Li Z, López - Torrejón G, Díaz I, del Pozo JC, Chakravarthy S.** 2012. "A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses". *Cell. Microbiol.* **14**:669-681.
74. **Vierstra RD.** 2009. "The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**:385-397.
75. **Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C.** 2002. "Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold". *Tr. Biochem. Sci.* **27**:368-375.
76. **Miura K, Hasegawa PM.** 2010. "Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants". *Tr. Cell Biol.* **20**:223-232.

77. **Dielen AS, Badaoui S, Candresse T, German-Retana S.** 2010. "The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-see game". *Mol. Plant Pathol.* **11**:293-308.
78. **Komander D.** 2009. "The emerging complexity of protein ubiquitination". *Biochemical Society Transactions* **37**:937-953.
79. **Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S.** 2006. "*Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:14620-14625.
80. **Thilmoney R, Underwood W, He SY.** 2006. "Genome - wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157: H7". *Plant J.* **46**:34-53.
81. **Truman W, de Zabala MT, Grant M.** 2006. "Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance". *Plant J.* **46**:14-33.
82. **Canonne J, Marino D, Jauneau A, Pouzet C, Briere C, Roby D, Rivas S.** 2011. "The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense". *Plant Cell* **23**:3498-3511.
83. **Bonshtien A, Lev A, Gibly A, Debbie P, Avni A, Sessa G.** 2005. "Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:300-310.
84. **Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B.** 2011. "Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 Os11N3 gene". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**:1102-1113.
85. **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.
86. **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**:637-646.
87. **Doyle EL, Stoddard BL, Voytas DF, Bogdanove AJ.** 2013. "TAL effectors: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins". *Tr. Cell Biol.* **23**:390-398.
88. **Swings J, Vauterin L, Kersters K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*, p 121-156. Springer.
89. **Rajagopal L, Sundari CS, Balasubramanian D, Sonti RV.** 1997. "The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage". *FEBS letters* **415**:125-128.
90. **Swings JG, Civerolo EL.** 1993. "*Xanthomonas*". Chapman & Hall.
91. **Leyns F, De Cleene M, Swings J-G, De Ley J.** 1984. "The host range of the genus *Xanthomonas*". *Bot. Rev.* **50**:308-356.
92. **Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow MAX, Verdier V, Beer SV, Machado MA.** 2012. "Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology". *Mol. Plant Pathol.* **13**:614-629.
93. **Gardner MW, Kendrick JB.** 1923. "Bacterial spot of Tomato and Pepper". *Phytopathol.* **13**:307-315.
94. **Jones JB, Stall RE, Bouzar H.** 1998. "Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato". *Ann. Rev. Phytopathol.* **36**:41-58.
95. **Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shanharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB.** 2015. "Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge". *Mol. Plant Pathol.* **16**:907-920
96. **Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MT.** 2011. "Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper". *BMC Genomics* **12**:146.
97. **Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klosgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorholter FJ, Weber E, Puhler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O.** 2005. "Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence". *J. Bacteriol.* **187**:7254-7266.
98. **Schmidtke C, Findeiß S, Sharma CM, Kuhfuß J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U.** 2011. "Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions". *Nucleic Acids Res.* **10.1093/nar/gkr904**.

99. **Schmidtke C, Abendroth U, Brock J, Serrania J, Becker A, Bonas U.** 2013. "Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*". *PLoS Path.* **9**:e1003626.
100. **Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA.** 2009. "Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor". *Plant Physiol.* **149**:1017-1027.
101. **Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Cogež V, Bonas U, Büttner D.** 2010. "Functional characterization of the Xcs and Xps type III secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *New Phytol.* **187**:983-1002.
102. **Singer AU, Schulze S, Skarina T, Xu X, Cui H, Eschen-Lippold L, Egler M, Srikumar T, Raught B, Lee J.** 2013. "A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture". *PLoS Path.* **9**:e1003121.
103. **Teper D, Salomon D, Sunitha S, Kim JG, Mudgett MB, Sessa G.** 2014. "*Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector - triggered immunity". *Plant J.* **77**:297-309.
104. **Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen - Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D.** 2012. "Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity". *New Phytol.* **195**:894-911.
105. **White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R.** 2009. "The type III effectors of *Xanthomonas*". *Mol. Plant Pathol.* **10**:749-766.
106. **Thieme F.** 2006. Dissertation.
107. **Andreeva A, Howorth D, Chandonia J-M, Brenner SE, Hubbard TJP, Chothia C, Murzin AG.** 2008. "Data growth and its impact on the SCOP database: new developments". *Nucleic Acids Res.* **36**:D419-D425.
108. **Sawyer N, Chen J, Regan L.** 2013. "All repeats are not equal: a module-based approach to guide repeat protein design". *J. Mol Biol.* **425**:1826-1838.
109. **Escolar L, Van Den Ackerveken G, Pieplow S, Rossier O, Bonas U.** 2001. "Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT". *Mol. Plant Pathol.* **2**:287-296.
110. **Zhao B, Dahlbeck D, Krasileva KV, Fong RW, Staskawicz BJ.** 2011. "Computational and biochemical analysis of the *Xanthomonas* effector AvrBs2 and its role in the modulation of *Xanthomonas* type three effector delivery". *PLoS Path.* **10**:1371.
111. **Whalen MC, Richter T, Zakharevich K, Yoshikawa M, Al-Azzeh D, Adefioye A, Spicer G, Mendoza LL, Morales CQ, Klassen V.** 2008. "Identification of a host 14-3-3 protein that interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv". *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **72**:46-55.
112. **Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U.** 2003. "XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *J. Bacteriol.* **185**:7092-7102.
113. **Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB.** 2003. "*Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO - conjugated proteins in planta". *Mol. Microbiol.* **50**:377-389.
114. **Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U.** 2002. "Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island". *J. Bacteriol.* **184**:1340-1348.
115. **Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G, Bonas U.** 2007. "New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**:1250-1261.
116. **Roden JA, Belt B, Ross JB, Tachibana T, Vargas J, Mudgett MB.** 2004. "A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:16624-16629.
117. **Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol M, White FF, Preston JF, Vinatzer BA, Koebnik R, Setubal JC, Norman DJ, Staskawicz BJ, Jones JB.** 2011. "Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper". *BMC Genomics* **12**:146.
118. **Schonsky A.** 2013. Molekulare Charakterisierung neuer Typ III Effektorproteine sowie des Effektors XopB aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Halle (Saale), Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt
119. **Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D, Szczesny R, Thieme F, Bonas U.** 2012. "Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity". *New Phytol.* **195**:894-911.

120. Metz M, Dahlbeck D, Morales CQ, Sady BA, Clark ET, Staskawicz BJ. 2005. "The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*". *Plant J.* **41**:801-814.
121. Morales CQ, Posada J, Macneale E, Franklin D, Rivas I, Bravo M, Minsavage J, Stall RE, Whalen MC. 2005. "Functional analysis of the early chlorosis factor gene". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:477-486.
122. Teper D, Burstein D, Salomon D, Gershovitz M, Pupko T, Sessa G. 2015. "Identification of novel *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector proteins by a machine - learning approach". *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/mpp.12288.
123. Miller JH. 1972. "Experiments in molecular genetics".
124. Ausubel FR, Brent RE. 1995. "Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology". John Wiley & Sons.
125. Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyk MK, Byrde RJW, Fielding AH. 1984. "Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1". *EMBO J.* **3**:3323.
126. Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J. 1975. "Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*". *J. General Virol.* **26**:33-48.
127. Minsavage GV, Dahlbeck D, Whalen MC, Kearney B, Bonas U, Staskawicz BJ, Stall RE. 1990. "Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:41-47.
128. Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. 1989. "Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *Mol. General Gen. MGG* **218**:127-136.
129. Ménard R, Sansonetti PJ, Parsot C. 1993. "Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines *IpaB*, *IpaC*, and *IpaD* as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells". *J. Bacteriol.* **175**:5899-5906.
130. Boyer HW, Roulland-dussoix D. 1969. "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
131. Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler G, Villarroel R. 1980. "The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58". *Plasmid* **3**:212-230.
132. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J. 1985. "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants". *Nucleic Acids Res.* **13**:4777-4788.
133. James P, Halladay J, Craig EA. 1996. "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast". *Genetics* **144**:1425-1436.
134. Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow E, Boeke JD. 1996. "Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions". *Proc. Nat. Acad. Sci.* **93**:10315-10320.
135. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. "Molecular cloning". *Cold spring harbor laboratory press.*
136. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science* **230**:1350-1354.
137. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. "Primer3 - new capabilities and interfaces". *Nucleic Acids Res.* **40**:e115-e115.
138. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. "Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes". *PLoS ONE* **4**:e5553.
139. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability". *PLoS ONE* **3**:e3647.
140. Gietz RD, Schiestl RH. 2007. "High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method". *Nature Prot.* **2**:31-34.
141. Chitrakar R, Melotto M. 2010. "Assessing stomatal response to live bacterial cells using whole leaf imaging". *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/2185
142. Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, Bonas U. 1998. "hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host - specific hypersensitive reaction". *Mol. Microbiol.* **29**:1379-1390.
143. Bolstad BM. 2013. "preprocessCore: A collection of pre-processing functions". *R package version 1.*
144. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". *J. R. Statist. Soc.* **57**:289-300.

145. **Grau J, Wolf A, Reschke M, Bonas U, Posch S, Boch J.** 2013. "Computational predictions provide insights into the biology of TAL effector target sites". *PLoS Comput. Biol.* **9**:e1002962.
146. **Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Chang S, Haudenschild JS, Padmanaban A, Rodriguez-Zas S, Hartman GL, Ghabrial SA, Korban SS.** 2010. "Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of Glycine tomentella during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes". *Theoret. Appl. Gen.* **120**:1315-1333.
147. **Fu X-Z, Gong X-Q, Zhang Y-X, Wang Y, Liu J-H.** 2012. "Different transcriptional response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between kumquat and sweet orange with contrasting canker tolerance". *PLoS ONE* **7**:e41790.
148. **Alessandra L, Luca P, Adriano M.** 2010. "Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection". *J. Plant Physiol.* **167**:1398-1406.
149. **Grewal RK, Gupta S, Das S.** 2012. "*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice". *BMC Genomics* **13**:49.
150. **Socquet-Juglard D, Kamber T, Pothier JF, Christen D, Gessler C, Duffy B, Patocchi A.** 2013. "Comparative RNA-seq analysis of early-infected peach leaves by the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*". *PLoS ONE* **8**:e54196.
151. **Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D.** 2005. "Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress". *J. Exp. Bot.* **56**:2907-2914.
152. **Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D.** 2010. "Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)". *Plant Mol. Biol. Rep.* **28**:597-604.
153. **Chen L, Zhong H-y, Kuang J-f, Li J-g, Lu W-j, Chen J-y.** 2011. "Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions". *Planta* **234**:377-390.
154. **Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F.** 2010. "Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants". *Mol. Plant Pathol.* **11**:805-816.
155. **Taylor KW, Kim JG, Su XB, Aakre CD, Roden JA, Adams CM, Mudgett MB.** 2012. "Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence". *PLoS Path.* **8**:e1002768.
156. **Lovdal T, Lillo C.** 2009. "Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress". *Anal. Biochem.* **387**:238-242.
157. **Cohn JR, Martin GB.** 2005. "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato". *Plant J.* **44**:139-154.
158. **Exposito-Rodriguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA.** 2008. "Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process". *BMC Plant Biol.* **8**:131.
159. **Wan H, Yuan W, Ruan M, Ye Q, Wang R, Li Z, Zhou G, Yao Z, Zhao J, Liu S.** 2011. "Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper *Capsicum annuum* L.)". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **416**:24-30.
160. **Bin WS, Wei LK, Ping DW, Li Z, Wei G, Bing LJ, Gui PB, Jian WH, Feng CJ.** 2012. "Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR". *Mol. Breed.* **30**:1393-1400.
161. **Ballvora A, Pierre M, van den Ackerveken G, Schornack S, Rossier O, Ganai 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**:629-638.
162. **Bonas U, Conrads-Strauch J, Balbo I.** 1993. "Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*". *Mol. General Gen.* **MGG 238**:261-269.
163. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes". *Genome Biol.* **3**:research0034.
164. **Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF.** 2004. "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets". *Cancer Res.* **64**:5245-5250.
165. **Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP.** 2004. "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations". *Biotechnol. Lett.* **26**:509-515.

166. **Nguyen HP, Chakravarthy S, Velásquez AC, McLane HL, Zeng L, Nakayashiki H, Park D-H, Collmer A, Martin GB.** 2010. "Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**:991-999.
167. **Kim J-G, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G.** 2009. "Xanthomonas T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1". *Plant Cell* **21**:1305-1323.
168. **Pombo MA, Zheng Y, Fernandez-Pozo N, Dunham DM, Fei Z, Martin GB.** 2014. "Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins". *Genome Biol.* **15**:492.
169. **Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ERE, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP.** 2000. "Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex". *Nature* **408**:381-386.
170. **Coates JC.** 2003. "Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom". *Tr. Cell Biol.* **13**:463-471.
171. **Kuroda H, Yanagawa Y, Takahashi N, Horii Y, Matsui M.** 2012. "A comprehensive analysis of interaction and localization of *Arabidopsis* SKP1-like (ASK) and F-box (FBX) proteins". *PLoS ONE* **7**:e50009.
172. **Takahashi N, Kuroda H, Kuromori T, Hirayama T, Seki M, Shinozaki K, Shimada H, Matsui M.** 2004. "Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes". *Plant Cell Physiol.* **45**:83-91.
173. **Szczesny R, Büttner D, Escobar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U.** 2010. "Suppression of the AvrBs1 - specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase". *New Phytol.* **187**:1058-1074.
174. **Schonsky A.** 2013. Dissertation. "Molekulare Charakterisierung neuer Typ III Effektorproteine sowie des Effektors XopB aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". Halle (Saale), Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt
175. **Zeng W, Brutus A, Kremer JM, Withers JC, Gao X, Jones AD, He SY.** 2011. "A genetic screen reveals *Arabidopsis* stomatal and/or apoplastic defenses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000". *PLoS Path.* **7**:e1002291.
176. **Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U.** 2002. "Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*". *J. Bacteriol.* **184**:2389-2398.
177. **Wu H-Y, Liu K-H, Wang Y-C, Wu J-F, Chiu W-L, Chen C-Y, Wu S-H, Sheen J, Lai E-M.** 2014. "AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings". *Plant Meth.* **10**:1-16.
178. **Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G.** 2006. "Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation". *Cell* **125**:749-760.
179. **Lewis LA, Polanski K, de Torres-Zabala M, Jayaraman S, Bowden L, Moore J, Penfold CA, Jenkins DJ, Hill C, Baxter L.** 2015. "Transcriptional Dynamics Driving MAMP-Triggered Immunity and Pathogen Effector-Mediated Immunosuppression in *Arabidopsis* Leaves Following Infection with *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000". *Plant Cell* **27**:3038-3064.
180. **Thilmony R, Underwood W, He SY.** 2006. "Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7". *Plant J.* **46**:34-53.
181. **Anderson JC, Bartels S, Besteiro MAG, Shahollari B, Ulm R, Peck SC.** 2011. "*Arabidopsis* MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6 - mediated PAMP responses and resistance against bacteria". *Plant J.* **67**:258-268.
182. **He P, Shan L, Lin N-C, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T, Sheen J.** 2006. "Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity". *Cell* **125**:563-575.
183. **Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A.** 2006. "Early signaling events induced by elicitors of plant defenses". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:711-724.
184. **Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC.** 2012. "Hormonal modulation of plant immunity". *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **28**:489-521.
185. **Jiang Y, Yu D.** 2015. "WRKY transcription factors: links between phytohormones and plant processes". *Sci. China Life Sci.* **58**:501-502.
186. **Gao Q-M, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A.** 2011. "Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins". *Plant physiol.* **155**:464-476.

187. **Higashi K, Ishiga Y, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y.** 2008. "Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*". *Mol. Gen. & Genom.* **279**:303-312.
188. **Hu Y, Dong Q, Yu D.** 2012. "*Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*". *Plant Sci.* **185-186**:288-297.
189. **Li J, Brader G, Palva ET.** 2004. "The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense". *Plant Cell* **16**:319-331.
190. **Ohn T, Chiang Y-C, Lee DJ, Yao G, Zhang C, Denis CL.** 2007. "CAF1 plays an important role in mRNA deadenylation separate from its contact to CCR4". *Nucleic Acids Res.* **35**:3002-3015.
191. **Kwon T-M, Yi Y-B, Nam J-S.** 2011. "Overexpression of AtCAF1, CCR4-associated factor 1 homologue in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates wounding-mediated disease resistance". *J. Plant Biotechnol.* **38**:278-284.
192. **Liang W, Li C, Liu F, Jiang H, Li S, Sun J, Wu X, Li C.** 2009. "The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses". *Cell Res.* **19**:307-316.
193. **Shah J.** 2003. "The salicylic acid loop in plant defense". *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**:365-371.
194. **Kim J-G, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MB.** 2008. "XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves". *Plant Cell* **20**:1915-1929.
195. **Pandey SP, Roccaro M, Schön M, Logemann E, Somssich IE.** 2010. "Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of ". *Plant Journal* **64**:912-923.
196. **Zhou J, Wang J, Zheng Z, Fan B, Yu J-Q, Chen Z.** 2015. "Characterization of the promoter and extended C-terminal domain of *Arabidopsis* WRKY33 and functional analysis of tomato WRKY33 homologues in plant stress responses". *J. Exp. Bot.* doi 10.1093/jxb/erv221.
197. **Khurshid M.** 2012. "Functional analysis of ORA47, a key regulator of jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis*". University of Leiden.
198. **Moffat CS, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR.** 2012. "ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*". *PLoS ONE* **7**:e35995-e35995.
199. **Zheng X-y, Spivey NW, Zeng W, Liu P-P, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X.** 2012. "Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation". *Cell Host & Microbe* **11**:587-596.
200. **de Torres - Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bögre L, Grant M.** 2007. "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease". *EMBO J.* **26**:1434-1443.
201. **Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN.** 2007. "*Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology". *Proc. Nat. Acad. Sci.* **104**:20131-20136.
202. **Vogel MO, Moore M, König K, Pecher P, Alsharafa K, Lee J, Dietz K-J.** 2014. "Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*". *Plant Cell* **26**:1151-1165.
203. **Oñate-Sánchez L, Anderson JP, Young J, Singh KB.** 2007. "AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense". *Plant Physiol.* **143**:400-409.
204. **Kim J-G, Stork W, Mudgett MB.** 2013. "*Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SIERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth". *Cell Host & Microbe* **13**:143-154.
205. **Ton J, Flors V, Mauch-Mani B.** 2009. "The multifaceted role of ABA in disease resistance". *Tr. Plant Sci.* **14**:310-317.
206. **Liang S, Lu K, Wu Z, Jiang S-C, Yu Y-T, Bi C, Xin Q, Wang X-F, Zhang D-P.** 2015. "A link between magnesium-chelatase H subunit and sucrose nonfermenting 1 (SNF1)-related protein kinase SnRK2.6/OST1 in *Arabidopsis* guard cell signalling in response to abscisic acid". *J. Exp. Bot.* **66**:6355-6369.
207. **Merilo E, Jalakas P, Kollist H, Brosché M.** 2015. "The role of ABA recycling and transporter proteins in rapid stomatal responses to reduced air humidity, elevated CO₂, and exogenous ABA". *Mol. Plant* **8**:657-659.

208. **Ding ZJ, Yan JY, Li GX, Wu ZC, Zhang SQ, Zheng SJ.** 2014. "WRKY41 controls *Arabidopsis* seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA". *Plant J.* **79**:810-823.
209. **Ho Y-P, Tan CM, Li M-Y, Lin H, Deng W-L, Yang J-Y.** 2013. "The AvrB_AvrC domain of AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required to elicit plant defense responses and manipulate ABA homeostasis". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**:419-430.
210. **Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D.** 2011. "The roles of ABA in plant-pathogen interactions". *J. Plant Res.* **124**:489-499.
211. **Brossa R, López-Carbonell M, Jubany-Marí T, Alegre L.** 2011. "Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient *Arabidopsis* plants". *J. Plant Growth Reg.* **30**:322-333.
212. **Beck M, Zhou J, Faulkner C, MacLean D, Robatzek S.** 2012. "Spatio-temporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting". *Plant Cell* **24**:4205-4219.
213. **Tateda C, Zhang Z, Shrestha J, Jelenska J, Chinchilla D, Greenberg JT.** 2014. "Salicylic acid regulates *Arabidopsis* microbial pattern receptor kinase levels and signaling". *Plant Cell* **26**:4171-4187.
214. **Petutschnig EK, Jones AME, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V.** 2010. "The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation". *J. Biol. Chem.* **285**:28902-28911.
215. **Wan J, Tanaka K, Zhang X-C, Son GH, Brechenmacher L, Nguyen THN, Stacey G.** 2012. "LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* **160**:396-406.
216. **Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, Lorenzo GD.** 2013. "Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development". *Fr. Plant Sci.* **4**:10.3389.
217. **Kohorn BD, Kohorn SL, Saba NJ, Martinez VM.** 2014. "Requirement for pectin methyl esterase and preference for fragmented over native pectins for wall-associated kinase-activated, EDS1/PAD4-dependent stress response in *Arabidopsis*". *J. Biol. Chem.* **289**:18978-18986.
218. **Gramegna G, Modesti V, Savatin DV, Sicilia F, Cervone F, De Lorenzo G.** 2016. "GRP-3 and KAPP, encoding interactors of WAK1, negatively affect defense responses induced by oligogalacturonides and local response to wounding". *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erv563.
219. **Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Müller K, Felix G.** 2013. "The receptor-like protein ReMAX of *Arabidopsis* detects the microbe-associated molecular pattern eMax from *Xanthomonas*". *Plant Cell* **25**:2330-2340.
220. **Solé M, Scheibner F, Hoffmeister A-K, Hartmann N, Hause G, Rother A, Jordan M, Lautier M, Arlat M, Büttner D.** 2015. "*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Secretes Proteases and Xylanases via the Xps Type II Secretion System and Outer Membrane Vesicles". *J. Bacteriol.* **197**:2879-2893.
221. **Rasmussen MW, Roux ME, Petersen M, Mundy J.** 2012. "MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity". *Fr. Plant Sci.* **3**.
222. **Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG.** 2004. "The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis". *Plant Physiol.* **135**:1113-1128.
223. **Rowland O, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieux F, Tracy FE, Durrant WE, Fritz-Laylin L, Nekrasov V, Sjolander K, Yoshioka H, Jones JD.** 2005. "Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato". *Plant Cell* **17**:295-310.
224. **Nicaise V, Joe A, Jeong Br, Korneli C, Boutrot F, Westedt I, Staiger D, Alfano JR, Zipfel C.** 2013. "*Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7". *EMBO J.* **32**:701-712.
225. **Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, Ba H, Zhou J, Zhang Y.** 2012. "Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2". *Cell Host & Microbe* **11**:253-263.
226. **Boudsocq M, Sheen J.** 2013. "CDPKs in immune and stress signaling". *Tr. Plant Sci.* **18**:30-40.
227. **Wrzaczek M, Brosché M, Salojärvi J, Kangasjärvi S, Idänheimo N, Mersmann S, Robatzek S, Karpiński S, Karpińska B, Kangasjärvi J.** 2010. "Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*". *BMC Plant Biol.* **10**:95.

228. **Wrzaczek M, Vainonen JP, Stael S, Tsiatsiani L, Gauthier A, Kaufholdt D, Bollhöner B, Lamminmäki A, Staes A, Gevaert K.** 2015. "GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in *Arabidopsis*". *EMBO J.* **34**:55-66.
229. **Yang H, Yang S, Li Y, Hua J.** 2007. "The *Arabidopsis* BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death". *Plant Physiol.* **145**:135-146.
230. **Bolton MD.** 2009. "Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**:487-497.
231. **Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S.** 2006. "Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves". *Planta* **225**:1-12.
232. **Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS.** 2014. "Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense". *Fr. Plant Sci.* **5**:10.3389.
233. **Fuciman M, Enriquez MM, Polívka Ts, Dall'Osto L, Bassi R, Frank HA.** 2012. "Role of xanthophylls in light harvesting in green plants: a spectroscopic investigation of mutant LHCII and Lhcb pigment-protein complexes". *J. Physical Chem.* **116**:3834-3849.
234. **Göhre V, Jones AME, Sklenár J, Robatzek S, Weber APM.** 2012. "Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**:1083-1092.
235. **Wittenberg G, Levitan A, Klein T, Dangoor I, Keren N, Danon A.** 2014. "Knockdown of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast protein disulfide isomerase 6 results in reduced levels of photoinhibition and increased D1 synthesis in high light". *Plant J.* **78**:1003-1013.
236. **de Torres Zabala M, Littlejohn G, Jayaraman S, Studholme D, Bailey T, Lawson T, Tillich M, Licht D, Bölter B, Delfino L.** 2015. "Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors". *Nature Plants* doi:10.1038/nplants.2015.74
237. **Zhao H, Xu L, Su T, Jiang Y, Hu L, Ma F.** 2015. "Melatonin regulates carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana*". *J. Pin. Res.* **59**:109-119.
238. **Sonnewald S, Priller JPR, Schuster J, Glickmann E, Hajirezaei M-R, Siebig S, Mudgett MB, Sonnewald U.** 2012. "Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors". *PLoS ONE* **7**:e51763.
239. **Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B.** 2010. "Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens". *Nature* **468**:527-532.
240. **La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T.** 2004. "Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways". *Immunol. Rev.* **198**:267-284.
241. **Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, Xiao Y, Sundin L, Goeminne G, Kim H, Cross J, Morreel K, Araujo P.** 2013. "Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*". *Science* **341**:1103-1106.
242. **Mészáros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardóczy V, Teige M, Koncz C, Peck S.** 2006. "The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin". *Plant J.* **48**:485-498.
243. **Wieczorek K, Golecki B, Gerdes L, Heinen P, Szakasits D, Durachko DM, Cosgrove DJ, Kreil DP, Puzio PS, Bohlmann H.** 2006. "Expansins are involved in the formation of nematode - induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*". *Plant J.* **48**:98-112.
244. **Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee JA, Bourdon M, Alhattab R, Lowe C, Pascal S, Lessire R.** 2010. "Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition". *Plant Physiol.* **153**:1539-1554.
245. **Bagniewska-Zadworna A, Barakat A, Łakomy P, Smoliński DJ, Zadworny M.** 2014. "Lignin and lignans in plant defence: Insight from expression profiling of cinnamyl alcohol dehydrogenase genes during development and following fungal infection in *Populus*". *Plant Sci.* **229**:111-121.
246. **Kulkarni MM.** 2011. "Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system". *Curr. Prot. Mol. Biol.*:25B. 10.21-25B. 10.17.
247. **Qin C, Yu C, Shen Y, Fang X, Chen L, Min J, Cheng J, Zhao S, Xu M, Luo Y.** 2014. "Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization". *Proc. Nat. Acad. Sci.* **111**:5135-5140.
248. **MacQuarrie KL, Fong AP, Morse RH, Tapscott SJ.** 2011. "Genome-wide transcription factor binding: beyond direct target regulation". *Tr. Gen.* **27**:141-148.

249. **Nühse TS, Bottrill AR, Jones AME, Peck SC.** 2007. "Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses". *Plant J.* **51**:931-940.
250. **Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F, Anderson JC, Ishihama Y, Peck SC, Shinozaki K.** 2013. "Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*". *Science Signal.* **6**:rs8-rs8.
251. **Ivanusic D, Heinisch JJ, Eschricht M, Laube U, Denner J.** 2015. "Improved split-ubiquitin screening technique to identify surface membrane protein-protein interactions". *BioTechniques* **58**:63-73.
252. **Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H.** 2008. "A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins". *Mol. & Cell. Proteom.* **7**:282-289.
253. **Dekkers BJ, Willems L, Bassel GW, van Bolderen-Veldkamp RP, Ligterink W, Hilhorst HW, Bentsink L.** 2012. "Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds". *Plant Cell Physiol.* **53**:28-37.
254. **Gao S, Xu T, Qi M, Liu Y, Li H, Lv S, Li J, Li T.** 2012. "Evaluation of the expression of internal control transcripts by real-time RT-PCR analysis during tomato flower abscission". *Afr. J. Biotechnol.* **11**:12983-12989.
255. **Liu M, Jiang J, Han X, Qiao G, Zhuo R.** 2014. "Validation of reference genes aiming accurate normalization of qRT-PCR data in *Dendrocalamus latiflorus Munro*". *PLoS ONE* **9**:e87417.
256. **Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F.** 2010. "Evaluation of reference genes for quantitative reverse - transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants". *Mol. Plant Pathol.* **11**:805-816.
257. **Wan H, Yuan W, Ruan M, Ye Q, Wang R, Li Z, Zhou G, Yao Z, Zhao J, Liu S, Yang Y.** 2011. "Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum L.*)". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**:24-30.
258. **Wieczorek P, Wrzesińska B, Obrepalska-Stęplowska A.** 2013. "Assessment of reference gene stability influenced by extremely divergent disease symptoms in *Solanum lycopersicum L.*". *J. Virol. Meth.* **194**:161-168.
259. **Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R.** 2005. "Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* **139**:5-17.
260. **Yang L, Pan A, Jia J, Ding J, Chen J, Cheng H, Zhang C, Zhang D.** 2005. "Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes". *J. Agric. Food Chem.* **53**:183-190.
261. **Die JV, Rowland LJ.** 2013. "Superior cross-species reference genes: a blueberry case study". *PLoS ONE* **8**:e73354.
262. **Graeber K, Linkies A, Wood ATA, Leubner-Metzger G.** 2011. "A guideline to family-wide comparative state-of-the-art quantitative RT-PCR analysis exemplified with a *Brassicaceae* cross-species seed germination case study". *Plant Cell* **23**:2045-2063.
263. **Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, Verbrugghe P, Kalaydjieva L, Bleuler S, Laule O.** 2011. "RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization". *BMC Genom.* **12**:156.
264. **Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O.** 2008. "Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR". *Plant Cell* **20**:1734-1735.
265. **Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ.** 1996. "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box". *Cell* **86**:263-274.
266. **Murphy TD.** 2003. "Drosophila skpA, a component of SCF ubiquitin ligases, regulates centrosome duplication independently of cyclin E accumulation". *J. Cell Sci.* **116**:2321-2332.
267. **Zhang Y, Wang C, Lin Q, Gao F, Ma Y, Zhang M, Lin Y, Ma Q, Hua X.** 2015. "Genome-wide analysis of phylogeny, expression profile and sub-cellular localization of SKP1-Like genes in wild tomato". *Plant Sci.* **238**:105-114.
268. **Zhao D.** 2003. "Members of the *Arabidopsis*-SKP1-like Gene Family Exhibit a Variety of Expression Patterns and May Play Diverse Roles in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* **133**:203-217.
269. **Chen H, Zou Y, Shang Y, Lin H, Wang Y, Cai R, Tang X, Zhou J-M.** 2008. "Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants". *Plant Physiol.* **146**:368-376.
270. **Conaway RC, Brower CS, Conaway JW.** 2002. "Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation". *Science* **296**:1254-1258.

271. **Stefanowicz K, Lannoo N, Van Damme E.** 2015. "Plant F-box proteins: judges between life and death". *Crit. Rev. Plant Sci.* **34**:523-552.
272. **Yu H, Zhang Y, Moss BL, Bargmann BOR, Wang R, Prigge M, Nemhauser JL, Estelle M.** 2015. "Untethering the TIR1 auxin receptor from the SCF complex increases its stability and inhibits auxin response". *Nature Plants* doi:10.1038/nplants.2014.30.
273. **Osteryoung KW, Pyke KA.** 2014. "Division and dynamic morphology of plastids". *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**:443-472.
274. **Nomura H, Komori T, Kobori M, Nakahira Y, Shiina T.** 2008. "Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure". *Plant J.* **53**:988-998.
275. **Kim S, Choi HI, Ryu HJ, Park JH, Kim MD, Kim SY.** 2004. "ARIA, an *Arabidopsis* ARM repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component". *Plant Physiol.* **136**:3639-3648.
276. **Lim CW, Baek W, Jung J, Kim J-H, Lee SC.** 2015. "Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses". *Int. J. Mol. Sci* **16**:15251-15270.
277. **Xing Y, Jia W, Zhang J.** 2007. "AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*". *J. Exp. Bot.* **58**:2969-2981.
278. **Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K.** 2006. "Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂". *Nature Cell Biol.* **8**:391-397.
279. **Kwak JM, Pascal M.** 2008. "The clickable guard cell, version II: interactive model of guard cell signal transduction mechanisms and pathways". *Amer. Soc. Plant Biologists.* **6**:e0114:2008
280. **Tian W, Hou C, Ren Z, Pan Y, Jia J, Zhang H, Bai F, Zhang P, Zhu H, He Y.** 2015. "A molecular pathway for CO₂ response in *Arabidopsis* guard cells". *Nature Comm.* doi:10.1038/ncomms7057
281. **Zhou Y-P, Duan J, Fujibe T, Yamamoto KT, Tian C-E.** 2012. "AtIQM1, a novel calmodulin-binding protein, is involved in stomatal movement in *Arabidopsis*". *Plant Mol. Biol.* **79**:333-346.
282. **Eun S-O, Lee Y.** 2000. "Stomatal opening by fusicoccin is accompanied by depolymerization of actin filaments in guard cells". *Planta* **210**:1014-1017.
283. **Lee S, Ishiga Y, Clermont K, Mysore KS.** 2013. "Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens". *PeerJ* **1**:e34.
284. **Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA.** 2009. "*Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor". *Plant Physiol.* **149**:1017-1027.
285. **Sawinski K, Mersmann S, Robatzek S, Böhmer M.** 2013. "Guarding the green: pathways to stomatal immunity". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**:626-632.
286. **Khokon MAR, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y.** 2010. "Yeast elicitor-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in *Arabidopsis*". *Plant & Cell Physiol.* **51**:1915-1921.
287. **Tal M, Nevo Y.** 1973. "Abnormal stomatal behavior and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato". *Biochem. Genet.* **8**:291-300.
288. **O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ.** 2001. "Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen". *Plant J.* **25**:315-323.
289. **Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O.** 2006. "The wound response in tomato—role of jasmonic acid". *J. Plant Physiol.* **163**:297-306.

6 Anhang

Anhang 1: BLAST-Analysen der 52 mittels Hefe-Dihybrid-Analysen identifizierten potentiellen Interaktionspartner von Xopl

Homologie	Anzahl cDNA-Fragmente	Akzessionsnummer	DNA-Homologie ¹ [%]	Länge ORF ² [bp]	Lokalisierung ³
Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) / -Oxygenase [S]	6 ^a	XM_010327541	93	1320	k.A.
Protein mit einer B3-Domäne [S]	3 ^a	XM_010329408.1	92	2499	Zellkern
CHP-reiches Zinkfingerprotein-ähnlich [S]	2 ^a	XM_004241415.2	88	1113	k.A.
Argininosuccinat-Dehydrogenase [S]	2 ^a	XM_006337997.1	89	1572	k.A.
Sigma Faktor [S]	2 ^a	XM_004246595.2	91	1692	k.A.
FTSH9 Protease [S]	2 ^a	XM_004234649.2	87	1971	k.A.
Serin/Threonin-Proteinkinase, HT1-ähnlich [S]	2 ^a	XM_004243616.2	92	1239	Zellkern, Plasmamembran
3,4 Dihydroxy-butatone Kinase [S]	2 ^a	XM_006347300.1	88	1785	k.A.
CoA-Ligase [S]	2 ^a	XM_010315987.1	88	1952	k.A.
Transkriptionsfaktor bHLH-ähnlich [S]	3 ^{a,b}	XM_004247975.2	71	1296	Zellkern
Thioredoxin [S]	1 ^a	XM_004231060.2	87	54	Chloroplasten
Ribonukleoprotein [S]	1 ^a	XM_006367684.1	86	1773	k.A.
40S ribosomales Protein (S-15-ähnlich) [S]	1 ^a	XM_006350601.1	95	459	Zytoplasma
Epidermis-spez. sekretiertes Glucoprotein (EP1-ähnlich) [S]	1 ^a	XM_004244227.1	87	927	k.A.
Splicing-Faktor U2af [S]	1 ^a	XM_010313945.1	92	1723	Zellkern
Auxin-abhängiger Faktor 19 (ARF19) [S]	1 ^a	XM_010322983	96	745	Zellkern
GAPDH [S]	1 ^a	XM_004238398.2	63	1353	k.A.
uncharakterisiertes Protein LOC101249172 [S]	1 ^a	XM_010321764.1	90	804	k.A.
PS Rkt.zentrum Untereinheit III [S]	1 ^a	XM_004233151.2	89	687	Chloroplasten
Aspartatische Proteinase 1 [S]	1 ^a	XM_004240496.2	85	1257	Extrazellularraum
Calmodulin 5 [S]	1 ^a	XM_004249296.2	94	450	Zellkern, Zytoplasma
DEK [S]	1 ^a	XM_004243994	92	2387	k.A.
Catalase [Ca]	1 ^a	AY128694.1	94	1479	Zellkern, Plastiden
Bifunktionale L-3 Cyanoalanin-Synthase [S]	1 ^a	XM_004229861.2	88	885	Chloroplasten
Oxygen-evolving enhancer 2 [S]	1 ^a	XM_006366570.1	77	666	k.A.
Antifungales Protein [Ca]	1 ^a	AF33379.1	96	258	k.A.
PIP-Transferprotein [S]	1 ^a	XM_006346022.1	97	1863	Golgi-Apparat, Plasmamembran
Hop1-interagierendes Protein THIOI [S]	1 ^a	XM_010321742.1	94	2483	Chloroplasten
uncharakterisiertes Protein [S]	1 ^a	XM_010320715.1	84	2595	k.A.
Nukleolin-ähnliches Protein [S]	1 ^a	XM_004246461.2	87	1458	k.A.
ABC-Transporter [S]	1 ^a	XM_004245431.2	88	2141	Zellkern, Zytoplasma
Acetylglutamat-Kinase [S]	1 ^a	XM_004249835.2	86	1044	Zytoplasma
Chlorophyll-AB-Bindeprotein [S]	1 ^a	XM_010319111.1	88	804	k.A.
FRIGIDA-ähnliches Protein [S]	2 ^{a,b}	XM_006358950.1	87	1644	k.A.
ARM repeat protein interacting with ABF2-ähnlich (ARIA) [S]	1 ^a	XP_004247167.1	86	978	Zellkern

^a – Interaktor von BD_{Gal4}Xopl; ^b – Interaktor von BD_{Gal4}XoplΔF-Box; ¹ – Homologie zu Paprika- oder Tomatengenomen von www.solgenomics.net; ² – Länge des ORF basierend auf www.solgenomics.net; ³ – vorhergesagte Lokalisierung laut www.solgenomics.net bzw. orthologer Proteine aus *A. thaliana* laut www.arabidopsis.org; [S] – *S. lycopersicum*; [Ca] – *C. annuum*; k.A.: keine Angaben

Anhang 2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Vektor	Resistenz	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
pGGA1	Spec	Binaïrvektor mit 35S-Promotor, C-terminaler Fusion mit GFP, <i>ccdB</i> -Kassette	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGA8	Spec	Binaïrvektor mit 35S-Promotor, N-terminaler Fusion mit 4x c-Myc, <i>ccdB</i> -Kassette	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGA28	Spec	Binaïrvektor mit 35S-Promotor, N-terminaler Fusion mit YFP (AS 1-155) und 3x HA, <i>ccdB</i> -Kassette	diese Arbeit
pGGA30	Spec	Binaïrvektor mit 35S-Promotor, N-terminaler Fusion mit YFP (AS 156-243) und 4x c-Myc, <i>ccdB</i> -Kassette	diese Arbeit
pGGE12	Kan	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotor, N-terminaler Fusion mit GT, <i>ccdB</i> -Kassette	H. Prochaska und U. Bonas, unpubliziert
pGGE4	Kan	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotor, N-terminaler Fusion mit 3x His, <i>ccdB</i> -Kassette	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pEGG(WS)	Kan	pENTR-D-Derivat mit Golden-Gate-kompatibler <i>ccdB</i> -Kassette; mit Stop	T. Schreiber und U. Bonas, unpubliziert
pDEST15	Amp	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotor, N-terminaler Fusion mit GST; GATEWAY-kompatible <i>ccdB</i> -Kassette, T7-Terminator	Invitrogen
pUC57 (Bsal)	Amp	Vektor zur <i>blunt-end</i> -Ligation von PCR-Produkten; pUC19-Derivat; <i>lacZ</i> in MCS; <i>Bsal</i> -Schnittstelle in Amp-Resistenzgen entfernt (R. Morbitzer)	Genscript, USA
pACT2.2 <i>gfwy</i>	Amp	Expressionsvektor für Hefe mit ADH1-Promotor, N-terminaler Fusion mit AD _{GAL4} , GATEWAY-kompatible <i>ccdB</i> -Kassette; Derivat von pGADT7; Leucin-Auxotrophiemarker	G. Caldwell, Addgene Plasmid 11346
pGADT7	Amp	Expressionsvektor für Hefe mit ADH1-Promotor, N-terminaler Fusion mit AD _{GAL4} , GATEWAY-kompatible <i>ccdB</i> -Kassette; Derivat von pOK1	Clontech
pOK1	Spec	<i>sac B</i> ; <i>sac Q</i> ; <i>mob RK2</i> ; <i>oriRK2</i> ; <i>Smr</i>	(Huguet et al. 1998)
pBRM	Gent	Golden Gate-kompatibles Derivat von pBBR1MCS-5; <i>lac</i> -Promoter	(Szczesny et al. 2010)
Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pUC57: <i>xopI</i>	Amp	<i>xopI</i> in pUC57	O. Müller, Diplomarbeit
pUC57: <i>xopI</i> _{ΔF-Box}	Amp	<i>xopI</i> _{ΔF-Box} in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>Ca_{EST}Skp1</i>	Amp	<i>Ca_{EST}Skp1</i> in pUC57	O. Müller, Diplomarbeit
pUC57: <i>SiSkp1</i>	Amp	<i>SiSkp1</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>CaSkp1</i>	Amp	<i>CaSkp1</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiB3DP</i>	Amp	<i>SiB3DP</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiALP</i>	Amp	<i>SiALP</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiCaM5</i>	Amp	<i>SiCaM5</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>CaAFP</i>	Amp	<i>CaAFP</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiARC6</i>	Amp	<i>SiARC6</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>CaCAT</i>	Amp	<i>CaCAT</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiARIA</i>	Amp	<i>SiARIA</i> in pUC57	diese Arbeit
pUC57: <i>SiAktin11</i>	Amp	<i>SiAktin11</i> in pUC57	diese Arbeit
pEGG: <i>xopI</i>	Kan	<i>xopI</i> in pEGG	diese Arbeit
pEGG: <i>xopI</i> _{ΔF-Box}	Kan	<i>xopI</i> _{ΔF-Box} in pEGG	diese Arbeit
pEGG: <i>Ca_{EST}Skp1</i>	Kan	<i>Ca_{EST}Skp1</i> in pEGG	diese Arbeit
pEGG: <i>SiSkp1</i>	Kan	<i>SiSkp1</i> in pEGG	diese Arbeit
pEGG: <i>CaSkp1</i>	Kan	<i>CaSkp1</i> in pEGG	diese Arbeit
pEGG: <i>SiB3DP</i>	Kan	<i>SiB3DP</i> in pEGG	diese Arbeit

ORF-Modul zur Golden-Gate-Klonierung

ORF-Modul zur Gateway-Klonierung

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Verwendung	Referenz	
pEGG:SIALP	Kan	SIALP in pEGG	ORF-Modul zur Gateway-Klonierung	diese Arbeit	
pEGG:SiCaM5	Kan	SiCaM5 in pEGG		diese Arbeit	
pEGG:CaAFP	Kan	CaAFP in pEGG		diese Arbeit	
pEGG:SIARC6	Kan	SIARC6 in pEGG		diese Arbeit	
pEGG:CaCAT	Kan	CaCAT in pEGG		diese Arbeit	
pEGG:SIARIA	Kan	SIARIA in pEGG		diese Arbeit	
pEGG:SIAktin11	Kan	SIAktin11 in pEGG		diese Arbeit	
pGGE4:Ca _{EST} Skp1	Kan	Ca _{EST} Skp1 in pGGE4		Expression von His6-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGGE12:xopl	Kan	xopl in pGGE12		Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGGA8:xopl	Spec	xopl in pGGA8		Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation und Expression von Myc4-Fusionproteinen für Ko-IP-Experimente in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA8:xopl _{ΔF-Box}	Spec	xopl _{ΔF-Box} in pGGA8			diese Arbeit
pGGA2:SiSkp1	Spec	SiSkp1 in pGGA2		Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation und Expression von GFP-Fusionproteinen für Ko-IP-Experimente in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA2:CaSkp1	Spec	CaSkp1 in pGGA2			diese Arbeit
pGGA2:om	Spec	ORF-Modul in pGGA2 (Expression von GFP)		Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation und Expression von GFP-Fusionsproteinen für Transkriptomanalysen in <i>S. lycopersicum</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pGGA2:avrBs3	Spec	avrBs3 in pGGA2			A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pGGA2:xopB	Spec	xopB in pGGA2			H. Prochaska und U. Bonas, unpubliziert
pGGA2:xopG	Spec	xopG in pGGA2	H. Prochaska und U. Bonas, unpubliziert		
pGGA2:xopl	Spec	xopl in pGGA2	diese Arbeit		
pGGA2:xopL	Spec	xopL in pGGA2	N. Adlung und U. Bonas, unpubliziert		
pGGA2:xopQ	Spec	xopQ in pGGA2	N. Adlung und U. Bonas, unpubliziert		
pGGA2:xopS	Spec	xopS in pGGA2	diese Arbeit		
pGGA1:SI3DP	Spec	SI3DP in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SIALP	Spec	SIALP in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SiCaM5	Spec	SiCaM5 in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:CaAFP	Spec	CaAFP in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SIARC6	Spec	SIARC6 in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:CaCAT	Spec	CaCAT in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SIARIA	Spec	SIARIA in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SIAktin11	Spec	SIAktin11 in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:SiSkp1	Spec	SiSkp1 in pGGA1	diese Arbeit		
pGGA1:om	Spec	ORF-Modul in pGGA1 (Expression von GFP)	Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation und Expression von GFP-Fusionsproteinen für Lokalisierungsstudien in <i>N. benthamiana</i>	A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert	
pGGA28:xopl	Spec	xopl in pGGA28	Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation und Expression von YFPN-Fusionsproteinen für Lokalisierungsstudien in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit	

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pGGA28: <i>xop</i> _{ΔF-Box}	Spec	<i>xop</i> _{ΔF-Box} in pGGA28	Agrobacterium -vermittelte transiente Transformation und Expression von YFPN-Fusionsproteinen für Lokalisierungsstudien in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA28: <i>avrBs3</i>	Spec	<i>avrBs3</i> in pGGA28		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pGGA30: <i>SlSkp1</i>	Spec	<i>SlSkp1</i> in pGGA30	Agrobacterium -vermittelte transiente Transformation und Expression von YFPC-Fusionsproteinen für Lokalisierungsstudien in <i>N. benthamiana</i>	diese Arbeit
pGGA30: <i>SlB3DP</i>	Spec	<i>SlB3DP</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>SlALP</i>	Spec	<i>SlALP</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>SlCaM5</i>	Spec	<i>SlCaM5</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>CaAFP</i>	Spec	<i>CaAFP</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>SlARC6</i>	Spec	<i>SlARC6</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>CaCAT</i>	Spec	<i>CaCAT</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>SlARIA</i>	Spec	<i>SlARIA</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>SlAktin11</i>	Spec	<i>SlAktin11</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>laminC</i>	Spec	<i>laminC</i> in pGGA30		diese Arbeit
pGGA30: <i>importin-α</i>	Spec	<i>Importin-α</i> in pGGA30		A. Banik und U. Bonas, unpubliziert
pGBT9: <i>xopI</i>	Amp	<i>xopI</i> in pGBT9		A. Sorgatz und U. Bonas, unpubliziert
pGBT9: <i>xop</i> _{ΔF-Box}	Amp	<i>xop</i> _{ΔF-Box} in pGBT9		S. Mücke, Bachelorarbeit
pGBT9: <i>stopp</i>	Amp	Synthese von BD _{Gall4}		S. Mücke, Bachelorarbeit
pGBKT7: <i>ASK1</i>	Kan	ASK1 in pGBKT7		S. Mücke, Bachelorarbeit
pGBKT7: <i>ASK2</i>	Kan	ASK2 in pGBKT7		M. Quint, IPB Halle
pGBKT7: <i>ASK3</i>	Kan	ASK3 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK4</i>	Kan	ASK4 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK5</i>	Kan	ASK5 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK7</i>	Kan	ASK7 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK8</i>	Kan	ASK8 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK9</i>	Kan	ASK9 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK10</i>	Kan	ASK10 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK11</i>	Kan	ASK11 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK12</i>	Kan	ASK12 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK13</i>	Kan	ASK13 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK14</i>	Kan	ASK14 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK16</i>	Kan	ASK16 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK17</i>	Kan	ASK17 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK18</i>	Kan	ASK18 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK19</i>	Kan	ASK19 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK20A</i>	Kan	ASK20A in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK20B</i>	Kan	ASK20B in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	
pGBKT7: <i>ASK21</i>	Kan	ASK21 in pGBKT7	M. Quint, IPB Halle	

Expression von BD_{Gall4}-Fusionsproteinen für Interaktionsstudien in *S. cerevisiae*

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Verwendung	Referenz	
pACT2.2gtwy:xopI	Amp	xopI in pACT2.2gtwy	Expression von AD _{Gall4} -Fusionsproteinen für Interaktionsstudien in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit	
pACT2.2gtwy:xopI Δ F-Box	Amp	xopI Δ F-Box in pACT2.2gtwy		diese Arbeit	
pGADT7::SIB3DP	Amp	SIB3DP in pGADT7		diese Arbeit	
pACT2.2gtwy::SIALP	Amp	SIALP in pACT2.2gtwy		diese Arbeit	
pGADT7::SiCaM5	Amp	SiCaM5 in pGADT7		diese Arbeit	
pACT2.2gtwy::CaAFP	Amp	CaAFP in pACT2.2gtwy		diese Arbeit	
pACT2.2gtwy::SIARC6	Amp	SIARC6 in pACT2.2gtwy		diese Arbeit	
pGADT7::CaCAT	Amp	CaCAT in pGADT7		diese Arbeit	
pACT2.2gtwy::SIARIA	Amp	SIARIA in pACT2.2gtwy		diese Arbeit	
pGADT7::SIaktin11	Amp	SIaktin11 in pGADT7		diese Arbeit	
pGADT7::SISkp1	Amp	SISkp1 in pGADT7		diese Arbeit	
pACT2.2gtwy::stopp	Amp	Stopp in pACT2.2gtwy (Synthese von AD _{Gall4})		diese Arbeit	
pOK1:xopI	Spec	1 Kb flankierende Regionen 5' und 3' von xopI in pOK1		Plasmid zu Deletionsmutagenese von xopI in Xcv-50-10	diese Arbeit
pBRM:xopI	Gent	xopI in pBRM		Expression von XopI in Xcv 85-10 Δ xopI	diese Arbeit
pLAFR6::avrBs4	Tet	avrBs4 in pLAFR6		Expression von AvrBs4 in Xcv 85-10	(Schreiber et al. 2015)
pGGX1::avrBs3	Spec	avrBs3 in pGGX1		Expression von AvrBs3 in Xcv 85-10	(Bonas et al. 1993)

Anhang 3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
Solyc06g074620.2-F	CCATGTCGTTTGAAGGATATATCCCAG	qRT-PCR-Primer
Solyc06g074620.2-R	CTGCCCTGTCCAGACTGGCTAAGC	qRT-PCR-Primer
Solyc03g083470.2-F	CTAGCAAAGGGCTGTCAAAGAAAG	qRT-PCR-Primer
Solyc03g083470.2-R	GATAAATATTCTGACACAAGGGCTCGTC	qRT-PCR-Primer
Solyc01g009320.1-F	ACAAAAGGCGGTTACAAGTGC	qRT-PCR-Primer
Solyc01g009320.1-R	AGCTTTGACACAACCTCCAACCTCTCA	qRT-PCR-Primer
Solyc12g005640.1-F	ATGGCTGTTGGAATTGGCGTCA	qRT-PCR-Primer
Solyc12g005640.1-R	TCTTTCTTGAGAGATGTGTGCCA	qRT-PCR-Primer
Solyc08g008280.2-F	AATATTTCAAAGAAGAGAAAATCACAGCCC	qRT-PCR-Primer
Solyc08g008280.2-R	TGGAACAAAGGAGAAATGACATGCTGC	qRT-PCR-Primer
Solyc08g014570.2-F	AAAAGGGACGGCCACAGATGGTAC	qRT-PCR-Primer
Solyc08g014570.2-R	GCACAGTAAAGATGGCAGCAAAAG	qRT-PCR-Primer
Solyc12g009220.1-F	CTACAAACTACTTTTGAATCAACTGGATCTC	qRT-PCR-Primer
Solyc12g009220.1-R	GATCATAGGATAAGTGAATTTGTTGTGGGG	qRT-PCR-Primer
Solyc07g048060.1-F	CTGTTCTTCACTGGACTTACTATCCAAAG	qRT-PCR-Primer
Solyc07g048060.1-R	CCAAACTTGATTAACCTAGTCTTCCAG	qRT-PCR-Primer
Solyc03g082370.1-F	CTTTGATGCGCTTTCTGCTGAAC	qRT-PCR-Primer
Solyc03g082370.1-R	AAAACAGTGAACGCCGTGCAATTC	qRT-PCR-Primer
Solyc05g009120.2-F	CCCTAGCAAGGAAGTTGAATGGGG	qRT-PCR-Primer
Solyc05g009120.2-R	CCGAAACAACCTCTAAAGCGAGATC	qRT-PCR-Primer
Solyc06g060690.2-F	GAAAATTTAGCCTCAGTGGATTCTATAAAAC	qRT-PCR-Primer
Solyc06g060690.2-R	CCAAGAGCGAGGGCACGAAA	qRT-PCR-Primer
Solyc04g054690.2-F	TGAAATTTAGGGGCATAACATGACAG	qRT-PCR-Primer
Solyc04g054690.2-R	GTTGAATGAGACGTTGTTGACTGACC	qRT-PCR-Primer
Solyc03g112030.1-F	GAACAGACACAACCTCCACTCTTTTAG	qRT-PCR-Primer
Solyc03g112030.1-R	CACCAAATGGAATTAACCTCGAAATGTAACC	qRT-PCR-Primer
Solyc01g009320.1-F	GAAGAAACAAGCATAAGATCATCGAATC	qRT-PCR-Primer
Solyc01g009320.1-R	TCCACCAGCATGTTTCAAGAA	qRT-PCR-Primer
Solyc01g108870.2-F	GAACATAGGGTGATAGCAAGCTC	qRT-PCR-Primer
Solyc01g108870.2-R	CAGAGGCTCAACCATTACATAGTGA	qRT-PCR-Primer
Solyc05g018510.2-F	CAAAAGATTTGAATTTCCCTGCTAAGT	qRT-PCR-Primer
Solyc05g018510.2-R	CAACACTGCAACATACATGGATCCCA	qRT-PCR-Primer
Solyc06g066230.2-F	AGGCACAAAGCGAAGTGAGACAAG	qRT-PCR-Primer
Solyc06g066230.2-R	TGCCCATGTATTGACTAGTACT	qRT-PCR-Primer
Solyc07g048060.1-F	GATTCAGATTGGGTAGCTTGGGGT	qRT-PCR-Primer
Solyc07g048060.1-R	AACTTGATTAACCTAGTCTTCCA	qRT-PCR-Primer
Solyc09g056430.2-F	ATTTCTCAGTCGACTGGTGGTGTTA	qRT-PCR-Primer
Solyc09g056430.2-R	TGCTTCGGATCCTTTCCAGTA	qRT-PCR-Primer
Solyc11g005760.1-F	AGCAGGTTGGCAAGTTAGGACTATA	qRT-PCR-Primer
Solyc11g005760.1-R	GCTGAAATCTGTGGCATCTAAATAAG	qRT-PCR-Primer
Solyc11g044940.1-F	TGGGATAAGAAGGTAACCATTGCAGT	qRT-PCR-Primer
Solyc11g044940.1-R	CTATTAGCAGGTCCAAGCAAGGAAA	qRT-PCR-Primer
Solyc09g098380.1-F	TCTACACAGCAATGAAAGACCCTTCAA	qRT-PCR-Primer
Solyc09g098380.1-R	TAATTTGGTCAATGGGCATACCTTAGAGTTA	qRT-PCR-Primer
SI_LRR22-F	AAGATTGGAGTTGCCATTGGAGC	qRT-PCR-Primer für <i>SILRR22</i>
SI_LRR22-R	ATCGCGATGAATGATCGGTGGAGT	qRT-PCR-Primer für <i>SILRR22</i>
SI_UGT-F	GCAAAGGGTTGATAGAGATCCAAAGG	qRT-PCR-Primer für <i>SIUGT</i>
SI_UGT-R	CAATGAGGAAATGCCACCACAGGTAC	qRT-PCR-Primer für <i>SIUGT</i>
SI_ACT-F	GAGCGTGGTTACTCGTTCA	qRT-PCR-Primer für <i>SIAktin</i>
SI_ACT-R	CTAATATCCACGTCACATTTCT	qRT-PCR-Primer für <i>SIAktin</i>
SI_GAPDH-F	CTGCTCTCAGTAGCCAACAC	qRT-PCR-Primer für <i>SIGAPDH</i>
SI_GAPDH-R	CTTCTCCAATAGCAGAGGTTT	qRT-PCR-Primer für <i>SIGAPDH</i>
SI_UBI-F	GGACGGACGTACTCTAGCTGAT	qRT-PCR-Primer für <i>SIUbiquitin</i>
SI_UBI-R	AGCTTTGACCTCAAGGGTA	qRT-PCR-Primer für <i>SIUbiquitin</i>
SI_EF-1 α -F	GGTGGTTTTGAAGCTGGTATCTCC	qRT-PCR-Primer für <i>SIEF-1α</i>
SI_EF-1 α -R	CCAGTAGGGCCAAAGGTCACA	qRT-PCR-Primer für <i>SIEF-1α</i>
SI_TAF6-F	CCAATAAGCGCTGCCACAAC	qRT-PCR-Primer für <i>SITAF6</i>
SI_TAF6-R	TGGTCCTTGTGTGCTTACTGGC	qRT-PCR-Primer für <i>SITAF6</i>
SI_UP1-F	ACATGGAAGCTGTTAATGCCGGT	qRT-PCR-Primer für <i>SIUP1</i>
SI_UP1-R	GATGTAGACCTTGTAGTTTACCTGTACCAT	qRT-PCR-Primer für <i>SIUP1</i>
SI_IMP- β -F	TTGTTTCTGCTTGGACCTGCT	qRT-PCR-Primer für <i>SIIMP-β</i>
SI_IMP- β -R	GTTGGCCACAGAGATGGTTTCT	qRT-PCR-Primer für <i>SIIMP-β</i>
SI_PHD-F	GGGATGGGATGGAGCGTAGAGA	qRT-PCR-Primer für <i>SIPHD</i>
SI_PHD-R	CATCACTCTCTTTCAGCCTC	qRT-PCR-Primer für <i>SIPHD</i>
SI_COX-F	GCCTGCCACATCTGAAGAAAGC	qRT-PCR-Primer für <i>SICOX</i>
SI_COX-R	GCCATTCTCCCTCTGCTCATT	qRT-PCR-Primer für <i>SICOX</i>
SI_CLP1-F	GTCTTGGGTCAGGAAAACTTTGCAG	qRT-PCR-Primer für <i>SICLP1</i>

Name	Sequenz	Verwendung
SI_CLP1-R	CCATGTTAAGGTTGCCACAATTAAGTTTTTG	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> CLP1
SI_UCH-F	GGTGTGCAGGTTGAGGAGTTGT	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> UCH
SI_UCH-R	GCACAAATGGCTCAGGCTTTGC	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> UCH
SI_PTBL-F	GCTGCAAAGGACGCTTTAGAGG	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> PTBL
SI_PTBL-R	AACAGCACCAGTAGCGGCATAG	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> PTBL
SI_UP2-F	TCGCTTGCATGGGAAGTTGTCT	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> UP2
SI_UP2-R	AGGAAAAGGCTTGTGGTCCCC	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> UP2
SI_LSM7-F	GGTGAAGACAAGTGGTTGGAACAC	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> LSM7
SI_LSM7-R	CGTCTGGCTGAACAAAAGGATTGG	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> LSM7
SI_ACP-F	TCGAAACCCTAGGCTCATCGGA	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> ACP
SI_ACP-R	TCTTGTGCGCTTCATTGTCTGGA	qRT-PCR-Primer für <i>SI</i> ACP
Ca_LRR22-F	AAGATTGGAGATAGCCATTGGAGC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> LRR22
Ca_LRR22-R	ATCGCGATGAATGATTGGTGGAGT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> LRR22
Ca_TFT4-F	TTAAAATGGGGCAGAGAGGAAAG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> TFT4
Ca_TFT4-R	CACTGAAAAGTTAAGGGCAAGTCC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> TFT4
Ca_ACT-F	TGTTATGGTAGGGATGGGTC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> Aktin
Ca_ACT-R	TTCTCTCTATTTGCCTTGGG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> Aktin
Ca_TUB-F	GAGGGTGAGTGAGCAGTTC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> Tubulin
Ca_TUB-R	CTTCATCGTCATCTGCTGTC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> Tubulin
Ca_EF-1 α -F	TGAAGAATGGTGATGCTGGC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> EF-1 α
Ca_EF-1 α -R	GACAACACCAACAGCAACAG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> EF-1 α
Ca_GAPDH-F	ATGATGATGTGAAAGCAGCG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> GAPDH
Ca_GAPDH-R	TTTCAACTGGTGGCTGCTAC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> GAPDH
Ca_TAF6-F	CCAATAAGCGCTGCCACAAC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> TAF6
Ca_TAF6-R	TGGTCCATGTGTGTTACTGGC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> TAF6
Ca_UP1-F	ACACGGGAGCTGTTAATACCAGT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UP1
Ca_UP1-R	GATGTAGACCTGTAGTTTACCTGTACCAT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UP1
Ca_IMP- β -F	TTGTTTGTTCCTTGGACCTGCT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> IMP- β
Ca_IMP- β -R	GTTAGCCACAGAAATGTTTCCT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> IMP- β
Ca_PHD-F	AAGATGAAGAGGAGGGCTTGGATG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> PHD
Ca_PHD-R	CAAGATGGACACTTGTACTGCTTAATATG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> PHD
Ca_COX-F	GCTTGCTGCGCCTAAAGAAAGC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> COX
Ca_COX-R	GCCATTTCCCTCTGCTCATTC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> COX
Ca_CLP1-F	GTCTTGGGTCAGGAAAACCTTTGTAG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> CLP1
Ca_CLP1-R	CCATGTTAAGGTTCCCACAATTAGATATTTG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> CLP1
Ca_UCH-F	GGTGTGCAGGTTGAGGAGTTGT	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UCH
Ca_UCH-R	GCACAAATGGCTCCGGTCTTGC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UCH
Ca_UP2-F	TGTCTTGGGTGCTGTGTAAATCCTC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UP2
Ca_UP2-R	AGGGAATGACTTGTGGTCCCC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> UP2
Ca_LSM7-F	GGTGAAGACAAGTGGTAGGAACAC	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> LSM7
Ca_LSM7-R	CGTCTGGCTGGAGAAAAGGATTCCG	qRT-PCR-Primer für <i>Ca</i> LSM7
<i>xop1</i> -F	TTTGGTCTCTTATGCCGATCACCCGAACCGGTCTG	Amplifikation von <i>xop1</i> aus <i>Xcv</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>xop1</i> -R(ws)	TTTGGTCTCTAAGCTTCACATGTCCATATACCTGCGCGACACAGTC	Amplifikation von <i>xop1</i> mit Stopp aus <i>Xcv</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>xop1</i> -R(wos)	TTTGGTCTCTCACCCATGTCCATATACCTGCGCGACACAGTC	Amplifikation von <i>xop1</i> ohne Stopp aus <i>Xcv</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>xop1</i> Δ_{F-Box} -F	TTTGGTCTCTTATGTATCCGGACGATGAGGATCGCAGCGAG	Amplifikation von <i>xop1</i> ohne F-Box (ohne AS 1-120) aus <i>Xcv</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
Δ <i>xop1</i> -5'-F	TGGGGATCCAGAGCTGCCTGGTGCCTTG	Amplifikation von 1 Kb <i>upstream</i> von <i>xop1</i> aus <i>Xcv</i> für Deletionsmutagenese
Δ <i>xop1</i> -5'-R	CGTAAGCTTAGCAGCGGCATCGAGTTAG	Amplifikation von 1 Kb <i>upstream</i> von <i>xop1</i> aus <i>Xcv</i> für Deletionsmutagenese
Δ <i>xop1</i> -3'-F	GTAAGCTTGAGTGTGGTCTGGTCACGCAG	Amplifikation von 1 Kb <i>downstream</i> von <i>xop1</i> aus <i>Xcv</i> für Deletionsmutagenese
Δ <i>xop1</i> -3'-R	CCGTCTAGAATCATCGGCGTCACCACC	Amplifikation von 1 Kb <i>downstream</i> von <i>xop1</i> aus <i>Xcv</i> für Deletionsmutagenese
<i>Ca_skp1</i> -F	TTTGGTCTCTTATGTCTGCCCAAAGAAAATCTTGTGAAG	Amplifikation von <i>Caskp1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_skp1</i> -R(ws)	TTTGGTCTCTAAGCTTCACTCAAAGGCCCAAGCATTCTCCCTC	Amplifikation von <i>Caskp1</i> mit Stopp mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_skp1</i> -R(wos)	TTTGGTCTCTCACCCCTCAAAGGCCCAAGCATTCTCCCTC	Amplifikation von <i>Caskp1</i> mit Stopp mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Sl_skp1</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGCTTCTCAAAGATGATCGTGTGAAG	Amplifikation von <i>Slskp1</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Sl_skp1</i> -R(ws)	TTTGGTCTCTAAGCTTCACTCAAATGCCCAAGCATTCTCCCTC	Amplifikation von <i>Slskp1</i> mit Stopp mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Sl_skp1</i> -R(wos)	TTTGGTCTCTCACCCCTCAAATGCCCAAGCATTCTCCCTC	Amplifikation von <i>Slskp1</i> mit Stopp mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen

Name	Sequenz	Verwendung
<i>SI_skp1</i> -R(wos)	TTTGGTCTCTCACCTCAAATGCCAAGCATTCTCCCTC	Amplifikation von <i>SIskp1</i> mit Stopp mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_B3DP</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGAGTCAAGATTTGCATGAATGGAC	Amplifikation von <i>SIB3DP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_B3DP</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATTGGTCTTTTCCAGTTGATCTGG	Amplifikation von <i>SIB3DP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ALP</i> -F	TTTGGTCTCTTATGACTGAAGTCGCGAGCAAC	Amplifikation von <i>SIALP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ALP</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATTGCAATATTTCTTGTAATCTTGGAAATGTCCC	Amplifikation von <i>SIALP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_CaM5</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGCGGATCAGCTGACGGATG	Amplifikation von <i>SICaM5</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_CaM5</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCACTTGGCCATGACCTTAACAAC	Amplifikation von <i>SICaM5</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_AFP</i> -F	TTTGGTCTCTTATGAAGTTTCAGGTGGTAATTTGGTGC	Amplifikation von <i>CaAFP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_AFP</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGTTGGGACCGCCATTATTCTTG	Amplifikation von <i>CaAFP</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ARC6</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGAGGCATTAACACACCTAAGC	Amplifikation von <i>SIARC6</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ARC6</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATCGCGATTTAAGAACGGCTCC	Amplifikation von <i>SIARC6</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_CAT</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGATCCTTACAAGTACCGTCCG	Amplifikation von <i>CaCAT</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>Ca_CAT</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCATATGCTTGGTCTCACATTAAAGCC	Amplifikation von <i>CaCAT</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ARIA</i> -F	TTTGGTCTCTTATGGAGAACCAGAACTTACCGAG	Amplifikation von <i>SIARIA</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_ARIA</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGACTCGCATGTCATTTGAATAGCCC	Amplifikation von <i>SIARIA</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_Aktin11</i> -F	TTTGGTCTCATATGGCAGATGGTGAGGATATCCAG	Amplifikation von <i>SIAktin11</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen
<i>SI_Aktin11</i> -R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGAAGCATTTCTGTGGACGATGG	Amplifikation von <i>SIAktin11</i> mit flankierenden <i>Bsal</i> -Schnittstellen

Anhang 4 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung der Transkriptomdaten von zur Auswertung von Experiment 1 ausgeschlossenen *S. lycopersicum*-Genen. Aufgeführte Gene wurden ausgeschlossen, da eine signifikante Änderung der Transkriptmenge nach Infektion mit *Xcv* 85-10 bereits 45 Minuten nach der Infektion beobachtet wurde (3.1.1).

Anhang 5 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung der Transkriptomdaten von zur Auswertung von Experiment 2 ausgeschlossenen *S. lycopersicum*-Genen. Aufgeführte Gene wurden ausgeschlossen, da eine signifikante Änderung der Transkriptmenge direkt nach der Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* beobachtet wurde (3.1.1).

Anhang 6 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung aller anhand von Experiment 1 identifizierten, mutmaßlich T3E-abhängig regulierter *S. lycopersicum*-Gene (3.1.1). Dargestellt sind alle regulierten Gene, sowie eine Aufteilung nach persistent bzw. zu frühen oder späten Infektionszeitpunkten T3E-abhängig regulierten Genen.

Anhang 7 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung aller anhand von Experiment 2 identifizierten, mutmaßlich an der Pathogenabwehr beteiligter *S. lycopersicum*-Gene (3.1.1). Dargestellt sind alle regulierten potentiellen Abwehrgene, sowie eine Aufteilung nach persistenten bzw. zu frühen oder späten Infektionszeitpunkten regulierten Abwehrgenen.

Anhang 8 auf Daten-CD

Diagramme zur Darstellung der Berechnung der Anreicherung von GO-Termen in Gruppen regulierter *S. lycopersicum*-Gene.

Anhang 9 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung aller Gene, welche anhand von Experiment 3 als abhängig bzw. spezifisch durch einzelne *Xcv*-T3E-Proteine differentiell exprimiert identifiziert wurden (3.1.5).

Anhang 10 auf Daten-CD

Tabellarische Darstellung potentieller AvrBs3-Bindestellen im Genom von *S. lycopersicum*.

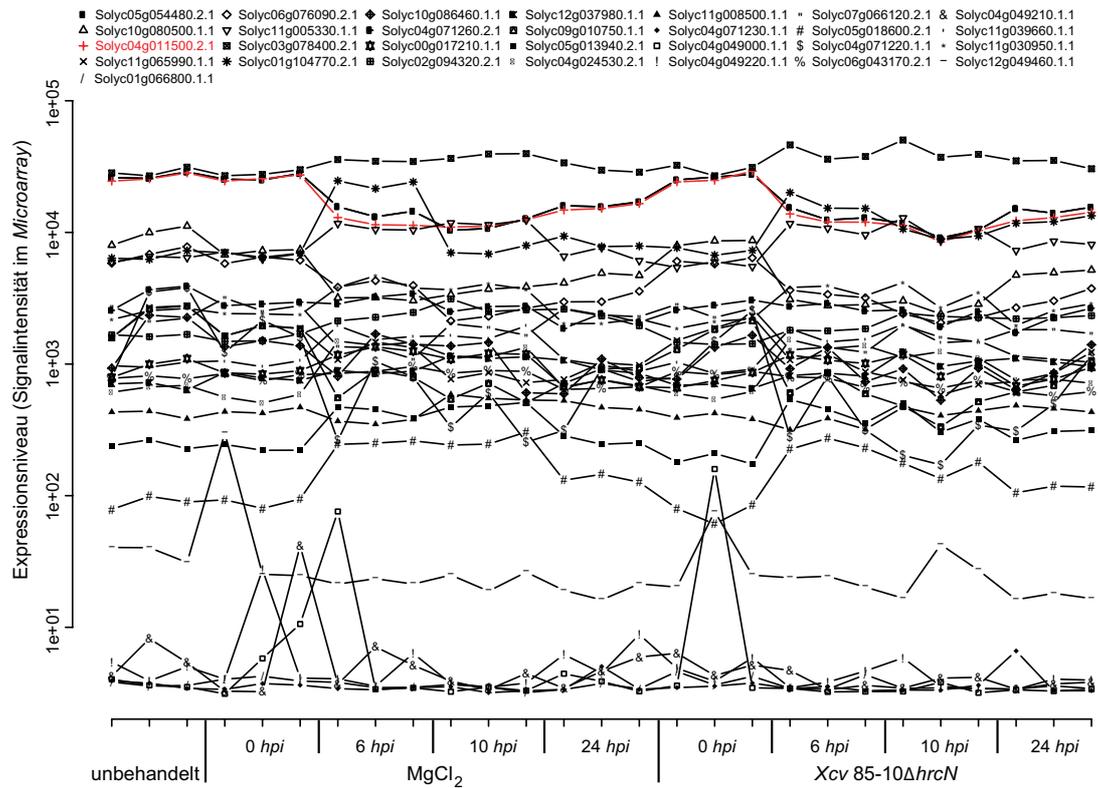
Anhang 11: Auf den Transkriptomdaten basierende Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum* unter Xcv-Infektionsbedingungen

Rang	Gennummer	K _v ^a	ME ^b	SD ^c	Annotation ^d
1	Solyc10g006100.2	0.060	858	52	<i>Transcription initiation factor TFIID subunit 6</i>
2	Solyc07g062920.2	0.063	623	39	<i>Genomic DNA chromosome 5 TAC clone K19P17</i>
3	Solyc01g111780.2	0.064	1,254	80	<i>Importin beta-2 subunit</i>
4	Solyc06g051420.2	0.080	1,537	122	<i>PHD finger family protein</i>
5	Solyc12g057120.1	0.080	3,234	258	<i>Subunit VIb of cytochrome c oxidase</i>
6	Solyc01g009290.2	0.082	1,276	105	<i>Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1</i>
7	Solyc09g018730.2	0.083	2,166	180	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 1 protein</i>
8	Solyc02g088110.2	0.085	2,367	201	<i>Polypyrimidine tract-binding protein-like</i>
9	Solyc08g060860.2	0.086	1,032	88	<i>Genomic DNA chromosome 3 P1 clone MSJ11</i>
10	Solyc09g009640.2	0.087	4,74	414	<i>U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7</i>
11	Solyc04g015370.2	0.088	2,584	228	<i>Acyl carrier protein</i>
12	Solyc08g005140.2	0.088	1,192	105	<i>Serine/threonine-protein kinase BUD32</i>
13	Solyc02g062920.2	0.089	4,256	380	<i>Splicing factor U2AF large subunit</i>
14	Solyc10g076910.1	0.090	624	56	<i>Pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase-like protein</i>
15	Solyc03g121980.2	0.091	1,831	166	<i>Developmentally-regulated GTP-binding protein 2</i>
16	Solyc01g097140.2	0.092	5,273	486	<i>Dual-specificity tyrosine-phosphatase CDC25</i>
17	Solyc07g007040.2	0.092	2,611	241	<i>Zinc finger CCCH-type with G patch domain-containing protein</i>
18	Solyc06g069310.2	0.093	5,571	519	<i>Nuclear transcription factor Y subunit B-6</i>
19	Solyc03g078020.2	0.094	446	42	<i>Peptide chain release factor 1</i>
20	Solyc10g078180.1	0.095	1,526	144	<i>Cyclin family protein</i>
21	Solyc02g089230.2	0.095	2,392	227	<i>DSBA oxidoreductase family protein</i>
22	Solyc06g036720.2	0.095	1,45	138	<i>HLA-B associated transcript 3 (Fragment)</i>
23	Solyc01g109620.2	0.095	6,851	652	<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit I</i>
24	Solyc07g064510.2	0.096	6,678	642	<i>Polyadenylate-binding protein 2</i>
25	Solyc11g071930.1	0.096	639	61	<i>DnaJ homolog subfamily C member 8</i>
26	Solyc06g084000.2	0.097	1,933	187	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
27	Solyc04g009230.2	0.097	1,799	175	<i>Mitosis protein Dim1</i>
28	Solyc06g073870.2	0.099	2,349	231	<i>DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4</i>
29	Solyc09g055760.2	0.099	1,421	141	<i>T-snare</i>
30	Solyc12g005780.1	0.100	1,138	114	<i>TraB family protein</i>
31	Solyc04g008610.2	0.101	457	46	<i>Histone acetyltransferase</i>
32	Solyc04g015300.2	0.101	521	52	<i>Alpha/beta hydrolase</i>
33	Solyc10g005800.2	0.101	3,475	351	<i>CWC15 homolog</i>
34	Solyc12g021130.1	0.101	240	24	<i>3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like</i>
35	Solyc01g079330.2	0.101	1,16	117	<i>ATP dependent RNA helicase</i>
36	Solyc07g041550.2	0.101	1,066	108	<i>RNA polymerase-associated protein Ctr9 homolog</i>
37	Solyc03g059420.2	0.102	1,704	173	<i>Sister chromatid cohesion 2</i>
38	Solyc11g071950.1	0.102	767	78	<i>Unknown Protein</i>
39	Solyc12g099570.1	0.103	854	88	<i>Heat shock factor binding protein 2</i>
40	Solyc10g044900.1	0.103	160	16	<i>CASTOR protein (Fragment)</i>
41	Solyc10g084270.1	0.103	969	100	<i>Importin a-2 subunit</i>
42	Solyc06g016750.2	0.103	1,356	140	<i>Transcription factor (Fragment)</i>
43	Solyc02g092380.2	0.104	699	72	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>
44	Solyc05g052960.2	0.104	1,149	119	<i>BTB/POZ domain containing protein expressed</i>
45	Solyc06g009860.1	0.104	1,044	108	<i>Mercaptopyruvate sulfurtransferase-like protein</i>
46	Solyc10g008950.2	0.104	977	102	<i>Guanylate-binding protein 10</i>
47	Solyc10g055450.1	0.105	1,503	157	<i>Ubiquitin-protein ligase 4</i>
48	Solyc05g006580.2	0.105	518	54	<i>Unknown protein</i>
49	Solyc03g121310.2	0.105	3,802	398	<i>RWD domain-containing protein</i>
50	Solyc09g010180.2	0.106	1,85	196	<i>TPR repeat-containing protein</i>

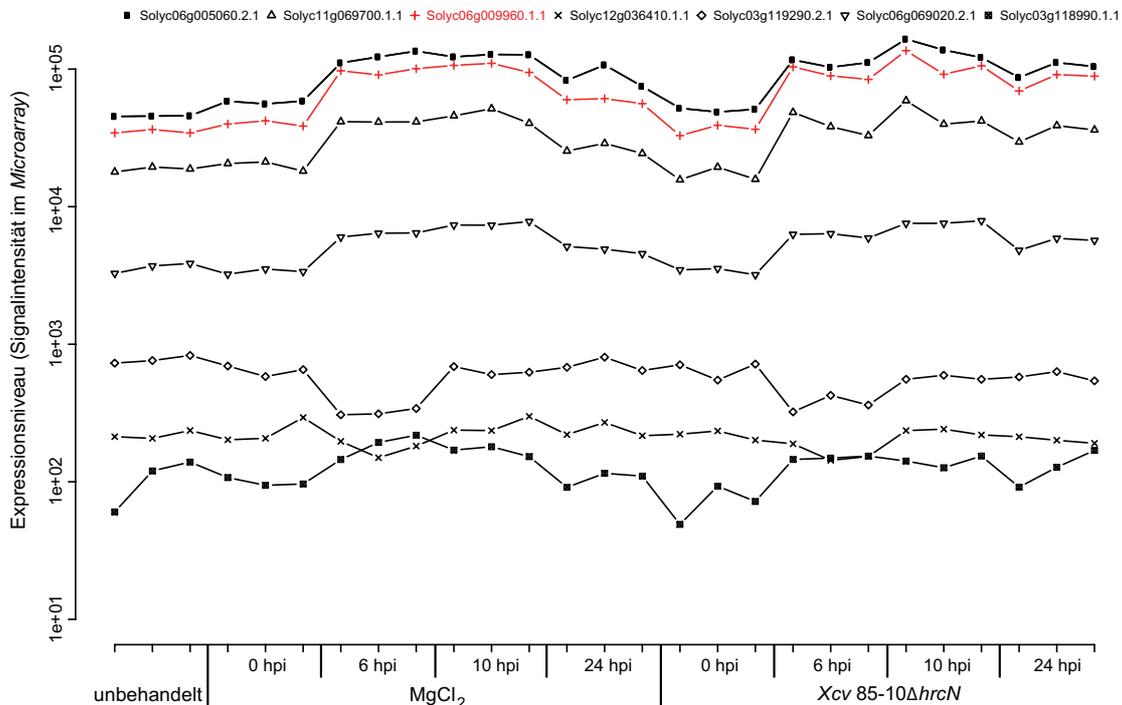
^a – Variationskoeffizient K_v basierend auf Datensatz 2 der Transkriptomdaten ^b – Mittlere Expression anhand aller normalisierten Expressionswerte in Datensatz 2 (Zeitpunkte, Behandlung, Replikate) ^c – Standardabweichung der ME ^d – Annotation in *S. lycopersicum* basierend auf Version ITAG2.4

Anhang 12: Transkriptmengen der *Aktin*- und *EF-1 α* -Genfamilie aus *S. lycopersicum* anhand von Datensatz 2 der Transkriptomstudien

A *Aktin*-Genfamilie



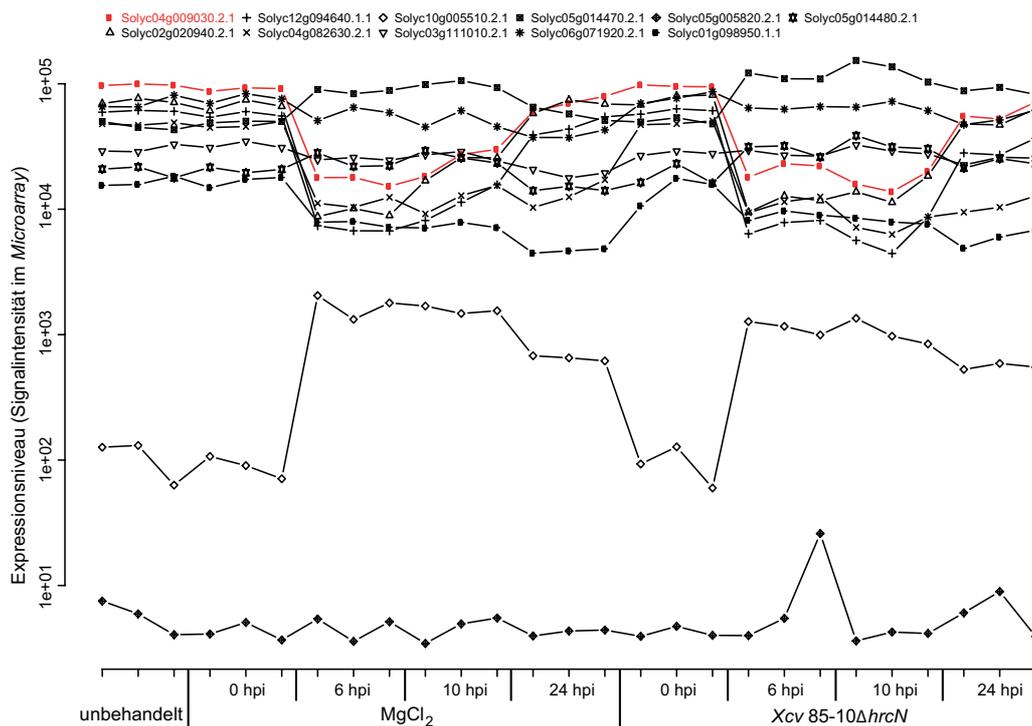
B *EF1- α* -Genfamilie



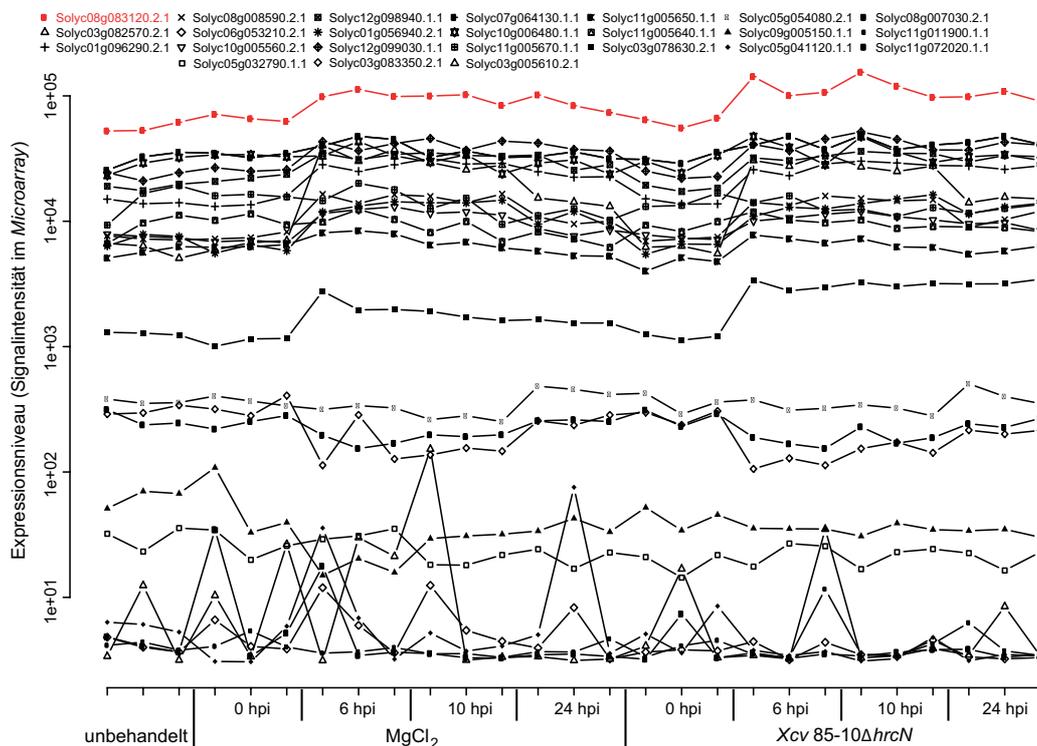
Dargestellt sind mit Hilfe der *Microarray*-Analysen bestimmte Transkriptmengen von Genen der (A) *Aktin*- und (B) *EF-1 α* -Genfamilie aus *S. lycopersicum* direkt bzw. sechs, zehn und 24 Stunden nach der Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* bzw. der Infiltration mit einer $MgCl_2$ -Lösung oder unbehandeltem Blattmaterial (Datensatz 2). Dargestellt sind Expressionswerte von je drei biologischen Replikaten. Mitglieder der Genfamilien wurden anhand der aktuellen Annotation (ITAG Version 2.4) identifiziert. Für Analysen dieser Arbeit herangezogene traditionell verwendete Referenzgene sind rot dargestellt.

Anhang 13: Transkriptmengen der *GAPDH*- und *Ubiquitin*-Genfamilie aus *S. lycopersicum* anhand von Datensatz 2 der Transkriptomstudien

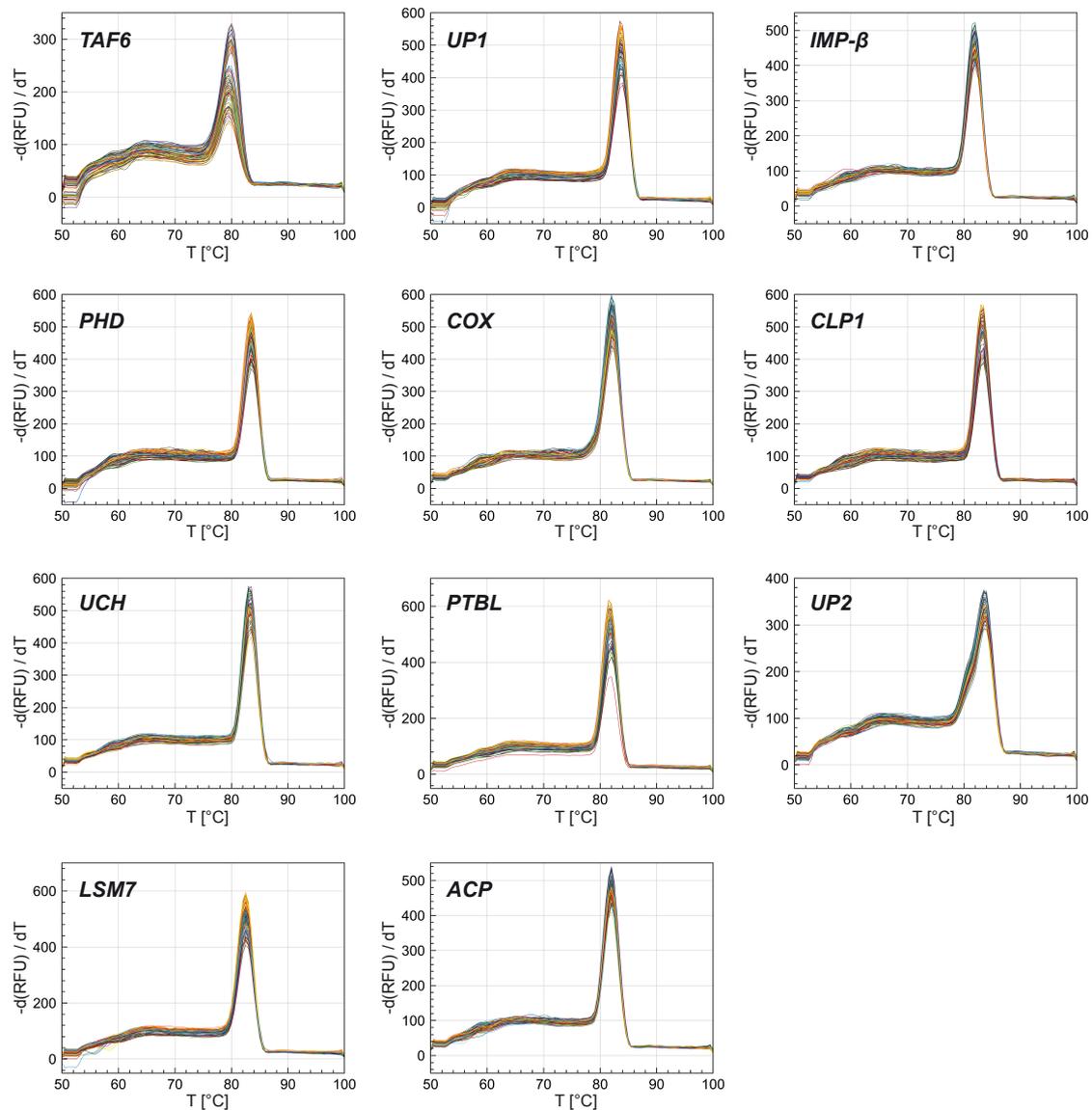
A *GAPDH*-Genfamilie



B *Ubiquitin*-Genfamilie

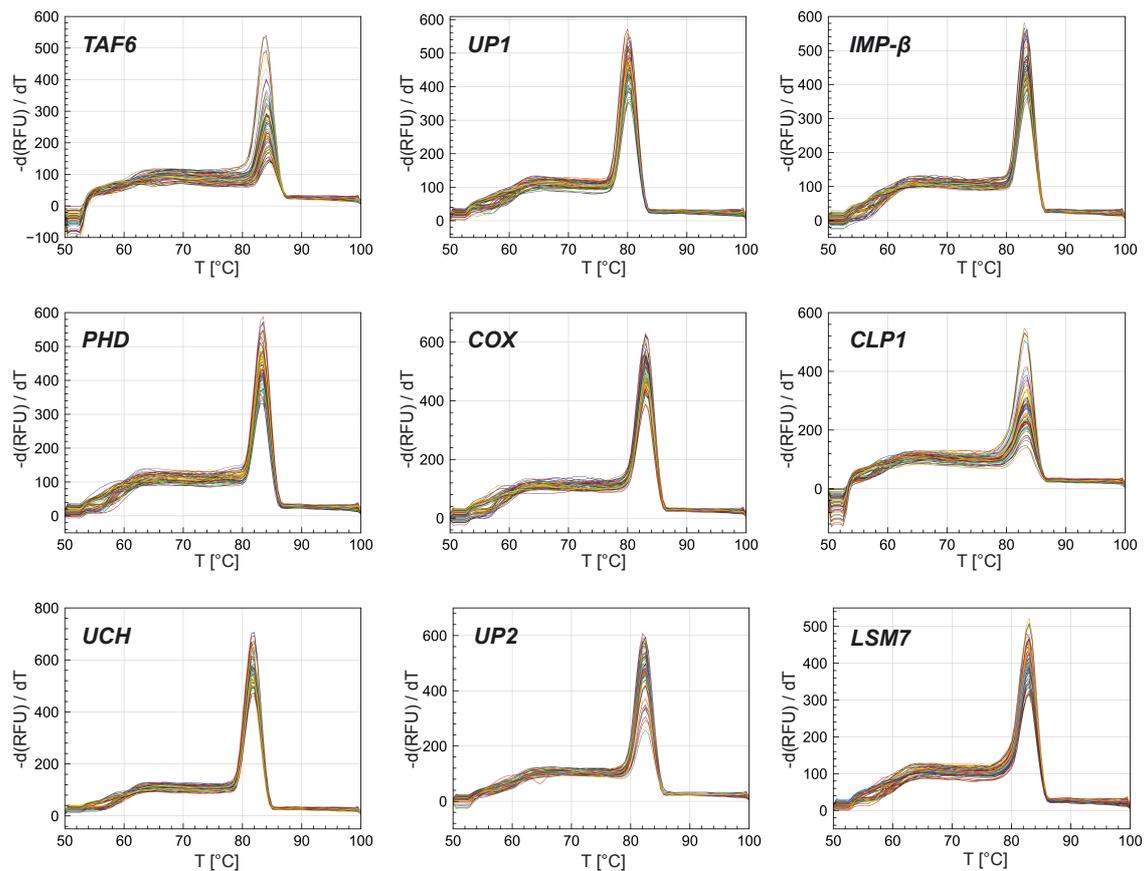


Dargestellt sind mit Hilfe der *Microarray*-Analysen bestimmte Transkriptmengen von Genen der (A) *GAPDH*- und (B) *Ubiquitin*-Genfamilie aus *S. lycopersicum* direkt bzw. sechs, zehn und 24 Stunden nach der Infektion mit *Xcv* 85-10 Δ *hrcN* bzw. der Infiltration mit einer $MgCl_2$ -Lösung oder unbehandeltem Blattmaterial (Datensatz 2). Dargestellt sind Expressionswerte von je drei biologischen Replikaten. Mitglieder der Genfamilien wurden anhand der aktuellen Annotation (ITAG Version 2.4) identifiziert. Für Analysen dieser Arbeit herangezogene traditionell verwendete Referenzgene sind rot dargestellt.

Anhang 14: Schmelzkurvenanalysen mittels qRT-PCR der neu identifizierten Kandidaten-Referenzgene aus *S. lycopersicum*

Während der qRT-PCR-Analysen wurde die Amplifikation eines spezifischen Produktes jedes untersuchten Kandidaten-Referenzgenes anhand von Schmelzkurven untersucht. Dargestellt ist die erste Ableitung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur. Durch Hitze werden je nach Zusammensetzung die beiden cDNA-Stränge bei einer spezifischen Temperatur (T) getrennt und somit die Interkalation von Farbstoffen verhindert, wodurch ein spezifischer Scheitelpunkt im Diagramm sichtbar wird. Schmelzkurven aller untersuchten cDNA-Proben von infizierten bzw. infiltrierten *S. lycopersicum*-Pflanzen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden für je ein Referenzgen überlagert.

Anhang 15: Schmelzkurvenanalysen mittels qRT-PCR der neu identifizieren Kandidaten-Referenzgene aus *C. annuum*



Während der qRT-PCR-Analysen wurde die Amplifikation eines spezifischen Produktes jedes untersuchten Kandidaten-Referenzgenes anhand von Schmelzkurven untersucht. Dargestellt ist die erste Ableitung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur. Durch Hitze werden je nach Zusammensetzung die beiden cDNA-Stränge bei einer spezifischen Temperatur (T) getrennt und somit die Interkalation von Farbstoffen verhindert, wodurch ein spezifischer Scheitelpunkt im Diagramm sichtbar wird. Schmelzkurven aller untersuchten cDNA-Proben von infizierten bzw. infiltrierten *C. annuum*-Pflanzen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden für je ein Referenzgen überlagert.

Anhang 16 auf Daten-CD

Alignement der Aminosäuresequenzen aller 29 annotierter Aktin-Gene aus *S. lycopersicum*.

Anhang 17 auf Daten-CD

Auflistung aller identifizierten Skp1-homologen Proteine aus *C. annuum* basierend auf BLAST-Analysen der AS-Sequenzen der 21 ASK-Proteine.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Möglichkeit, dieses interessante und anspruchsvolle Forschungsthema zu bearbeiten. Ich danke Ihnen für Ihre Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen, für fruchtbare Diskussionen, ein herzliches Miteinander sowie für Ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Als Kooperationspartner danke ich Dr. Jan Grau für seine Geduld und die bioinformatische Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein herzlicher Dank gilt Heike Prochaska und Cornelius Schmidtke für pausenfüllende Diskussionen und Hilfe in allen Lebenslagen.

Für die schöne Zeit mit freundlicher Arbeitsatmosphäre, den Gedankenaustausch, wertvolle Tipps und Spaß bei der Arbeit danke ich allen anderen (auch ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Besonderer Dank gilt dabei Felix Scheibner, Tom Schreiber, Anika Sorgatz, Norman Adlung, Jens Hausner, Michael Jordan, Sabine Thieme und Daniela Büttner.

Für die Geduld bei der Anzucht vieler Pflanzen, exzellente technische Unterstützung und das eine oder andere nette Gespräch danke ich Bianka Rosinsky, Marina Schulze und Karola Kretschmar.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und allen „neuen“ Familienmitgliedern für die Liebe und Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere meiner Verlobten Marie und meinen Kindern Jakob und August danke ich für ihre bedingungslose Liebe und Hilfe, für unendliche Geduld, für schöne Ablenkung, aber auch einigen Verzicht.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Oliver Armin Müller
Geburtsdaten: 09. April 1984 in Schkeuditz bei Leipzig
Anschrift: Max-Beckmann-Straße 22, 04109 Leipzig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verlobt, zwei Kinder

Ausbildung

2011-2016 Promotionsarbeit am Institut für Biologie, Fachbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2010-2011 Diplomarbeit am Institut für Biologie, Fachbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Molekulare Analyse der Typ III-Effektoren XopG und Xopl aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
Abschluss: Diplom-Biologe

2004-2011 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2002-2004 Ausbildung zum biologischen und chemischen technischen Assistenten (BCTA) an den Bernd-Blindow-Schulen in Leipzig

1996-2002 Allgemeine Hochschulreife am Werner-Heisenberg-Gymnasium in Leipzig

1990-1996 Paul-Robeson-Grundschule in Leipzig

Leipzig, den 16.03.2016

Erklärung

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

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Leipzig, den 16.03.2016

Oliver A. Müller