

**Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-
Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Doreen Gürlebeck

geboren am 16.02.1977 in Karl-Marx-Stadt

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bonas
2. Prof. Dr. D. Scheel
3. Prof. Dr. M. Hahn

Verteidigung: 28.03.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011569

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011569>]

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert.

Gürlebeck D., Szurek B., Bonas U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. Plant J. 42: 175-187

Büttner D., Gürlebeck D., Noël L., 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

Zusammenfassung

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) transloziert mindestens 20 Effektorproteine durch ein spezialisiertes Typ-III-Sekretionssystem in die pflanzliche Wirtszelle. AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 sind drei dieser Typ-III-Effektoren, welche aufgrund ihrer Fähigkeit, in resistenten Pflanzen eine HR auszulösen, als Avirulenzproteine bezeichnet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden deren Primärfunktionen als Virulenzfaktoren des Pathogens untersucht. Im Vordergrund stand die Analyse von AvrBs3, einem der bestuntersuchten Typ-III-Effektoren aus *Xcv*. Im Mittelpunkt stand dabei die Identifizierung und Analyse von Proteinen, die mit AvrBs3 interagieren. Es wurde gezeigt, dass AvrBs3 mit dem *Xcv*-Typ-III-Chaperon HpaB interagiert, welches die Sekretion des Effektorproteins begünstigt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der zentralen „Repeat“-Region Homodimere bildet. Die Interaktion zwischen AvrBs3 und Importin $\alpha 1$ aus *Capsicum annuum* (CaIMP $\alpha 1$), welches den Kernimport des Effektors vermittelt, wurde *in planta* gezeigt. In Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen einer cDNA-Bank aus *Lycopersicon esculentum* mit AvrBs3 als Köderprotein wurden zwei interessante, pflanzliche Proteine identifiziert, welche potentielle Virulenzzielproteine von AvrBs3 darstellen und eine Rolle für die Virulenz von *Xcv* spielen könnten: Der Interaktor LeThiC ist vermutlich an der Thiaminbiosynthese beteiligt und Aip8 („protein interacting with AvrBs3 8“) zeigt Ähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator aus *Arabidopsis*. Mikroskopische Studien nach *Agrobacterium* vermittelter Expression von *avrBs3* in *Nicotiana benthamiana* zeigten, dass AvrBs3 eine erhöhte Transkriptionsaktivität in den Zellkernen bewirkt. Vergleichende mikroskopische Analysen von Pflanzenzellen, die *avrBs3*, *avrBs1* oder *avrBs4* exprimieren, ergaben außerdem, dass AvrBs1 eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen induziert wie AvrBs3. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass AvrBs1 und AvrBs3 eine Erhöhung des Ionenaustritts aus *N. benthamiana*-Zellen bewirken. Das AvrBs3-Familienmitglied AvrBs4 induziert dagegen weder eine starke Zellvergrößerung noch einen verstärkten Ionenaustritt, jedoch eine Erhöhung des Katalasegehaltes in Peroxisomen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass AvrBs3 eine supprimierende Wirkung auf die durch AvrBs1 induzierte HR in *Bs1*-enthaltenden Paprikapflanzen hat.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) translocates at least 20 effector proteins through a specialized type III secretion system into the plant host cell. Among these are AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4, type III effectors that were termed avirulence proteines because of their ability to induce the HR in resistent plants. In the present work, the primary functions of these effectors were studied which are proposed to enhance the virulence of the pathogen. The main focus of this work was the analysis of AvrBs3, a well-studied type III effector of *Xcv*. The central question dealt with the identification and analyses of proteins interacting with AvrBs3 (Aip). First, the interaction of AvrBs3 with HpaB, a type III chaperone which promotes the secretion of the effector, was shown. Secondly, the present analyses revealed that AvrBs3 homodimerizes in the plant cell cytoplasm, mediated by the central repeat region of the effector. The interaction of AvrBs3 with Importin α 1 from *Capsicum annuum* (CaIMP α 1), which mediates the import of the effector into the plant cell nucleus, was demonstrated *in planta*. In yeast two-hybrid screens using AvrBs3 as bait two interesting proteins from *Lycopersicon esculentum* were identified displaying potential virulence targets of AvrBs3: LeThiC, probably an enzyme of the thiamine synthesis, and Aip8, a putative transcriptional regulator. Furthermore, microscopic studies following *Agrobacterium*-mediated transient expression of *avrBs3* in *Nicotiana benthamiana* revealed that AvrBs3 causes enhanced transcription activity in plant cell nuclei. Comparative microscopic analyses of cells expressing *avrBs3*, *avrBs1* or *avrBs4* showed that AvrBs1 induces a similar enlargement of mesophyll cells as AvrBs3. Physiological analyses revealed that AvrBs1 and AvrBs3 also cause increased ion leakage in *N. benthamiana*. However, the AvrBs3 family member AvrBs4 showed almost no effect on cell size or ion leakage, but induces an increased content of catalase in peroxisomes. Furthermore, a cell death suppressing activity of AvrBs3 was observed in *Bs1* pepper plants after delivery of AvrBs3 and AvrBs1 by *Xcv*.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema arbeiten zu können. Ich bedanke mich für Ihre Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen und das rege Interesse am Fortschreiten der Experimente.

Vielen Dank an Prof. Dinesh Kumar, Dr. Gerd Hause, Dr. Robert Kramell, Dr. Bettina Hause, Dr. Hauke Lilie, Dr. Bernhard Sielaff und Prof. J. Andreesen, die mir kooperativ und hilfsbereit bei der Verwirklichung von Experimenten zur Seite standen. Ganz besonders danke ich Dr. Gerd Hause und Dr. R. Kramell, die wesentlich zur Realisierung während dieser Arbeit durchgeföhrter Projekte beigetragen haben. Ich bedanke mich herzlich bei Prof. R. B. Klösgen, Dr. B. Hause, Dr. Gerd Hause und Prof. J. Andreesen für die Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit. Ich bedanke mich bei Dr. Anne Ousbourne für die hilfreichen Kommentare zum „Dimerisierungs-Manuskript“. Bei Boris bedanke ich mich für die exzellente Betreuung in den ersten Monaten der Arbeit und das anhaltende Interesse und seine Hilfsbereitschaft in den darauf folgenden Jahren. Danke für die vielen wissenschaftlichen und motivierenden Diskussionen. Merci. Ganz besonders möchte ich mich bei Eric für das Korrekturlesen des „Virulenz-Manuskriptes“ bedanken. Danke, dass du so bist, wie du bist! Merci beaucoup. Ein großer Dank gilt Daniela Büttner für ihre Hilfe, ihre Unterstützung, ihre Anwesenheit. Dankeschön! Thomas Lahaye, Sebastian Schornack, Ernst Weber, Jens Boch und Ralf Koebnik danke ich für kritische, fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen während dieser Arbeit. Für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei all den auftretenden Computer-Problemen bedanke ich mich bei Robert, Sebastian und Frank. Ich danke Bianca für ihren grünen Daumen und die hervorragende Organisation und Marina für die schnellen Bestellungen außer der Reihe. Boris, Carola, Eric, Lucía, Virginie, Johannes, Alex, Simone, Tina und Ernst: es hat Spaß gemacht, mit euch im Labor zu arbeiten! Danke für all die lustigen Momente zwischendurch. Danke für die Musik. Danke, Tina, danke Steffi, danke Larissa - für die sportlichen Momente im Wasser und im Park. Luce, ma puce, ich danke dir hundertmal für die aufbauenden, motivierenden Gespräche und die schönen Tage mit dir. Muchas gracias! Ich danke besonders herzlich meinen Freunden und meiner Familie. Danke, Tom, für die letzten Jahre. Danke Iv, Norman und Julia für die energetisierenden Wochenenden! Danke Leopold, für dein Verständnis in den letzten Monaten.

Ich danke allen, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Interaktionen zwischen phytopathogenen Bakterien und deren Wirtspflanzen	1
1.2. Basale Abwehrmechanismen der Pflanze (Nichtwirtsresistenz).....	1
1.3. Spezifische Resistenzmechanismen bei Pflanzen (Wirtsresistenz).....	2
1.3.1. Genetische Grundlage der Wirtsresistenz bei Pflanzen.....	3
1.3.2. Modelle für molekulare Mechanismen zur Erkennung von Avr-Proteinen durch pflanzliche R-Proteine	4
1.4. Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren Gram-negativer phytopathogener Bakterien	6
1.4.1. Das T3SS wird durch die <i>hrp</i> -Gene kodiert.....	7
1.4.2. Der Aufbau des T3SS phytopathogener Bakterien	9
1.4.3. Die Substrate des T3SS: Harpine und Effektorproteine.....	11
1.4.3.1. Die Sekretion der Typ-III-Substrate	11
1.4.3.2. Die Translokation der Effektorproteine.....	12
1.4.3.3. Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr durch Effektorproteine	13
1.4.3.4. T3-Effektoren mit enzymatischer Funktion.....	15
1.4.3.5. Wirkung individueller Effektoren bei der Etablierung der Krankheit und der Ausbreitung des Pathogens.....	17
1.5. Das Modellsystem <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	17
1.6. Das Effektorprotein AvrBs3 aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	19
1.7. Ziele der Arbeit	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen	25
2.2. Verwendete Pflanzen.....	25
2.3. Infiltration von Pflanzen.....	26

2.4. Konstruktion von Plasmiden mittels GATEWAY-Technologie	26
2.5. Hefe-Di-Hybrid-Analysen.....	28
Erstellung der Plasmide für Expression von Genen in Hefe	31
Erstellung und Sichtung der Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate	32
2.6. Interaktionsstudien <i>in vitro</i>	33
Erstellung von Plasmiden zur Genexpression in <i>E. coli</i>	34
2.7. Interaktionsstudien <i>in planta</i>	34
2.7.1. Kolokalisierungsstudien	34
2.7.2. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).....	35
2.7.3. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	36
2.7.4. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation (KoIP)	37
Erstellung von Plasmiden zur Expression von Genen in Pflanzen	38
2.8. Virus induziertes Gen-„Silencing“ (VIGS).....	39
Erstellung von Plasmiden für Virus induziertes Gen-„Silencing“ in Pflanzen	40
2.9. Bestimmung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen.....	41
2.10. Licht- und Elektronenmikroskopie.....	41
2.11. Physiologische Vitamin B1-Komplementations-Analysen.....	42
2.12. Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Pflanzen	42
2.12.1. Extraktion der Thiamin-Verbindungen	42
2.12.2. HPLC-Bedingungen	43
2.13. Statistische Auswertungen	44
2.14. Silberfärbung, Native Gel-Elektrophorese und Westernblot.....	44
2.15. 5'- und 3'- RACE (“rapid amplification of cDNA ends”)	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Sekretion aus dem Bakterium: Wie wird die Sekretion von AvrBs3 gesteuert?.....	46
3.1.1. Das Typ-III-Chaperon HpaB interagiert mit dem N-Terminus von AvrBs3	46
3.1.1.1. Einführung und Vorarbeiten	46
3.1.1.2. Untersuchung der HpaB-AvrBs3 ₁₋₅₀ -Interaktion <i>in vitro</i>	46
3.2. Ankunft des Effektors in der Pflanzenzelle - Interaktionspartner von AvrBs3 im pflanzlichen Zytoplasma.....	48
3.2.1. AvrBs3 dimerisiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle	48

3.2.1.1. Einführung und Vorarbeiten	48
3.2.1.2. AvrBs3 interagiert mit AvrBs3 in Hefe	48
3.2.1.3. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion erfolgt auch <i>in vitro</i>	49
3.2.1.4. Die Koexpression von mutanten <i>avrBs3</i> -Derivaten <i>in planta</i> induziert die hypersensitive Reaktion.....	50
3.2.1.5. AvrBs3-Moleküle interagieren im pflanzlichen Zytosplasma	51
3.2.1.6. Die zentralen „Repeats“ vermitteln die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion	53
3.2.1.7. Eine Region von 5,5 „Repeats“ erlaubt eine AvrBs3-AvrBs3 Interaktion in Hefe	54
3.2.1.8. Die putativen Leucin-Zipper-„Repeats“ sind nicht an der Dimerisierung von AvrBs3 beteiligt.....	55
3.2.1.9. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird nicht durch Disulfidbrücken vermittelt.....	57
3.2.1.10. Wie viele AvrBs3-Moleküle sind im Oligomer enthalten?	58
3.2.1.11. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird auch <i>in planta</i> von der „Repeat“-Region vermittelt	59
 3.2.2. AvrBs3 interagiert mit Importin α in der Pflanze	60
3.2.2.1. Einführung und Vorarbeiten	60
3.2.2.2. Untersuchung der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion in Hefe mittels GATEWAY-Technologie	60
3.2.2.3. CaIMP α 1 und AvrBs3 lokalisieren im gleichen Kompartiment der Pflanzenzelle....	62
3.2.2.4. AvrBs3 und CaIMP α 1 koimmunopräzipitieren NLS abhängig aus pflanzlichem Proteinextrakt	64
3.2.2.5. Nachweis der AvrBs3 Δ 2-CaIMP α 1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen	65
 3.2.3. Isolierung neuer AvrBs3-Interaktoren aus Tomate	68
3.2.3.1. Einführung und Vorarbeiten	68
3.2.3.2. Wahl und Erstellung der cDNA-Bank.....	68
3.2.3.3. Wahl und Konstruktion geeigneter Köderproteine.....	69
3.2.3.4. Die Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3 Δ 2 Δ NLS::SV40NLS als Köder	72
3.2.3.5. Aip6 interagiert spezifisch mit der „Repeat“-Region von AvrBs3.....	73
3.2.3.6. Aip6 kodiert für ein Thiaminbiosyntheseprotein C-Homolog	74
3.2.3.7. LeThiC interagiert mit AvrBs3 in Hefe unabhängig von den fusionierten Aktivierungs- und DNA-Bindedomänen.....	76
3.2.3.8. LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Effektor-Familie.....	79
3.2.3.9. LeThiC ist im Zytosplasma lokalisiert	80
3.2.3.10. Interagiert AvrBs3 mit LeThiC <i>in planta</i> ?	81
Kolokalisieren AvrBs3 und LeThiC?	81
Untersuchung der LeThiC-AvrBs3-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation	84
3.2.3.11. Interagiert LeThiC mit AvrBs3 <i>in vitro</i> ?	85
3.2.3.12. Untersuchung der biologischen Bedeutung der AvrBs3-LeThiC-Interaktion	86
Silencing von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>N. benthamiana</i>	87
Silencing von <i>LeThiC</i> -Homologen in Paprika.....	89
3.2.3.13. LeThiC ist an der Vitamin B1-Synthese in Pflanzen beteiligt.....	90
3.2.3.14. Verändert AvrBs3 den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzenzellen?	92
Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Tomate, Paprika und Tabak	92
Untersuchung des Einflusses von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt von Pflanzen	93
 3.3. Ankunft des Effektors am Zielort: Suche nach kernlokalisierten AvrBs3-Interaktoren	95
3.3.1. Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3-LZ als Köder.....	95
3.3.2. Untersuchung der AvrBs3-LZ-Interaktoren in Hefe	97

3.3.3. Sequenzanalyse der identifizierten cDNA-Fragmente aus Tomate.....	98
3.4. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus <i>Xcv</i>	100
3.4.1. Einführung und Vorarbeiten.....	100
3.4.2. AvrBs1 und AvrBs3 lösen Chlorosen in der Pflanze aus.....	101
3.4.3. AvrBs1 verursacht eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen wie AvrBs3.....	102
3.4.4. Das Zellwachstum ist mit einer Vergrößerung der Vakuole verbunden	104
3.4.5. Untersuchung des Einflusses von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Ultrastruktur der Organellen	105
3.4.6. AvrBs1 induziert nekrotische Reaktionen im Pflanzengewebe	106
3.4.7. AvrBs4 verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in den Peroxisomen	107
3.4.8. AvrBs3 verursacht eine sichtbar erhöhte Transkriptionsaktivität in den Zellkernen	107
3.4.9. AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR unterdrücken.....	109
3.4.10. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren einen erhöhten Ionenaustritt aus <i>N. benthamiana</i> -Zellen	110
4. Diskussion und Ausblick.....	112
4.1. Der Weg des Typ-III-Effektors AvrBs3: von der Sekretion aus dem Bakterium bis zur Wirkung als Transkriptionsfaktor in der Pflanze	112
4.1.1. HpaB beeinflusst die Sekretion von AvrBs3 durch Interaktion mit dem N-Terminus des Effektors in <i>Xcv</i>	112
4.1.2. AvrBs3 formt Homodimere durch Interaktion der zentralen „Repeats“ im Zytoplasma der Pflanzenzelle	115
4.1.3. CaIMPa1 interagiert mit dem NLS-Bereich des Effektorproteins AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle	119
4.1.4. Hemmt AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese im Zytoplasma?	123
4.1.5. Interagiert AvrBs3 im Zellkern mit pflanzlichen Proteinen?	127
4.2. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus <i>Xcv</i> : unterschiedliche Proteine mit ähnlicher Wirkung?	129
4.2.1. AvrBs3 und AvrBs4 können vermutlich der pflanzlichen Abwehr entgegenwirken	129
4.2.2. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren eine Hypertrophie der Mesophyllzellen.....	133
4.2.3. AvrBs3 induziert stärkere Transkriptionsaktivitäten in den Nukleoli als AvrBs4	136
4.2.4. Ein erhöhter Austritt von Ionen aus Wirtszellen erfolgt nicht nur während der HR.....	137
5. Literatur.....	141

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Modelle zur spezifischen Erkennung bakterieller Avirulenzproteine durch pflanzliche Resistenzproteine.....	5
Abbildung 2: Modell der Interaktion zwischen Gram-negativen phytopathogenen Bakterien und ihren Wirtspflanzen.....	8
Abbildung 3: Das T3SS von <i>Xcv</i>	10
Abbildung 4: Durch <i>Xanthomonas</i> ausgelöste Krankheiten auf Nutzpflanzen.....	18
Abbildung 5: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> im Interzellularraum des Mesophylls einer infizierten Paprikapflanze.	19
Abbildung 6: Strukturelle Merkmale von AvrBs3 aus <i>Xcv</i>	21
Abbildung 7: Arbeitsmodell zur Wirkungsweise von AvrBs3 in der Wirtszelle.....	23
Abbildung 8: Prinzip der Klonierung mittels GATEWAY-Technologie.....	28
Abbildung 9: Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems und verwendete Reportergene.....	30
Abbildung 10: Prinzip des GST-„pull-down“-Ansatzes.	34
Abbildung 11: Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).....	36
Abbildung 12: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).	37
Abbildung 13: Prinzip der Koimmunopräzipitation (KoIP).....	38
Abbildung 14 : Prinzip des Virus induzierten Gen-„Silencing“ (VIGS).	40
Abbildung 15: Strukturformeln von Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat. ...	43
Abbildung 16: HpaB interagiert mit den ersten 50 Aminosäuren von AvrBs3.	47
Abbildung 17: AvrBs3-Moleküle interagieren in Hefe.....	49
Abbildung 18: AvrBs3-Moleküle interagieren <i>in vitro</i>	50
Abbildung 19: AvrBs3 Δ NLS-GFP kann durch AvrBs3 in den Nukleus der Pflanzenzelle importiert werden, nicht jedoch durch AvrBs3 Δ SphI.....	52
Abbildung 20: Bestimmung der Proteinregion, welche die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe vermittelt.	57
Abbildung 21: Die AvrBs3-Oligomerisierung erfolgt nicht durch Disulfidbrücken.	58
Abbildung 22: AvrBs3 bildet Dimere.	59
Abbildung 23: CaIMPa1 interagiert mit AvrBs3 Δ 2 bei Verwendung der GATEWAY -Technologie.	61
Abbildung 24: Lokalisierung von CaIMPa1 und Kolokalisierung mit AvrBs3 Δ 2.....	64
Abbildung 25: CaIMPa1 koimmunopräzipitiert mit AvrBs3 Δ 2 aus Pflanzenzellen.....	65
Abbildung 26: Visualisierung der AvrBs3 Δ 2-CaIMPa1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen mittels BiFC. (A).....	67
Abbildung 27: Überprüfung der AvrBs3- und AvrBs4-Köderproteine.	71
Abbildung 28: Aip6 interagiert spezifisch mit AvrBs3 in Hefe.....	72

Abbildung 29: Bestim-mung der Aip6-Bindestelle in AvrBs3.....	74
Abbildung 30: Die Vitamin B1-Synthese in E. coli.....	75
Abbildung 31: Vergleich der isolierten cDNA-Fragmente mit Sequenzen aus der EST-TIGR-Datenbank.....	76
Abbildung 32: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3Δ2 im GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System.....	77
Abbildung 33: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3Δ2 im „interaction trap“-System.....	78
Abbildung 34: LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Famile.....	79
Abbildung 35: LeThiC ist im Zytoplasma von Pflanzenzellen lokalisiert.....	81
Abbildung 36: Kolokalisieren AvrBs3Δ2 und LeThiC in Pflanzenzellen?	83
Abbildung 37: LeThiC-FLAG bewirkt keine Retardierung von YFP-AvrBs3 im Zytoplasma von Pflanzenzellen.....	84
Abbildung 38: AvrBs3Δ2 und LeThiC interagieren <i>in vitro</i>	86
Abbildung 39: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>N. benthamiana</i>	88
Abbildung 40: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>C. annuum</i> nach Infektion mit <i>Xcv</i>	90
Abbildung 41: LeThiC ist an der Vitamin B1-Synthese beteiligt.....	91
Abbildung 42: Einfluss von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzen.....	94
Abbildung 43: Überprüfung der Synthese und Transkriptionsaktivität des Köderproteins BD-AvrBs3-LZ in Hefe.....	96
Abbildung 44: Untersuchung der Induktion der Reportergene <i>ADE2</i> , <i>HIS3</i> und <i>lacZ</i> durch die Köder-Beute-Interaktionen.....	97
Abbildung 45: Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Spezifität der Interaktionen der identifizierten Proteine mit AvrBs3-LZ, Lamin C und AvrBs3Δ2 in Hefe.....	99
Abbildung 46: AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 lösen makroskopisch sichtbare Reaktionen in <i>N. benthamiana</i> aus.....	101
Abbildung 47: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen eine starke Veränderung der Morphologie von Mesophyllzellen.....	104
Abbildung 48: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen ein Wachstum der Zentralvakuole in der Pflanzenzelle.....	104
Abbildung 49: Einfluss von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Organellen von <i>N. benthamiana</i> -Zellen.....	105
Abbildung 50: AvrBs1 induziert das Absterben von Mesophyllzellen in <i>N. benthamiana</i>	106
Abbildung 51: Die Expression von <i>avrBs4</i> in <i>N. benthamiana</i> verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in Peroxisomen von Mesophyllzellen.....	107

Abbildung 52: AvrBs3 verursacht eine erhöhte Aktivität in Zellkernen von Pflanzenzellen.....	109
Abbildung 53: AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR in <i>C. annuum</i> cv. ECW-10R unterdrücken.....	110
Abbildung 54: Messung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen nach Expression von <i>uidA</i> , <i>avrBs1</i> , <i>avrBs3</i> oder <i>avrBs4</i>	111
Abbildung 55: Aktuelles Modell zur Wirkungsweise von AvrBs3 aus <i>Xcv</i>	140

Tabellen:

Tabelle 1: Die Gen-für-Gen-Hypothese.....	3
Tabelle 2: Zelltod inhibierende T3-Effektoren phytopathogener Bakterien.....	15
Tabelle 3: Analyse der Interaktion von AvrBs3Δ2 und CaIMPa1 in Zellkernen mittels FRET.....	64

Abkürzungsverzeichnis

AD: „activation domain“, Aktivierungsdomäne
ADP: Adenosindiphosphat
As: Aminosäuren
ATP: Adenosintriphosphat
avr, Avr: Avirulenz
BiFC: bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp: Basenpaare
Bs: „bacterial spot“
CDS: “cell death suppressing”, Zelltod unterdrückend
CFU: „colony forming units“
cDNA-AFLP: „complementary DNA amplified fragment length polymorphism“
CFP: „cyan fluorescent protein“, cyan fluoreszierendes Protein
DNA: „desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
ECW: „Early californian wonder“, Kultivar von *Capsicum annuum*
FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GFP: „green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
GST: Glutathion-S-Transferase
Hop: „*hrp* outer protein“
hpa, Hpa: „*hrp* associated“, *hrp*-assoziiert
HR: “hypersensitive response”, hypersensitive Antwort, hypersensitive Reaktion
hrc, Hrc: „*hrp* conserved“, *hrp*-konserviert
hrp, Hrp: „hypersensitive response and pathogenicity“, hypersensitive Antwort und Pathogenität
kb: Kilobasen
kDa: Kilodalton
KoIP: Koimmunopräzipitation
LZ: Leucin-Zipper
mRNA: „messenger RNA“, Boten-RNA
NLS: „nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
OD: optische Dichte
ORF: „open reading frame“, offener Leserahmen
PAGE: Polyacrylamidgelektrophorese
PCR: „polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pv.: Pathovar
R, R: Resistenz
RNA: „ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rRNA: ribosomale RNA
SDS: Sodiumdodecylsulfat
spp.: Subspezies
T3SS: „type III secretion system“, Typ-III-Sekretionssystem
tRNA: Transfer-RNA
RT-PCR: "reverse transcribed PCR", Reverse Transkription und PCR
Xop: „*Xanthomonas* outer protein“
YFP: „yellow fluorescent protein“, gelb fluoreszierendes Protein
Yop: „*Yersinia* outer protein“

1. Einleitung

1.1. Interaktionen zwischen phytopathogenen Bakterien und deren Wirtspflanzen

Bakterien sind sehr divers in ihrer Zellgröße, Zellform, Bewegungsform und der von ihnen zur Energiegewinnung genutzten Stoffwechselwege. Diese Diversität ermöglicht es den Bakterien, zahlreiche Habitate zu besiedeln und eine Vielzahl ökologischer Nischen zu nutzen. Einige Bakterien haben sich z.B. auf ein Leben auf oder in anderen Organismen spezialisiert, da Tiere und Pflanzen günstige Wachstumsbedingungen wie einen konstanten pH-Wert, einen konstanten osmotischen Druck und ein hohes Nährstoffangebot bieten. Parasitisch lebende Bakterien schädigen den besiedelten Wirtsorganismus. Der Befall eines Wirtsorganismus mit pathogenen Parasiten führt zur Auslösung spezifischer Krankheiten. Pathogene infizieren sowohl Pflanzen (Phytopathogene) als auch Tiere (Tierpathogene). Zu wichtigen Vertretern der Phytopathogene gehören nicht nur Bakterien, sondern auch Insekten, Nematoden, Pilze und Viren. Sowohl Gram-positive phytopathogene Bakterien (z. B. *Clavibacter michiganensis* pathovar (pv.) *michiganensis*) als auch Gram-negative phytopathogene Bakterien verursachen Krankheiten auf wichtigen Nutzpflanzen. Dabei hängt das Ausmaß der Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen von der Virulenz des Pathogens ab. Gram-negative, phytopathogene Bakterien sind bislang für molekulargenetische Untersuchungen besser zugänglich als Gram-positive Vertreter und wurden daher als Modellsystem für das Studium von Pathogen-Wirts-Interaktionen etabliert. Wichtige Vertreter phytopathogener Gram-negativer Bakterien gehören zu den Gattungen *Ralstonia*, *Xylella*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Agrobacterium* und *Xanthomonas*. Die durch diese Bakterien ausgelösten Krankheiten führen besonders in feucht-warmen Gebieten zu erheblichen Ernteausfällen.

Die meisten Pflanzen sind jedoch „Nichtwirtsorganismen“ für potentielle Krankheitserreger, da sie effektive Abwehrmechanismen entwickelt haben.

1.2. Basale Abwehrmechanismen der Pflanze (Nichtwirtsresistenz)

Pflanzen besitzen einige natürliche Barrieren, die ein Eindringen von Mikroorganismen erschweren. Dazu zählen die Zellwand sowie die Kutikula, die der Epidermis verstärkend aufgelagert ist. Auch Phytotoxine dienen der Abwehr von Krankheitserregern. Des

Weiteren besitzen Pflanzenzellen Rezeptoren, die vor allem die weit verbreiteten mikrobiellen Moleküle (MAMP, „micobial associated molecular pattern“; auch PAMP für „pathogen associated molecular pattern“), wie z.B. Flagellin, Exopolysaccharide (EPS), Lipopolysaccharide (LPS) und Harpine erkennen und dadurch basale Abwehrreaktionen einleiten (139, 252, 253, 372, 374). Basale Abwehrreaktionen können zu einem programmierten Zelltod („programmed cell death“, PCD) führen, welcher normalerweise Teil des Zellzyklus ist (127, 143, 164, 222, 242). Die basalen, induzierten Abwehrreaktionen beinhalten eine Verstärkung der Zellwand, z.B. durch Einlagerungen von Lignin oder Suberin, Kalloseauflagerungen sowie die Expression von speziellen Abwehr-Genen (137, 230). Die Aktivierung dieser Abwehrreaktionen erfolgt durch eine MAPK (Mitogen aktivierte Protein-Kinase)-Signalkaskade, die sowohl durch abiotischen wie auch biotischen Stress induziert wird (242, 253, 373). Letztlich wird durch all diese basalen Abwehrprozesse eine Nichtwirtsresistenz der Pflanze bewirkt, da das Wachstum der Mikroorganismen verhindert wird.

1.3. Spezifische Resistenzmechanismen bei Pflanzen (Wirtsresistenz)

Einige, so genannte resistente Wirtspflanzen haben spezifische Mechanismen entwickelt, um pathogene Mikroorganismen zu erkennen und abzuwehren. Für die Erkennung von Phytopathogenen haben diese Pflanzen spezifische Resistenzproteine evolviert. Nach Erkennung kommt es zur Bildung und Anhäufung antimikrobieller Phytoalexine, zur Induktion von Abwehr-Genen, *PR*- („pathogenesis related“)-Genen sowie zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“; ROS; 137, 193, 198, 226, 295, 342). Über die genaue Funktion vieler PR-Proteine ist noch wenig bekannt. Durch pathogene Pilze induzierte *PR*-Gene kodieren z.B. für Chitininasen, Glukanasen sowie Chitin bindende Proteine (143). ROS können direkt toxisch auf das Pathogen wirken, in die Verstärkung der Zellwand involviert oder an der Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR) beteiligt sein. Die HR ist ein schneller lokalisierter Zelltod, welcher die Vermehrung der pathogenen Mikroorganismen verhindert und so die Pflanze vor größeren Schäden bewahrt (6, 65, 126, 128, 137, 177, 185, 312). Die Inhibierung bakteriellen Wachstums ist dabei vermutlich durch einen Abfall des Wasserpotentials im Apoplasten während der HR bedingt (363).

1.3.1. Genetische Grundlage der Wirtsresistenz bei Pflanzen

Um die genetische Grundlage der speziellen pflanzlichen Resistenz zu erklären, postulierte Flor nach Untersuchungen der Interaktion zwischen Flachs und dem Rostpilz *Melampsora lini* die Gen-für-Gen-Hypothese (103; Tabelle 1). Dieser Hypothese zu Folge existiert für jedes Resistenzgen (*R*) in einer Pflanzenlinie ein komplementäres Avirulenz-Gen (*avr*) im Pathogen (102). Pathogen und Wirt sind somit inkompatibel. Fehlt hingegen eines der beiden Gene, so handelt es sich um eine kompatible Interaktion und der virulente Stamm kann auf der anfälligen Pflanze Krankheitssymptome auslösen.

Die durch die *R*-Gen vermittelte Erkennung induzierte HR ist eine spezielle Form des PCD (126, 142). Es sind jedoch auch inkompatible Interaktionen bekannt, bei denen das Wachstum des Pathogens ohne die Induktion der HR gestoppt wird (30, 107, 108, 186, 192, 268).

Ein wichtiger Botenstoff, welcher während der HR akkumuliert, ist die Salicylsäure (SA), die zum einen toxisch auf Pathogene wirken kann, aber auch zur Inhibierung Jasmonat induzierter Gene und Aktivierung von *PR*-Genen führt. Die während der HR produzierte SA kann außerdem eine systemisch erworbene Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) auslösen, welche noch nicht infizierte Pflanzenteile vor Pathogenbefall schützt und eine Sekundärinfektion verhindert (290, 307, 318).

Tabelle 1: Die Gen-für-Gen-Hypothese.

Genotyp des Pathogens	Genotyp der Wirtspflanze	
	<i>RR</i> oder <i>Rr</i>	<i>rr</i>
<i>avr</i> ⁺	Inkompatible Interaktion	Kompatible Interaktion
<i>avr</i> ⁻	Kompatible Interaktion	Kompatible Interaktion

R dominantes Resistenzgen; *r* Abwesenheit des Resistenzgens, *avr*⁺ Avirulenzgen; *avr*⁻ Abwesenheit des Avirulenzgens

1.3.2. Modelle für molekulare Mechanismen zur Erkennung von Avr-Proteinen durch pflanzliche R-Proteine

Der Gen-für-Gen-Hypothese folgend, werden Effektoren von Pathogenen vermittelt durch Resistenzgene und deren Produkte in der Wirtszelle erkannt. Zwei Modelle wurden entwickelt, um die genetische Wechselwirkung zwischen Resistenzgenen und Effektorgenen molekular zu erklären (Abbildung 1). Eine direkte Erklärung der Gen-für-Gen-Hypothese bietet das zuerst entwickelte **Rezeptor-Liganden-Modell** (112, 177). Dabei wird angenommen, dass das Resistenzgenprodukt (R) als Rezeptor fungiert und das passende Effektorprotein, auch als Avr-Protein bezeichnet, als Liganden bindet. Eine solche direkte Interaktion wurde bisher jedoch nur für AvrPto aus *P. syringae* und Pto aus Tomate, AvrPita aus *Magnaporthe grisea* und Pi-ta aus Reis sowie für PopP2 aus *R. solanacearum* und RRS1-R aus *Arabidopsis* gezeigt (81, 162, 302, 327). Die Erkennung von AvrPto benötigt neben *Pto* jedoch auch *Prf*. Dies spricht für eine indirekte Erkennung des Effektors, wie sie von Van der Biezen und Jones im „Guard“-Modell (Wächter-Modell) vorgeschlagen wurde (337).

Das „Guard“-Modell postuliert, dass ein Avirulenzprotein mit einem pflanzlichen Protein („virulence target“, Virulenzzielprotein) zum Nutzen des Pathogens interagiert. Die dadurch herbeigeführte Veränderung des Virulenzzielproteins wird von einem „bewachenden“ Resistenzprotein detektiert, so dass Abwehrreaktionen induziert werden (Abbildung 1 B-D). Nach dieser Hypothese könnte beispielsweise die Kinase Pto das Virulenzzielprotein von AvrPto sein, welche durch das NB-LRR-R-Protein Prf bewacht wird. In Hefe-Tri-Hybrid-Sichtungen mit Pto und AvrPto als Köder wurde Prf, das zuvor genetisch isoliert wurde, jedoch nicht als Interaktionspartner identifiziert (43). Aktuelle Arbeiten zeigten jedoch, dass Prf tatsächlich mit Pto *in vivo* interagiert (238). Die ersten indirekten Hinweise darauf, dass sich zusätzlich Proteine in einem Komplex mit Effektor- und R-Protein befinden, lieferten Koimmunopräzipitationsstudien von AvrRpt2, AvrB und den dazugehörigen R-Proteinen RPS2 und RPM1 (203). Dabei wurden zusätzliche Proteine in einem aus der Pflanze präzipitierten Avr-R-Protein-Komplex detektiert. Bei einem dieser Proteine handelt es sich vermutlich um RIN4 („RPM1 interacting protein 4“), welches später als Virulenzzielprotein mit zentraler Bedeutung identifiziert wurde (76, 91, 215, 216, 219).

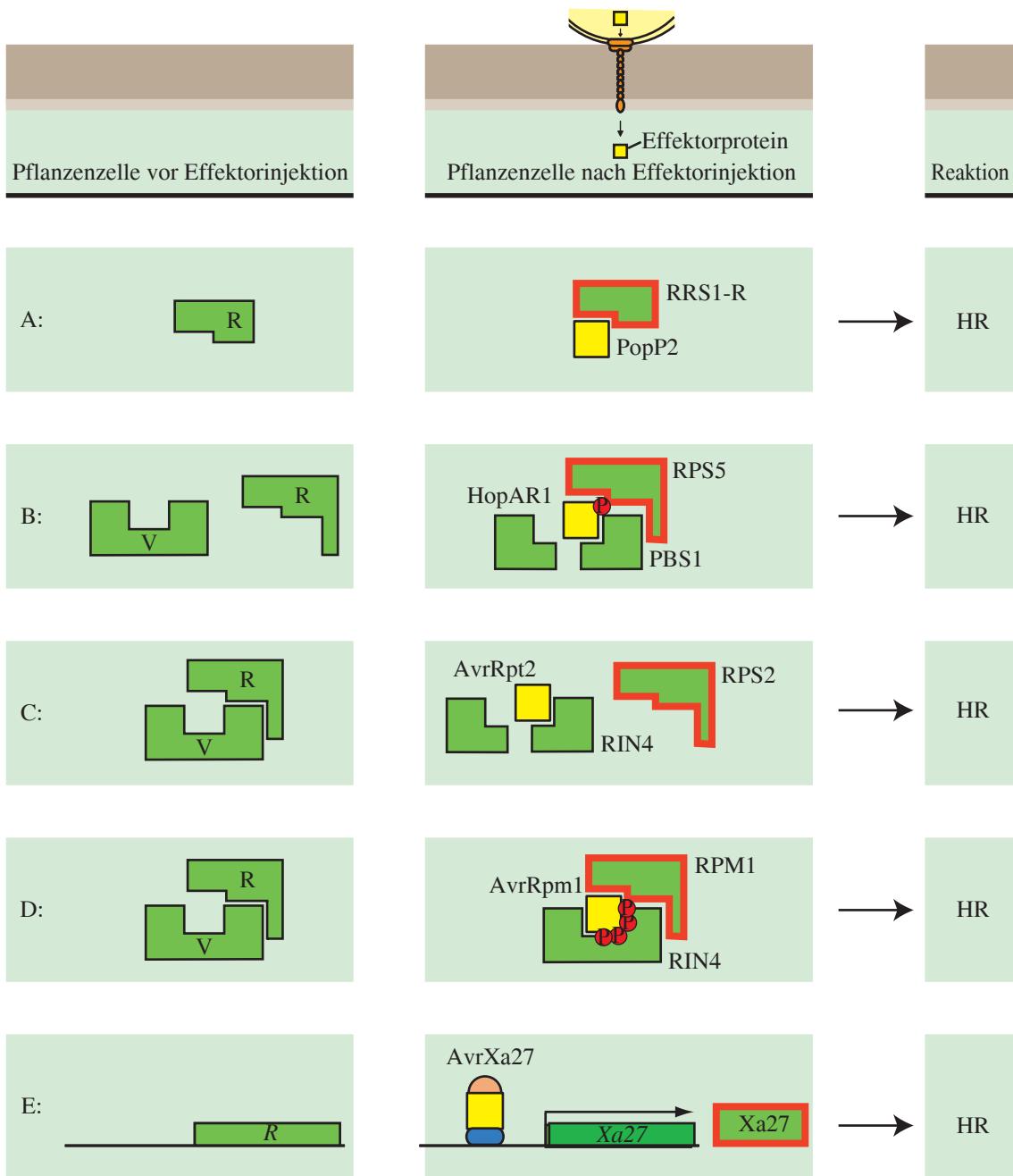


Abbildung 1: Modelle zur spezifischen Erkennung bakterieller Avirulenzproteine durch pflanzliche Resistenzproteine.

Die molekulare Interpretation der Gen-für-Gen-Hypothese zur Erklärung inkompatibler Pathogen-Pflanzen-Interaktionen resultierte in zwei Modellen: **(A)** Das Rezeptor-Liganden-Modell postuliert das pflanzliche Resistenzprotein (R) als direkten Rezeptor für das bakterielle Effektorprotein (z.B. PopP2/RRS1-R; 81). Die Bindung des Effektors „aktiviert“ demnach das Resistenzprotein und führt zur Induktion der HR. **(B-D)** Die „Guard“-Hypothese berücksichtigt die Primärfunktion der Avr-Proteine als Virulenzfaktoren und postuliert eine indirekte Erkennung durch die R-Proteine. Dabei erkennt das R-Protein die Modifikation eines pflanzlichen Proteins, dem Virulenzzielprotein (V) des Effektors. Der Effektor kann z.B. eine Cysteinproteaseaktivität (**B**; z.B. HopAR1/RPS5; 306); **C**; z.B. AvrRpt2/RPS2; 215) oder eine Kinaseaktivität (**D**; z.B. AvrRpm1/RPM1; 216) besitzen. Neuere Studien postulieren eine weitere Möglichkeit der spezifischen Erkennung: Das Effektorprotein könnte über eine DNA-Bindedomäne (dunkelblau) an Promotorsequenzen vor dem Resistenzgen binden und dessen Expression vermittelt durch eine Aktivierungsdomäne (orange) aktivieren (**E**; z.B. AvrXa27/Xa27; 130). Pflanzenproteine (Virulenzziele und R-Proteine) sind grün dargestellt. Aktivierte R-Proteine sind rot umrandet.

1.4. Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren Gram-negativer phytopathogener Bakterien

Die Adhäsion des Pathogens an Oberflächen der Wirtspflanze stellt den ersten Schritt bei der Besiedlung eines Wirtsorganismus dar. Ist der Kontakt hergestellt, ist eine Invasion möglich, gefolgt vom Wachstum des Pathogens und der damit verbundenen Kolonisierung des Wirtes.

Bei der Besiedlung der Wirtspflanze können verschiedene, vom Pathogen gebildete Faktoren helfen. Dazu zählen Adhäsine, EPS, LPS, extrazelluläre Enzyme, Siderophore und Toxine (Abbildung 2). **Adhäsine** können an der Adhäsion an der Wirtszelloberfläche beteiligt sein, wie Studien an *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und besonders *Erwinia* zeigten (88, 183, 276, 285, 335). **EPS**, wie das von *Xanthomonas* gebildete Xanthan, umgibt die bakteriellen Zellen, schützt die Bakterien vor Austrocknung und pflanzlichen Giftstoffen und erlaubt die Adsorption an der Zelloberfläche sowie die Konzentration von Nährstoffen (80). Untersuchungen von *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* und *Erwinia* spp. zeigten, dass die Reduktion der EPS-Produktion mit einer verminderten Virulenz des Pathogens verbunden sein kann (33, 68, 83, 172, 245, 317). **LPS** ist Teil der äußeren bakteriellen Membran und trägt ebenfalls zur Virulenz der Pathogene bei (86, 144, 246, 297). Da Pflanzenzellen von einer Zellwand umgeben sind, spielen **extrazelluläre Enzyme** eine große Rolle bei Phytopathogenen. Besonders nekrotrophe Pathogene wie *Erwinia amylovora*, die sich von toten Zellen ernähren, produzieren eine Vielzahl solcher Enzyme (z.B. Zellulasen, Pektatlyasen, Phospholipasen), um das pflanzliche Gewebe abzubauen (11, 25, 34, 178, 292). Einige phytopathogene Bakterien produzieren **Toxine**, welche die unterschiedlichsten Prozesse in Wirtszellen hemmen können. Coronatin aus *Pseudomonas syringae* induziert z.B. die Produktion von Anthocyan, Ethylen und Proteinase-Inhibitoren (31, 32). Es bewirkt auch die Unterdrückung der Expression von Genen der pflanzlichen Abwehr, vermutlich durch Nachahmung der Aktivität des Pflanzenhormons Jasmonat (54, 101, 234). Syringomycin aus *P. syringae* hingegen inseriert in die Plasmamembran der Wirtszelle und bewirkt so eine Porenbildung, die durch den entstehenden Protonengradienten den Zelltod und somit eine Nährstofffreisetzung bewirkt (31).

Essentielle Pathogenitätsfaktoren für die meisten Gram-negativen Pathogene sind vor allem spezialisierte Sekretionssysteme, wie das Typ-III (T3)- und das Typ-IV-Sekretions-System (T4SS). Das **T4SS** transloziert DNA in die Wirtszellen. Das am besten untersuchte T4SS von *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt den Transfer der T (Transfer)-DNA in

den Zellkern von Pflanzenzellen. Mit Ausnahme von *Agrobacterium* spp. und *Xylella fastidiosa* wird die Pathogenität Gram-negativer Phytopathogene jedoch maßgeblich durch das **T3SS** bestimmt, welches in Pflanzen- und Tierpathogenen stark konserviert ist (72, 310, 326, 343). Die Analyse nicht pathogener Stämme von *P. syringae* führten zur Entdeckung der *hrp*-Gene, welche sowohl für die Induktion der hypersensitiven Reaktion in resistenten Pflanzen als auch für die Pathogenität des Bakteriums in anfälligen Pflanzen essentiell sind. Die Produkte der *hrp*-Gene sind für die Ausbildung des T3S-Systems notwendig (12, 207, 247, 326). T3SS-Gene wurden nicht nur für Pflanzen- und Tierpathogene, sondern auch für symbiotisch lebende Rhizobien beschrieben (55, 72, 220, 346).

1.4.1. Das T3SS wird durch die *hrp*-Gene kodiert

Die bakteriellen *hrp*-Gene sind im Genom als Cluster organisiert. Angrenzend befinden sich häufig mobile genetische Elemente sowie Gene für t-RNA-Moleküle, Virulenzfaktoren und Effektorproteine. Die genannten Eigenschaften sind typisch für Pathogenitätsinseln, welche vermutlich durch horizontalen Gentransfer in das Genom aufgenommen wurden (10, 85, 136, 251, 329).

In *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) umfasst das *hrp*-Gen-Cluster 35,3 kb und enthält mindestens sechs Operone (*hrpA-hrpF*, 46, 99, 100). 18 dieser Gene kodieren für Hrp-Proteine, wobei elf in Tier- und Pflanzenpathogenen konserviert sind und daher als Hrc-Proteine bezeichnet wurden (Hrp „conserved“, Hrp konserviert, 41, 140, 326). Viele Hrc-Proteine weisen außerdem Ähnlichkeiten zu Proteinen des bakteriellen Flagellum-Apparates auf (8, 263, 326). Sowohl *hrp*- als auch *hrc*-Gene sind für die Pathogenität des Bakteriums unabdingbar, wohingegen die *hpa*-(*hrp* assoziierten) Gene an der Ausbildung der Krankheitssymptome beteiligt, aber nicht essentiell sind (154). Die Expression der *hrp*-Gene erfolgt nur in der Pflanze und in speziellen Minimalmedien, welche vermutlich das Milieu des Apoplasten der Pflanze nachahmen (44, 206, 300). Die *hrp*-Gene in *Xcv* werden von HrpG und HrpX reguliert. HrpG, ein 2-Komponenten-Regulator der OmpR-Familie aktiviert HrpX (250, 357). HrpX ist ein Transkriptions-aktivator des AraC-Typs, welcher die Mehrzahl der *hrp*-Gene reguliert (357). Die meisten Promotoren der durch HrpX regulierten Gene enthalten ein konserviertes regulatorisches Element, die PIP (Pflanzen induzierbarer Promotor)-Box (TTCGC-N₁₅-TTCGC), an die HrpX bindet (190).

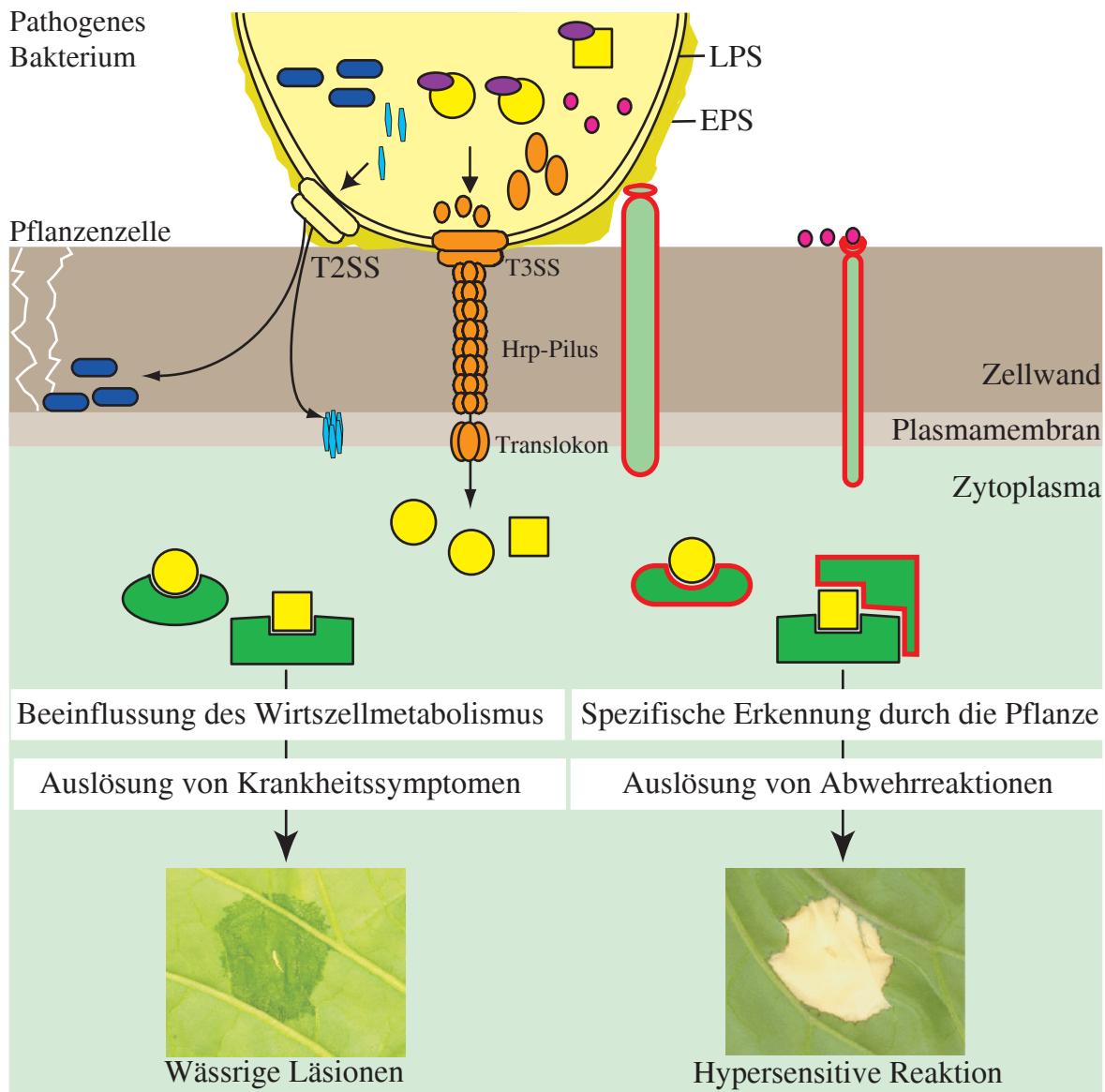


Abbildung 2: Modell der Interaktion zwischen Gram-negativen phytopathogenen Bakterien und ihren Wirtspflanzen.

Gezeigt ist ein Modell einer Interaktion zwischen einem extrazellulär lebenden phytopathogenen Bakterium und einer pflanzlichen Wirtszelle. Das Bakterium könnte über Adhäsine und extrazelluläre Polysaccharide (EPS) an der Pflanzenzellwand haften bleiben. Extrazelluläre Enzyme (blau), wie z.B. Zellulasen sowie Toxine (hellblau) werden durch das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS, gelb) sekretiert. Zellulasen bauen die pflanzliche Zellwand ab und erleichtern den Zugang zur Plasmamembran, in die Toxine inserieren können. Die entstehende Pore verursacht einen Protonenaustritt und somit den Zelltod, wodurch Nährstoffe freigesetzt werden. Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS, orange) sekretiert Pilus-Untereinheiten (rund) und Translokonproteine (oval). Durch den Hrp-Pilus werden Harpine (pink) in den Apoplasten sekretiert und T3-Effektorproteine (gelb), vermittelt durch T3-Chaperone (violett), in die Pflanzenzelle transloziert. In der Pflanzenzelle interferieren Effektoren mit dem Metabolismus, so dass Krankheitssymptome, wie z.B. wässrige Läsionen ausgelöst werden. Dafür interagieren Effektoren vermutlich mit Wirtszellproteinen (Virulenzzielproteine, grün). Pflanzen haben jedoch auch Rezeptoren (rot umrandet) zur Erkennung des Pathogens evolviert. Einige Rezeptoren (hellgrün) erkennen weit verbreitete bakterielle Proteine und Moleküle wie LPS, EPS und Harpine; andere (dunkelgrün) erkennen spezifisch bestimmte Effektoren. Diese Erkennung kann direkt oder indirekt erfolgen und führt zur Induktion einer HR. Bei den gezeigten Pflanzenreaktionen handelt es sich um Laborphänotypen nach Injektion des Pathogens mit hoher Dichte.

1.4.2. Der Aufbau des T3SS phytopathogener Bakterien

Das T3SS besteht aus einem basalen T3S-Apparat, einem T3-Pilus und einem Translokon-Komplex. Das T3SS befähigt das Bakterium, Proteine, so genannte Effektoren, secunabhängig aus dem bakteriellen Zytoplasma direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle zu injizieren (152). Die Hrc-Proteine bilden vermutlich den multimeren Hauptkomplex des Sekretionsapparates, welcher die bakteriellen Membranen durchspannt (8, 38, 140, 152, 287, 326, 340). Die ATP-Spaltung für den energieverbrauchenden Prozess der Translokation der T3-Substrate erfolgt im Zytoplasma an der konservierten ATPase HrcN, welche mit der inneren bakteriellen Membran assoziiert ist (Abbildung 3).

T3-Pili wurden unter induzierenden Bedingungen an der Zelloberfläche von Pflanzenpathogenen beobachtet und sind sowohl für die Sekretion *in vitro* als auch für die Pathogenität in der Pflanze essentiell (52, 150, 163, 284, 339). Sie weisen einen Durchmesser von 8-10 nm auf und können eine Länge von 2 µm erreichen. Dies ist wesentlich länger im Vergleich zu den T3-Nadeln tierpathogener Bakterien, da durch die ca. 200 nm dicke pflanzliche Zellwand ein Kontakt zur pflanzlichen Plasmamembran hergestellt werden muss (52, 150). Die Pilusuntereinheit bildenden Hrp-Proteine konnten in *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* und *Xcv* bereits identifiziert werden (HrpA, HrpJ, HrpA, HrpE, (163, 283, 339, 355). Trotz der sehr ähnlichen Struktur der T3-Pili weisen deren Untereinheiten kaum Sequenzähnlichkeiten auf (189, 353, 354). Studien an *Erwinia*, *Pseudomonas* und *Xanthomonas* zeigten, dass die Effektorproteine vermutlich an der Pilusspitze austreten (163, 355).

Um die Proteine direkt ins Wirtszellzytoplasma zu injizieren, wird das Translokon benötigt. Das erste identifizierte mögliche Translokonprotein aus Phytopathogenen war HrpF aus *Xcv*, welches aus der *Xanthomonas*-Zelle sekretiert, jedoch nicht in die Pflanzenzelle transloziert wird (58, 153, 287). Es konnte gezeigt werden, dass HrpF-Moleküle in künstliche Membranen inserieren und Poren bilden (58). Durch solche Poren könnten die Effektorproteine direkt in die Pflanzenzelle sekretiert und somit von der Bakterienzelle in die Pflanzenzelle transloziert werden (Abbildung 3).

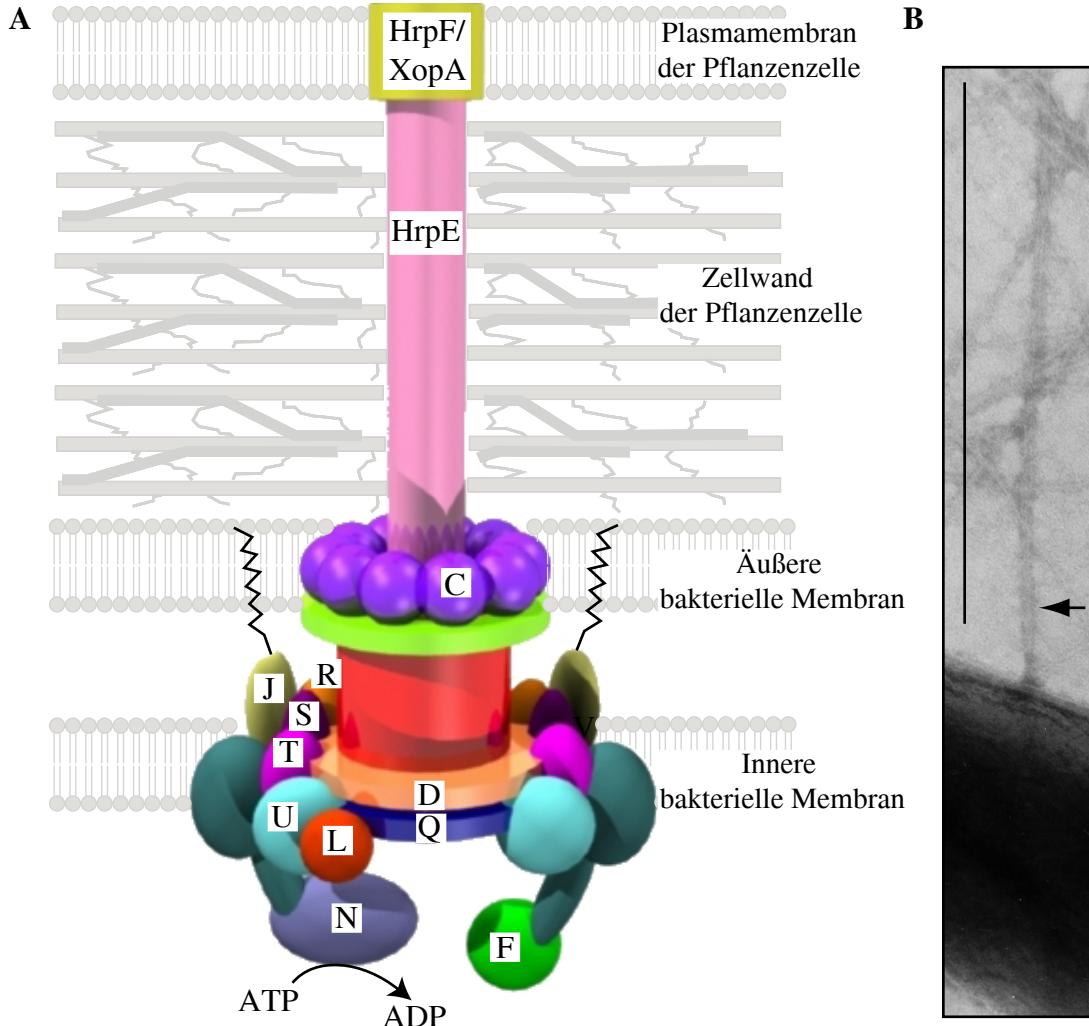


Abbildung 3: Das T3SS von Xcv.

(A) Das Modell des T3SS von *Xcv*. Die konservierten Hrp-Proteine HrcC, D, F, J, L, Q, R, S, T, U und V bilden den T3S-Apparat, welcher innere und äußere bakterielle Membran durchspannt. HrcR, HrcS und HrcT könnten eine Pore in der inneren bakteriellen Membran formen, in welcher auch HrcU und HrcV verankert sind (8, 287, 326). Das Sekretin HrcC könnte eine Pore in der äußeren Membran bilden (38). Die Verbindung zwischen innerer und äußerer bakterieller Membran wird vermutlich durch HrcJ hergestellt (326). Die ATPase HrcN hydrolysiert ATP, wodurch vermutlich Energie für den Translokationsprozess zur Verfügung gestellt wird. Der T3S-Apparat ist wahrscheinlich mit dem T3-Pilus, welcher aus HrpE-Untereinheiten aufgebaut ist, assoziiert. Der Pilus reicht vermutlich durch die pflanzliche Zellwand bis an die pflanzliche Plasmamembran, in welche das Translokonprotein HrpF porenbildend inserieren könnte. Da *xopA*-Mutanten von *Xcv* in ihrer Virulenz eingeschränkt sind, aber Effektoren *in vitro* sekretieren können, wird vermutet, dass XopA an der Bildung des Translokons beteiligt ist (56, 249-251). Durch das Translokon können Effektorproteine in das pflanzliche Zytoplasma transloziert werden. Abbildung modifiziert nach <http://3base.bham.ac.uk>. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Xcv* mit Hrp-Pili. Schwarzer Pfeil deutet auf einen Hrp-Pilus. Der Balken entspricht 0,5 µm. Foto: E. Weber und G. Hause, Martin-Luther-Universität, Halle.

1.4.3. Die Substrate des T3SS: Harpine und Effektorproteine

Die ersten Proteine, welche als T3SS-Substrate identifiziert wurden, waren die Harpine. Dabei handelt es sich um kleine, Glycin reiche, Cystein freie, hitzestabile Proteine, die in der Pflanze nekrotische Symptome auslösen (72). Harpine verbleiben außerhalb der Wirtszelle, wohingegen Effektorproteine direkt in das Wirtszellzytoplasma transloziert werden (93, 201, 267, 273). Dort greifen letztere zum Nutzen des Pathogens in den Metabolismus der Wirtszelle ein. Infolgedessen ist das Pathogen in der Lage, zu wachsen und die Krankheit auszulösen („Virulenzaktivität“ des Effektors). Einzelne Effektoren ermöglichen es resistenten Pflanzen, den Pathogenbefall zu bemerken und abzuwehren („Avirulenzaktivität“ des Effektors). Die ersten aufgrund ihrer Avirulenzaktivität isolierten Effektoren wurden daher als Avr-Proteine bezeichnet (347). Später erfolgte die Identifizierung der Effektoren auch über deren Homologie zu bereits bekannten Effektoren sowie über deren Koregulation mit dem T3SS (132).

1.4.3.1. Die Sekretion der Typ-III-Substrate

Substrate der meisten Sekretionssysteme zeichnen sich durch besondere gemeinsame Merkmale aus: Sie können N-terminale Signalsequenzen enthalten, die prozessiert werden (37), ein Motiv aus basischen Aminosäuren (179) oder eine spezifische Aminosäureabfolge enthalten (191) oder aber eine bestimmte Tertiärstruktur aufweisen (266). Interessanterweise werden die Substrate des T3SS aber sec-unabhängig ohne Abspaltung eines konservierten Signalpeptides sekretiert. Die Tatsache, dass einige T3-Effektoren durch T3S-Systeme verschiedener Spezies und durch das Flagellarsystem sekretiert werden können, deutet jedoch auf Gemeinsamkeiten dieser Proteine hin (202, 288, 320, 369, 370). Trotz intensiver Forschung konnte die Natur des T3S-Signals jedoch bislang nicht geklärt werden. Einige Studien postulieren ein Sekretionssignal in der mRNA (14-16, 240), wohingegen andere Arbeiten zeigen konnten, dass das T3S-Signal im N-Terminus der sekretierten Proteine verschlüsselt ist (134, 210, 211, 269). Die Analyse einer Vielzahl von Effektoren aus *P. syringae* ergab charakteristische Merkmale in den N-terminalen 50 Aminosäuren. Dazu zählen Isoleucin-, Leucin-, Valin-, Alanin- und Prolinreste an der dritten oder vierten Position der Polypeptidkette, ein hoher Gehalt an Serinresten und das Fehlen saurer Aminosäurereste an den Positionen 1 bis 12 (134, 269).

Analysen von AvrBs2 aus *Xcv* zeigten, dass die Aminosäurereste 1-28 und 1-58 für die Sekretion und Translokation des Effektors benötigt werden (240). Der Vergleich der N-Termini einiger Effektoren von *Xcv* ergab ein konserviertes Motiv, bestehend aus einem Prolin, umgeben von basischen Aminosäureresten (L P R P R R R A; 94).

Ein weiteres Modell, wie T3SS-Substrate für die Sekretion adressiert werden könnten, ergab sich durch die Identifizierung spezialisierter T3-Chaperone: Die Bindung dieser Chaperone an T3-Effektoren könnte trotz unterschiedlicher N-terminaler Aminosäuresequenzen der Effektorproteine zur Ausbildung ähnlicher dreidimensionaler Strukturen führen, welche durch das T3SS erkannt werden und die Sekretion ermöglichen (35, 118). Chaperone dienen normalerweise der Stabilisierung ihrer Substrate während deren Synthese, indem sie an die entstehende Polypeptidkette binden und Fehlfaltung oder Abbau des Peptids verhindern (92, 109, 332). Im Gegensatz dazu verhindern T3-Chaperone vor allem die Aggregation von Effektoren und halten diese in einem teilweise entfalteten Zustand (118, 204, 261, 315), um die Passage durch das T3SS zu ermöglichen. Analysen von T3-Chaperonen tierpathogener Bakterien zeigten, dass T3-Chaperone auch an Komponenten der Sekretionsmaschinerie binden, wodurch deren Substrate in direkten Kontakt mit dem T3S-Apparat gebracht werden (9, 116, 330, 331). T3-Chaperone weisen kaum Sequenzähnlichkeiten auf. Es handelt sich meist um saure, kleine (ca. 15 kDa) Proteine mit einem hohen Anteil an Leucin sowie einer amphipathischen Region im C-Terminus (55). Für die T3-Chaperone tierpathogener Bakterien wurden verschiedene Klassen definiert (265). T3-Chaperone der Klasse IA interagieren spezifisch mit einem Effektorprotein (352), während Klasse IB-Chaperone an mehrere, nicht homologe Effektoren binden. Für phytopathogene Bakterien, wie *Erwinia* und *P. syringae* wurden vor allem Chaperone der Klasse IA beschrieben, nicht jedoch für *Xanthomonas*. Die Bindestelle der T3-Chaperon-Moleküle liegt oft im N-Terminus ihrer Substrate (141).

1.4.3.2. Die Translokation der Effektorproteine

Erste Hinweise, dass Effektoren pathogener Prokaryoten in die Wirtszelle transloziert werden, lieferten eukaryotische Motive in deren Proteinsequenz. Das Vorhandensein von Kernlokalisierungsmotiven in AvrBs3-Homologen aus *Xanthomonas* und Myristoylierungsmotive in Effektoren aus *Pseudomonas* (AvrB, AvrRpm1, AvrPphB, AvrPto), das bei pflanzlichen Proteinen die Assoziation mit der Plasmamembran erlaubt, ließen vermuten, dass diese bakteriellen Proteine in eukaryotischen Wirtszellen agieren

(47, 248, 305, 336, 359). Die transiente Expression von Effektorgenen direkt in pflanzlichen Zellen mittels *Agrobacterium tumefaciens* führte zur Induktion spezifischer HR in resistenten Pflanzen (336). Im Gegensatz dazu wurde bei Infiltration von Effektorproteinen (z.B. AvrBs3 aus *Xanthomonas* oder AvrB aus *Pseudomonas*) in den Interzellularraum des Pflanzengewebes keine HR beobachtet (121, 336). Diese Experimente zeigten, dass Effektoren in der Pflanzenzelle erkannt werden. Dies ließ wiederum den Schluss zu, dass Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert werden. Für eine wachsende Anzahl bakterieller Proteine konnte dieser experimentelle Ansatz seither genutzt werden, um deren Funktion als Effektorproteine in der Pflanzenzelle zu demonstrieren.

Um die Translokation von Effektoren in Pflanzenzellen zu zeigen, wurde ein Reporterbasierter Ansatz entwickelt, welcher die Calmodulin abhängige Adenylylat-Zyklase-Domäne des Zyklolyns aus *Bordetella pertussis* (Cya) nutzt. In Bakterien ist die Zyklase nicht aktiv, da diese kein Calmodulin bilden. Außerdem wird das Enzym nur als Fusion zu T3S-Signalen bakterieller Effektorproteine über das T3SS sekretiert. So konnte in Pflanzen, welche mit einem *Xcv*-Stamm infiltriert wurden, der *avrBs2:cya* exprimiert, eine Aktivität der Adenylylat-Zyklase gemessen werden, wodurch die Translokation von AvrBs2 gezeigt wurde (60). Mit Hilfe dieser Methode wurde die Translokation bereits für viele weitere T3-Effektoren nachgewiesen (282, 294).

Der direkte Nachweis der T3SS abhängigen Translokation eines Effektorproteins in die Pflanzenzelle erfolgte jedoch mittels immunzytochemischen Untersuchungen von AvrBs3 aus *Xcv* (325). Dabei erlaubte die Verwendung spezifischer AvrBs3-Antikörper die Detektion des Effektorproteins in Zellkernen von Pflanzenzellen nach Infektion mit *Xanthomonas*.

1.4.3.3. Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr durch Effektorproteine

Obwohl viele Effektoren das Wirtsspektrum des Pathogens einschränken, indem sie in resistenten Pflanzenlinien eine HR auslösen, besteht die eigentliche Aufgabe der Effektoren darin, die Virulenz des Bakteriums positiv zu beeinflussen. Dies kann z.B. durch die Unterdrückung der Basalabwehr der Pflanze erfolgen.

Pathogene sind in der Lage, die ersten pflanzlichen Abwehrreaktionen, wie Kalloseauflagerungen, SA-Akkumulation und PCD zu verhindern oder zumindest zu verzögern. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass T3-Effektoren eine den

Zelltod verzögernde Aktivität (CDS, „cell death suppression“) besitzen können (1). Dafür nutzen die verschiedenen Effektoren unterschiedliche Mechanismen, um nicht nur der basalen Abwehr, sondern auch der *R*-Gen vermittelten Abwehr entgegenzuwirken. Theoretisch sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie Effektorproteine die Erkennung des Pathogens durch die Pflanze verhindern können: (i) Die Expression des *avr*-Gens wird unterdrückt, (ii) Sekretion und Translokation des Avr-Proteins werden blockiert, (iii) ein Effektor blockiert die Signalübertragung nach Erkennung des Avr-Proteins oder (iv) ein Effektor stört die Avr-R-Erkennung in der Pflanzenzelle (158, 334). Letzteres wird durch Untersuchungen verschiedener Effektoren mit CDS-Aktivität unterstützt (277, 280).

Die meisten bisher identifizierten, den Zelltod verzögernden, Effektoren stammen aus *Pseudomonas*-Stämmen (Tabelle 2; 1, 3, 50, 95, 138, 158, 160, 212, 334). Dabei ist die CDS-Aktivität dieser Effektoren vom Alter der Pflanze, der Außentemperatur, der Pflanzenart und der bakteriellen Dichte während der Infektion abhängig.

Erste Hinweise darauf, dass auch Effektoren von *Xanthomonas* die pflanzliche Abwehr unterdrücken können, lieferten elektronenmikroskopische Arbeiten von Brown *et al.* (1995), welche zeigten, dass T3SS-Mutanten von *Xcv* Kalloseauflagerungen auf der Zellwand von Pflanzenzellen nicht verhindern können (51). Außerdem unterdrückt *Xcv* auch die durch LPS induzierte Basalabwehr in Paprika in Abhängigkeit des T3SS (180). Die dafür verantwortlichen Proteine sind jedoch noch nicht bekannt. Kürzlich wurde eine CDS-Aktivität für das konservierte Protein XopX aus *Xanthomonas* beschrieben (231).

Für einige Effektoren konnten die molekularen Wirkungsmechanismen, die zur Unterdrückung der Abwehr führen, bereits aufgeklärt werden (50, 95, 182, 215).

Tabelle 2: Zelltod inhibierende T3-Effektoren phytopathogener Bakterien.

Effektor	Aktivität	Referenz
<i>Pseudomonas syringae</i>		
AvrPtoB	unterdrückt HopPsyA induzierten PCD, HR in <i>Pto</i> -Tomaten, HR in <i>Pto-N. benthamiana</i> , Cf9 vermittelte HR, Bax vermittelten PCD und PCD in Hefe	3, 4, 77, 138, 160, 171, 195, 275, 291, 304, 338
AvrPto	unterdrückt Kalloseauflagerung und Nichtwirts-PCD	171
AvrRpt2	unterdrückt RPM1 vermittelte Erkennung von AvrRpm1 und AvrB durch RIN4-Abbau	182, 215
HopPtoM	unterdrückt SA-Akkumulierung und Kalloseauflagerung	77
AvrE	unterdrückt SA-Akkumulierung und Kalloseauflagerung	77
VirPphA	CDS-Aktivität in Bohne	158
HopPtoD2	unterdrückt PCD in Tabak durch Tyrosinphosphataseaktivität	50, 95
AvrPphE	unterdrückt HopPsyA und AvrPphF induzierten PCD	160, 334
AvrPpiB1	unterdrückt HopPsyA und AvrPphF induzierten PCD	160, 334
AvrPphF	unterdrückt die durch <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> induzierte HR	334
HopPtoG	unterdrückt HopPsyA induzierten PCD	160
HopPtoE	unterdrückt HopPsyA induzierten PCD	160
HopPtoF	unterdrückt HopPsyA induzierten PCD	160
AvrPphC	unterdrückt AvrPphF induzierten PCD	371
HopPtoN	unterdrückt Nichtwirts-HR, reduziert durch <i>P. syringae</i> induzierte nekrotische Läsionen	212
<i>Erwinia amylovora</i>		
DspA/E	unterdrückt SA-Akkumulierung und Kalloseauflagerung	77
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
XopX	verstärkt Anfälligkeit der Wirtspflanze und Wachstum von Pathogenen auf Nichtwirtspflanzen	231

1.4.3.4. T3-Effektoren mit enzymatischer Funktion

Die molekulare Wirkungsweise der meisten T3-Effektorproteine ist unbekannt. In einigen Fällen geben jedoch Ähnlichkeiten zu Primärsequenzen anderer Proteine Hinweise auf eine mögliche enzymatische Funktion. So weisen z.B. mehrere Effektoren aus *P. syringae* pv. *tomato* Sequenzähnlichkeiten zu ADP-Ribosyltransferasen auf und könnten daher mit Signalkaskaden in Pflanzen interferieren (67).

Für HopPtoD2 aus *Pseudomonas* konnte gezeigt werden, dass es als Tyrosinphosphatase aktiv ist und mit dem MAPK-Signalweg interferiert, wodurch die pflanzliche Abwehr

verzögert, das bakterielle Wachstum verbessert und die *PR1*-Genexpression vermindert wird (50, 95, 269).

Für die Mitglieder der AvrRxv/YopJ-Familie, welche sowohl in phyto- als auch in tierpathogenen Bakterien identifiziert wurden, führte erst die vergleichende Analyse der vorhergesagten Sekundärstrukturen zur Ableitung einer möglichen enzymatischen Funktion als Cystein- bzw. SUMO-Protease (257, 259). SUMO-Proteasen entfernen kleine, Ubiquitin ähnliche, modifizierende Proteine („small ubiquitin-like modifier protein“, SUMO) von ihren Zielproteinen (146, 147), wodurch es zur Ubiquitylierung und folglich zum Abbau des Zielproteins kommt. Für die Familienmitglieder AvrXv4 und XopD aus *Xanthomonas* konnte bei transienter Expression in der Pflanze eine Abnahme SUMOylierter Wirtsproteine gezeigt werden (148, 281). Für vier Effektorproteine der AvrRxv/YopJ-Familie (YopJ aus *Yersinia*, AopP aus *Aeromonas*, VopA aus *Vibrio* und AvrA aus *Salmonella*) wurde eine inhibierende Wirkung auf den MAPK/NFκB-Signalweg gezeigt (66, 97, 241, 333). Interessanterweise zeigten neue Studien, dass YopJ, welches an MAPK-Kinasen bindet (258), als Acetyltransferase und nicht als Protease agiert (241).

Im Fall von AvrPtoB führte erst die Aufklärung der Kristallstruktur zur Entschlüsselung der Funktion des Effektors als E3-Ubiquitin-Ligase in der Pflanze (2, 161), ein Mechanismus, der für virale Proteine bereits bekannt ist (48, 151). Die enzymatische Aktivität von AvrPtoB führt zur Unterdrückung der basalen Abwehr der Pflanze (2).

Trotz Aufklärung der enzymatischen Funktion von Effektoren sind deren Substrate nur in wenigen Fällen bekannt: HopAR1 (früher AvrPphB) aus *Pseudomonas*, z.B., ist eine aktive Cysteinprotease, welche die Threonin-Protein-Kinase PBS1 in *Arabidopsis* degradiert (306). Dieser Abbau wird durch das R-Protein RPS5 detektiert und führt zur Induktion der HR (306).

Ein weiteres, pflanzliches Zielprotein von T3-Effektoren konnte mit dem *Arabidopsis*-Protein RIN4 identifiziert werden. RIN4 wurde zunächst als Interaktor des Resistenzproteins RPM1 isoliert (29), das AvrRpm1 aus *P. syringae* erkennt. Des Weiteren interagiert RIN4 auch mit dem Resistenzprotein RPS2, welches die Erkennung von AvrRpt2 vermittelt. Interessanterweise wird RIN4 auch von den Effektoren AvrRpt2, AvrRpm1 und AvrB aus *Pseudomonas* gebunden. AvrRpt2 degradiert RIN4 in Abhängigkeit des Pflanzenproteins Cyclophilin (64, 182), während AvrRpm1 und AvrB zur Phosphorylierung von RIN4 führen (20, 182, 215, 216). Die Studien von RIN4 zeigten, dass auch durch das „Guard“-Modell die komplizierten molekularen Mechanismen der Erkennung von Effektormolekülen nicht hinreichend erklärt werden können: RIN4 könnte,

dem Modell folgend, sowohl von RPM1 als auch von RPS2 „bewacht“ werden. Die Analysen ergaben jedoch, dass RPS2 und RPM1 durch RIN4 inhibiert werden und dessen proteolytischer Abbau durch AvrRpt2 bzw. dessen Phosphorylierung durch AvrB und AvrRpm1 zur Aktivierung der R-Proteine und Induktion einer HR führen (20, 29, 215, 216). Es ist demnach nicht sicher, ob RIN4 tatsächlich ein Virulenzzielprotein zum Vorteil des Pathogens darstellt oder ein von der Pflanze evolviertes Protein zur indirekten Erkennung der Effektoren.

1.4.3.5. Wirkung individueller Effektoren bei der Etablierung der Krankheit und der Ausbreitung des Pathogens

Nachdem die pflanzliche Basalabwehr überwunden wurde, kann sich das Pathogen vermehren und spezifische Krankheitssymptome auslösen. Auch dafür sind T3-Effektoren notwendig. DspA aus *E. amylovora*, z.B. bewirkt die Vermehrung des Pathogens in der Pflanze (24, 114). Das homologe AvrE aus *P. syringae* trägt zur bakteriellen Vermehrung und zur Symptomausprägung in Tomate bei (213). Interessanterweise sind DspA und AvrE funktionell austauschbar (40, 42). Für *avrBs2*-Mutanten von *Xcv* wurde z.B. ein reduziertes Wachstum in der Pflanze beobachtet (176). Die Tatsache, dass *avrBs2* in allen Stämmen von *Xcv* sowie in anderen Xanthomonaden konserviert ist, spricht für eine wichtige Rolle des Effektors während der Pathogenese (233). Einige T3-Effektoren unterstützen auch die Weiterverbreitung des Pathogens, indem sie die Freisetzung der bakteriellen Zellen an die Blattoberfläche verstärken (z.B. PthA aus *X. citri*, Avrb6 aus *X. campestris* pv. *malvacearum*; AvrRpt2 aus *P. syringae* pv. *maculicola*; 133, 368).

1.5. Das Modellsystem *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Vertreter der Gattung *Xanthomonas* verursachen weltweit verschiedenste Krankheiten auf bedeutenden Nutzpflanzen wie Reis, Soja, Zitrone, Baumwolle, Kohl, Paprika und Tomate (Abbildung 4) und führen dadurch zu erheblichen Ernteausfällen (6). Die Bakterien gelangen in Wassertropfen zunächst auf die Oberfläche von Laubblättern und anderen Pflanzenorganen bevor sie über Stomata, Hydathoden oder Verletzungen des Pflanzengewebes in den Interzellularraum des Mesophylls eindringen. Dort vermehren, d.h., teilen sich die Bakterien. Einige Arten, wie z.B. *X. campestris* pv. *campestris*, können

jedoch auch das Xylem befallen und sich systemisch in der Pflanze ausbreiten. Nach ihrer Vermehrung gelangen die bakteriellen Zellen durch nekrotische Reaktionen wieder an die Pflanzenoberfläche und werden durch Insekten und Regen an neue Infektionsstellen transportiert.

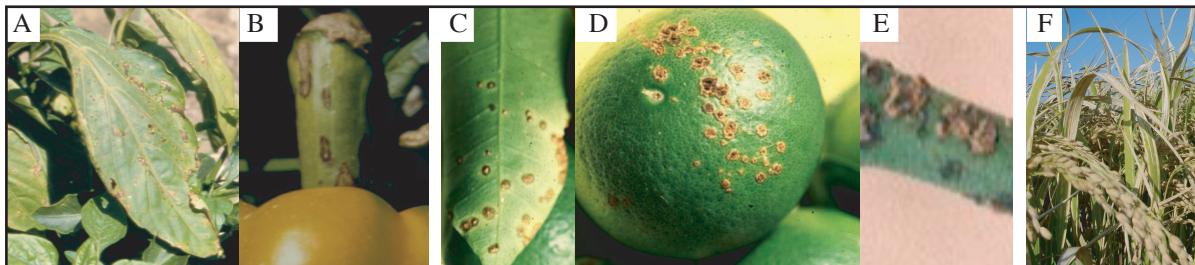


Abbildung 4: Durch *Xanthomonas* ausgelöste Krankheiten auf Nutzpflanzen.

Arten des Pathogens *Xanthomonas* verursachen die unterschiedlichsten Krankheitssymptome bei verschiedenen Nutzpflanzen: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* verursacht die bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate. Die Symptome sind wässrige Läsionen an Blättern und Früchten, die später nekrotisch werden (**A-B**). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* löst Krebs auf Zitrusgewächsen aus. Dabei entstehen erhöhte Läsionen auf Blättern, Früchten und Stängeln, welche zunächst zu Pusteln und später zu braunen, korkartigen Tumoren werden (**C-E**). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ist der Auslöser der Weißblättrigkeit bei Reispflanzen. Typische Krankheitssymptome sind wässrige bis gelbe Streifen auf den befallenen Blättern, welche sich mit Ausbreiten des Pathogens verlängern (**F**). Abbildung modifiziert nach Gürlebeck et al., 2006.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye (*Xcv*), auch als *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (345) oder *X. euvesicatoria* (165) bezeichnet, ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“; 166) bei Paprika (*Capsicum* spp.) und Tomate (*Lycopersicon* spp.). *Xcv* vermehrt sich lokal im Mesophyll der Pflanze (Abbildung 5). Aufgrund der Zugänglichkeit für genetische Analysen stellt *Xcv* ein gutes Modell zum Studium von Pathogen-Wirt-Interaktionen dar. Die kürzlich erfolgte vollständige Sequenzierung des *Xcv*-Stammes 85-10 sowie anderer *Xanthomonas*-Stämme eröffnen neue Möglichkeiten für die wissenschaftliche Analyse der Pathogene und ihrer Interaktion mit den Wirtspflanzen (74, 200, 254, 272, 329). Dabei gilt es zu klären, wie die Infektion der Wirtspflanze erfolgt und wie Krankheitssymptome ausgelöst werden können.

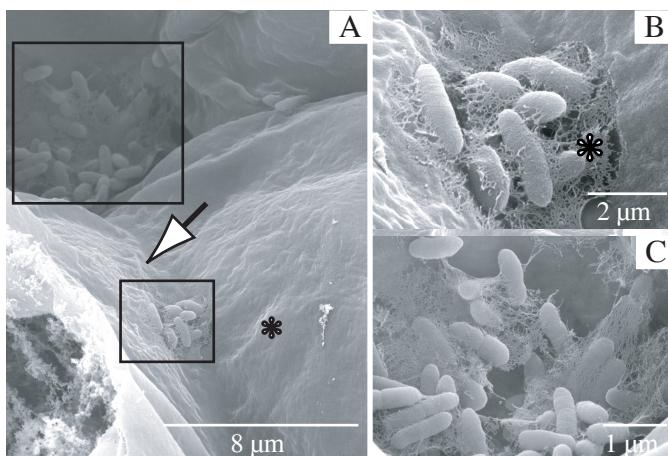


Abbildung 5: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* im Interzellularraum des Mesophylls einer infizierten Paprikapflanze.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 im Interzellularraum des Mesophylls der suszeptiblen Wirtspflanze *Capsicum annuum* cv. ECW (A, weißer Pfeil zeigt Zellwand zwischen zwei Mesophyllzellen, Stern markiert eine Mesophyllzelle). Zwei Bakterienkolonien sind sichtbar (schwarz umrandet). Die *Xanthomonas*-Zellen haften, von EPS umgeben (B, schwarzer Stern), an der Zellwand von Mesophyllzellen und teilen sich im Apoplasten (C). Fotos: Gerd Hause, Biozentrum Halle.

1.6. Das Effektorprotein AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

AvrBs3 ist eines der am besten untersuchten Effektorproteine von *Xcv* (47). *avrBs3* ist der namensgebende Begründer einer großen Genfamilie, deren Mitglieder zu 90-97% sequenzidentisch sind (132). Interessanterweise wurden AvrBs3-Familienmitglieder nur in Arten der Gattung *Xanthomonas* gefunden. Die einzige Ausnahme bildet Brg11, welches aber ebenfalls aus einem phytopathogenen Bakterium identifiziert wurde und nur teilweise den Mitgliedern der AvrBs3-Familie ähnelt (73).

avrBs3 wurde 1989 aufgrund seiner Avirulenzaktivität in resistenten Paprikapflanzen (*C. annuum*) der Kulturvarietät ECW-30R aus dem *Xcv*-Stamm 71-21 isoliert (47). Das für die spezifische Erkennung von AvrBs3 verantwortliche Resistenzgen *Bs3* wird dominant monohybrid vererbt und war zu Beginn der Arbeit noch nicht isoliert (181, T. Jordan, P. Römer und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten).

In suszeptiblen Wirts- und Nichtwirtspflanzen induzieren *Xcv*- bzw. *Agrobacterium*-Stämme, welche *avrBs3* enthalten, eine Pustelbildung auf der Unterseite der Blätter. Mikroskopische Untersuchungen der infizierten Blattbereiche zeigten, dass es sich dabei um eine Hypertrophie, d. h. eine Vergrößerung von Mesophyllzellen handelt (221).

AvrBs3 war das zuerst isolierte bakterielle Effektorogen, dessen Produkt interessante Charakteristika, wie Kernlokalisierungssignale („nuclear localization signals“, NLS) und

eine Aktivierungsdomäne (AD) im C-Terminus aufwies. Des Weiteren wurden im C-terminalen Bereich von AvrBs3 Leucin-Zipper ähnliche „Repeats“ postuliert (111). All diese strukturellen Merkmale deuten darauf hin, dass AvrBs3 als Transkriptionsregulator in eukaryotischen Zellen fungiert. Besonders auffallend sind die 17,5 direkten Sequenzwiederholungen („Repeats“) aus je 34 Aminosäureresten im zentralen Bereich der Polypeptidkette. Die Aminosäureabfolge der „Repeats“ ist beinahe identisch, enthält jedoch auch hypervariable Aminosäurereste (Abbildung 6).

Interessanterweise wird die Erkennungsspezifität von AvrBs3 durch die zentralen „Repeats“ determiniert (145). Die Deletion einzelner Sequenzwiederholungen kann zu einer veränderten Erkennung des Avr-Proteins führen. So induziert z.B. AvrBs3 Δ rep-16, in welchem die „Repeats“ 11-14 fehlen, keine HR in *Bs3*-Pflanzen, wohl aber in der isogenen Linie *C. annuum* ECW, welche *bs3* enthält (145). Sowohl die Induktion der Hypertrophie als auch die Erkennung von AvrBs3 hängen von der Anwesenheit der NLS und der AD im C-Terminus des Proteins ab (221, 324, 336). Dies führte zu der Annahme, dass das AvrBs3-Protein im Zellkern durch Bs3 erkannt wird oder die Erkennung von der Aktivität des Effektors als Transkriptionsaktivator abhängt. Letzteres konnte für das homologe Familienmitglied AvrXa27 aus *Xoo* gezeigt werden (129, 130).

AvrBs3 wird in Abhängigkeit der NLS 2 und 3 aus *Xcv* in Zellkerne von Pflanzenzellen transloziert (325, 336), wohingegen die vorhergesagte NLS 1 vermutlich nicht funktional ist (336). Wurden die N-terminalen Aminosäuren 3–27 oder 2–153 von AvrBs3 deletiert, so konnte *Xcv* die resultierenden Proteine AvrBs3 Δ 1 bzw. AvrBs3 Δ 2 weder in Kulturmedium sekretieren noch in die Pflanzenzelle translozieren (325). Bei transienter Expression der entsprechenden Gene in der Pflanze mittels *Agrobacterium* erfolgte jedoch eine Induktion der HR in resistenten sowie einer Hypertrophie in suszeptiblen Pflanzen. Diese Resultate zeigten, dass die N-terminalen Aminosäuren das Translokationssignal enthalten, während die C-terminal gelegenen Aminosäurereste die Effektoraktivität gewährleisten.

Da für AvrBs3 eine Funktion als Transkriptionsregulator angenommen wird, sind als potentielle Virulenzziele des Effektors sowohl pflanzliche Proteine als auch pflanzliche Gene denkbar. Um Proteine zu identifizieren, an welche AvrBs3 in der Pflanze bindet, wurden in vorangegangenen Arbeiten Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen durchgeführt. Die Hefe-

Di-Hybrid-Sichtung einer Paprika (*C. annuum*)-cDNA-Bank führte zur Identifizierung mehrerer Proteine, welche mit AvrBs3 interagieren, darunter zwei Importin α -Homologe (CaIMP α 1 und 2; 324). Die Interaktion von AvrBs3 mit CaIMP α 1 und 2 konnte *in vitro* bestätigt werden. Weitere Studien zeigten, dass CaIMP α 1 und CaIMP α 2 an die NLS2 des Effektors in Hefe binden. Diese Resultate deuten an, dass AvrBs3 in der Wirtszelle mit Importin α interagiert. Die Interaktion von Importin α mit Importin β könnte dann den Transport in den Zellkern vermitteln (194). Dort dissoziiert der Proteinkomplex vermutlich, und die Importin-Moleküle werden in das Zytoplasma exportiert.

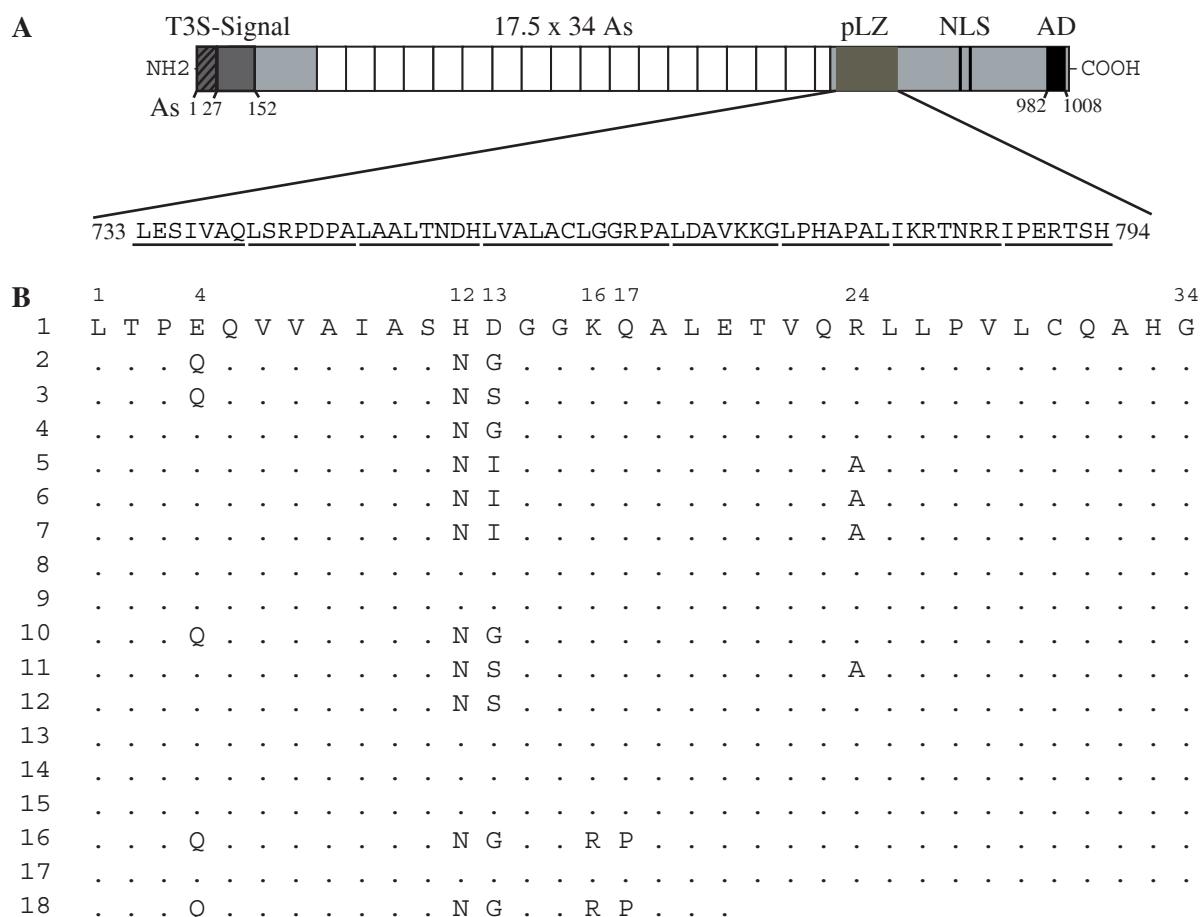


Abbildung 6: Strukturelle Merkmale von AvrBs3 aus *Xcv*.

(A) Strukturelle Eigenschaften von AvrBs3: Der N-Terminus von AvrBs3 enthält das T3-Sekretions- und Translokationssignal (T3S-Signal; 287, 325). Der zentrale Bereich der Polypeptidkette besteht aus 17,5 direkten Sequenzwiederholungen aus je 34 Aminosäuren. Im C-Terminus befinden sich imperfekte Leucin-Zipper-„Repeats“ (pLZ; 111), zwei funktionale Kernlokalisierungssignale (NLS; 324, 336) sowie eine Aktivierungsdomäne (AD; 324). **(B)** Sequenzvergleich der ersten Sequenzwiederholung mit den folgenden „Repeats“ des zentralen Proteinbereiches. Die variablen Aminosäurereste sind angegeben.

AvrBs3 könnte dann im Zellkern die Transkription von Wirtsgenen beeinflussen. Tatsächlich wurden AvrBs3 abhängig induzierte Pflanzengene isoliert (221; S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Einige dieser Gene kodieren für Pektatlyasen und α -Expansine, welche an der Zellvergrößerung, der Hypertrophie, beteiligt sein könnten. Da die Aktivierung der Gene von einer *de novo*-Proteinsynthese in der Pflanzenzelle abhängt, werden diese vermutlich nicht direkt durch AvrBs3 induziert. Es wurden jedoch auch Gene gefunden, die potentielle Primärziele von AvrBs3 darstellen (221; E. Marois, S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es ist bisher nicht geklärt, ob AvrBs3 direkt an Promotoren solcher Zielgene bindet oder im Komplex mit Wirtszellproteinen als Koaktivator agiert. Letzteres scheint wahrscheinlich, da *in silico*-Untersuchungen mit AvrBs3 keine DNA-Bindedomäne im Effektorprotein vorhersagen. Bei solchen, mit AvrBs3 interagierenden Proteinen (Aip), könnte es sich um pflanzliche Transkriptionsfaktoren handeln, welche eine DNA-Bindedomäne besitzen und an Promotorsequenzen binden können. In den vorangegangenen Arbeiten wurden neben CaIMPo1 und 2 auch andere pflanzliche Proteine mittels Hefe-Di-Hybrid-Ansätze identifiziert, welche in Hefe mit AvrBs3 interagieren (324). Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen von AvrBs3 sind in Abbildung 7 in einem Arbeitsmodell zusammengefasst.

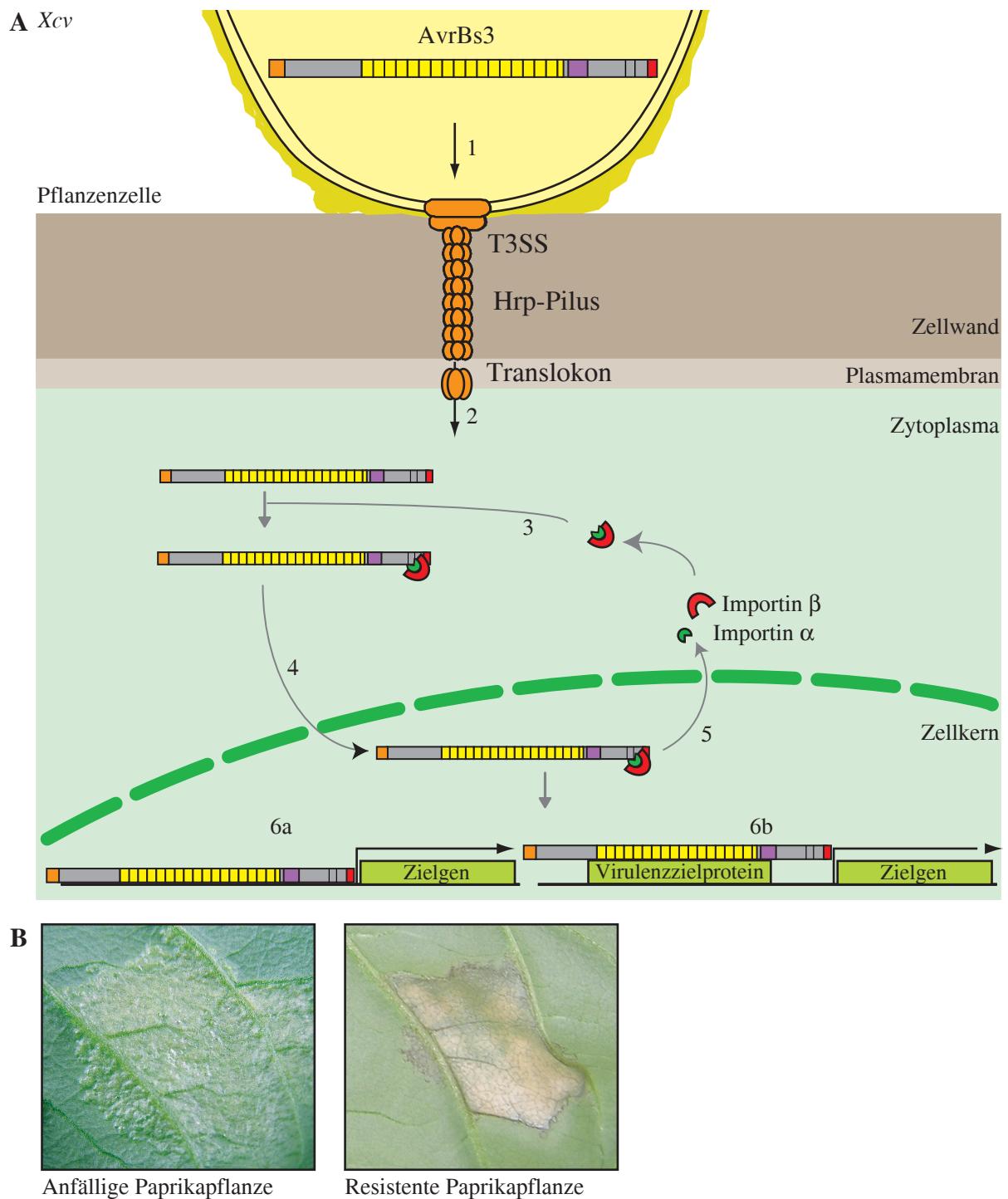


Abbildung 7: Arbeitsmodell zur Wirkungsweise von AvrBs3 in der Wirtszelle.

(A) AvrBs3 wird aus der Bakterienzelle sekretiert (1) und in das Wirtszellzytoplasma transloziert (2; 325). Im pflanzlichen Zytosol erfolgt vermutlich eine Interaktion mit Importin α -Importin β -Komplexen (3; 324), wodurch der Import von AvrBs3 in den pflanzlichen Zellkern vermittelt werden könnte (4; 325). Im Zellkern dissoziiert der Komplex (5) und AvrBs3 bindet dann direkt (6a) oder indirekt (6b) im Komplex mit anderen Pflanzenproteinen, so genannten Virulenzzielproteinen, an DNA (Zielgene), um das Wirtszelltranskriptom zu modifizieren (221). (B) Die Veränderung der Gentranskription resultiert in anfälligen Pflanzen in einer Pustelbildung an der Blattunterseite und in resistenten Pflanzen in einer HR.

1.7. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungsweise des Effektors AvrBs3 weiterführend zu analysieren. Im Vordergrund stand die Identifizierung und Analyse von Proteinen, welche mit AvrBs3 interagieren. Dabei galt es folgende Fragestellungen zu bearbeiten: Welche Protein-Protein-Interaktionen spielen eine Rolle (i) bei der Sekretion und Translokation von AvrBs3, (ii) im Zytoplasma der Pflanzenzelle und (iii) im Zellkern, dem Zielkompartiment des Effektors AvrBs3?

Für die Identifizierung neuer pflanzlicher Zielproteine sollte eine neue Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank erstellt und gesichtet werden. Pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs3 sollten in Hefe, *in vitro* und *in planta* mittels Lokalisierungs-, Kolokalisierungs-, Koimmunopräzipitationsanalysen sowie unter Verwendung der Methoden der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation und des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers näher untersucht werden. Um die biologische Relevanz identifizierter Interaktoren für die Pflanzen-Pathogen-Interaktion zu überprüfen, sollten „Silencing“-Experimente mittels Virus induziertem Gen-„Silencing“ sowie Überexpressionsstudien mittels *Agrobacterium* in der Pflanze erfolgen.

Da zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Effektoren und deren Untersuchungen visualisierbare Reaktionen in der Pflanze hilfreich sind, sollte in dieser Arbeit auch untersucht werden, welche sichtbaren und messbaren Virulenzreaktionen von AvrBs3, AvrBs1 und dem AvrBs3-homologen Effektor AvrBs4 in suszeptiblen Pflanzen induziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet: *Escherichia coli* Stamm DH10B (Life Technologies, Rockville, MD, USA), TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), BL21 und BL21(DE3) (319), die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV3101 und C58C1 (341) sowie die *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 82-8 (233), 85-10 (59) und I74A (221, 358), welcher eine Mutante des Stammes 85-10 ist, die langsamer in Kulturmedium und Pflanze wächst als der Wildtypstamm. Die verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme waren EGY48 (*MAT α* ; 96), AH109 (*MATA*; 159) und Y187 (*MAT α* ; 69).

E. coli-Zellen wurden bei 37°C in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen, *A. tumefaciens* bei 30°C in Yeast-Extract-Broth (YEB)-Medium (205, 336), *X. campestris* pv. *vesicatoria* bei 30°C in Nutrient-Yeast-Glycerol (NYG)-Medium (75) und *S. cerevisiae* bei 30°C in Yeast Selection Drop Out (YSD)-Medium (18). Bei Anzucht auf festem Medium wurde 1,5% Agar zugesetzt. Die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte bei *E. coli* und *A. tumefaciens* mittels Elektroporation. In Hefen wurden Plasmide mit Hilfe der PEG-Lithiumacetat-Methode (119) oder durch Paarung eingeführt. Die Paarung zweier Hefestämme erfolgte nach den Angaben des MATCHMAKER-Protokolls (Clontech, Heidelberg, Deutschland).

2.2. Verwendete Pflanzen

Tomaten (*Lycopersicon esculentum*)-Pflanzen der Kulturvarietät (cv.) Moneymaker (MM), Paprika (*Capsicum annuum*)-Pflanzen cv. Early Cal Wonder (ECW) und die isogenen Linien ECW-10R und ECW-30R, welche das Resistenzgen *Bs1* bzw. *Bs3* (233) enthalten, sowie *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden wie beschrieben angezogen (47, 221). Die transiente Expression von Genen in der Pflanze mittels *A. tumefaciens* erfolgte nach Van den Ackerveken et al. (1996).

2.3. Infiltration von Pflanzen

Für Transkomplementationstudien, wurden *A. tumefaciens*-Stämme in Blätter von Paprika ECW-30R infiltriert. Die Phänotypen der Pflanzen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet.

Für Lokalisierungs-, Kolokalisierungs- und Interaktionsstudien wurden Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen mit dem *Agrobacterium* Stamm C58CI (pCH32/pBin6Ip19) (348) zur Unterdrückung des pflanzlichen „Silencing“ und den entsprechenden, die zu untersuchenden Proteine kodierenden Gene enthaltenden *Agrobacterium*-Stämme GV3101 infiltriert. Die Stämme wurden bei einer OD₆₀₀ von 1,0 ($2,5 \times 10^9$ Zellen/ml) miteinander gemischt und wie beschrieben infiltriert (336). Bei Mischen von 3 Stämmen ergab sich eine relative OD₆₀₀ von 0,33 ($8,25 \times 10^8$ Zellen/ml) je Stamm. Für Lokalisierungsstudien wurde ein Stamm mit leerem Vektor zugegeben.

Für Gen-„Silencing“-Experimente wurde die Methode des Virus induzierten Gen-„Silencing“ angewendet (209). Dafür wurden die Agrobakterienstämme GV3101(TRV1) und GV3101(TRV2a) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 ($1,5 \times 10^9$ Zellen/ml) angezogen und zu gleichen Teilen gemischt. Die Bakteriensuspension wurde mittels Vakuum in drei Wochen alte Pflanzen infiltriert.

Xanthomonas-Stämme wurden nach Anzucht auf festem NYG-Medium in 1 mM MgCl₂ resuspendiert und mit einer OD₆₀₀ von 0,01 ($1,25 \times 10^7$ Zellen/ml) bis 0,2 ($2,5 \times 10^8$ Zellen/ml) mittels nadelloser Spritze in die Blattunterseite von Paprikapflanzen infiltriert.

2.4. Konstruktion von Plasmiden mittels GATEWAY-Technologie

Die Erstellung einer Vielzahl der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte mittels GATEWAY-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Diese Methode ermöglicht eine schnelle und gerichtete Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Das GATEWAY-System nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ. Dafür wurden die für diese Rekombinationsreaktionen notwendigen „attachment“ (*att*)-Bereiche modifiziert und in verschiedene Vektoren integriert. Die resultierenden Zielvektoren enthalten *attR1*- und *attR2*-Stellen. Die für die Rekombination notwendigen homologen Bereiche *attL1* und *attL2* sind in Eingangsvektoren („Entry“-Vektoren) enthalten. Das zu untersuchende Gen

wird in einen Eingangsvektor kloniert. Anschließend erfolgt eine LR-Rekombinationsreaktion mit einem Zielvektor, welcher einen Promotor enthält, wodurch ein Expressionsplasmid generiert wird (Abbildung 8). In der *attR*-Kassette ist das *ccdB*-Gen integriert, dessen Expression in *E. coli* DH10B zur Hemmung der Gyrase führt. Durch die LR-Rekombination erfolgt ein Austausch des *ccdB*-Gens gegen das zu untersuchende Gen. Nach erfolgter Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH10B wachsen nur Bakterien, welche ein Expressionsplasmid enthalten.

Die erforderlichen Eingangsplasmide wurden wie folgt erstellt: Für das **AvrBs3**-Eingangsplasmid wurde der 5' Bereich von *avrBs3Δ2* mit den Oligonukleotiden 5'-GTCGACATGGATCTACGCACG-3', welcher eine *SalI* Schnittstelle einführt und 5'-AAGCTTTAACGGTGGACCTC-3', welcher eine *HindIII* Schnittstelle anfügt, amplifiziert. Nach Restriktionsverdau des PCR-Produktes, wurde das Fragment in pENTR-T (S. Schornack und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten) kloniert, so dass pENTR356N entstand. Die Oligonukleotide 5'-AAGCTTGCGTCTTGCATGCATT-3' und 5'-CTGCAGCTGAGGCAAT AGCTC-3' amplifizierten in einer PCR das 3' Ende von *avrBs3Δ2*, bei gleichzeitigem Anfügen einer *HindIII* bzw. einer *PstI* Erkennungssequenz. Das verdaute PCR-Fragment wurde in pENTR356N ligiert, um pENTR356NC zu erhalten. Anschließend wurde das *StuI/AgeI* Fragment von pBS356 (siehe unten) ausgeschnitten und in pENTR356NC kloniert, um das Eingangsplasmid pENTR356 zu erhalten. Des Weiteren wurde das *StuI/SacI* Fragment von pBS356ΔNLS (324) in das zuvor verdaute Plasmid pENTR356 ligiert, um pENTR356ΔNLS zu erhalten. Durch Restriktion von pENTR356 mit *SphI* und anschließender Religation wurde pENTR356ΔSphI erstellt. Somit konnten mittels GATEWAY-Rekombinationsreaktionen Plasmide für die Synthese von AvrBs3Δ2, AvrBs3Δ2ΔNLS und AvrBs3Δ2ΔSphI, welchem die gesamte „Repeat“-Region fehlt, erstellt werden.

Um ein Eingangsplasmid für Untersuchungen von **Caimp α 1** erstellen zu können, wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-caccATGTCTTCGACCTAGCAC-3' und 5'-GCCAAACTTGAATCCACCTG-3' *Caimp α 1* bzw. mit caccATGTCTTCGACCTA GCA C-3' und 5'-CTAGCCAAACTTGAATCCACCTGC-3' *Caimp α 1stop* mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in pENTR/D-TOPO kloniert. Die resultierenden Plasmide pENTRCaimp α 1 und pENTRCaimp α 1stop wurden für Rekombinationen mittels GATEWAY-Technologie verwendet.

Für die Erstellung eines „**LeThiC**“-Eingangsplasmids wurde *LeThiC* mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-caccATGGCGTCTGTCCAACTG-3' und 5'-CACATTCCCTTGGC

TCTTC-3' sowie 5'-caccATGGCGTCTGTCCAACTG-3' und 5'-TACACATTCCCTTG GCTC-3' mittels PCR amplifiziert und in pENTR/D-TOPO kloniert, um die Plasmide pENTRLeThiC und pENTRLeThiCStop zu erstellen.

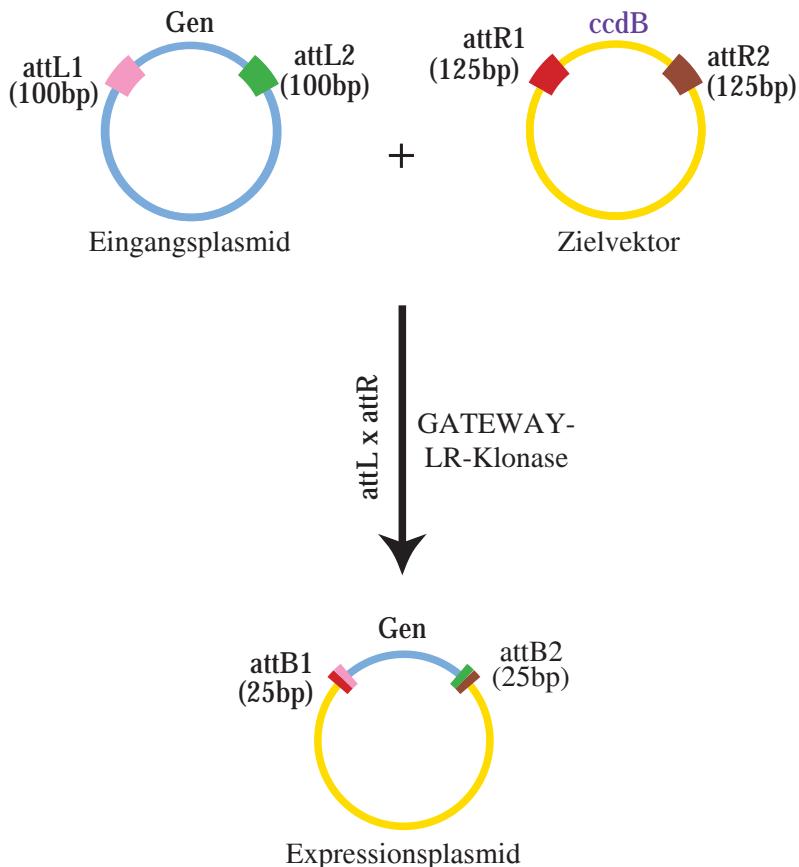


Abbildung 8: Prinzip der Klonierung mittels GATEWAY-Technologie.

Für die Expression von Genen in Hefe, in *E. coli* und in der Pflanze wurden die unterschiedlichen Expressionsplasmide mittels GATEWAY-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erstellt. Die Abbildung zeigt das Prinzip dieser Klonierungs-Technologie. Dabei werden zunächst die erforderlichen Eingangsplasmide generiert (siehe Text). Diese enthalten das zu untersuchende Gen, flankiert von den „attachment“-Stellen *attL1* und *attL2*. Die Eingangsplasmide werden jeweils mit den entsprechenden Zielvektoren, welche über *attR1*- und *attR2*-Stellen verfügen, gemischt. Durch Zugabe der GATEWAY-LR-Klonase erfolgt die Rekombination zwischen den *att*-Stellen. Dabei wird *ccdB* durch das zu untersuchende Gen ersetzt und das Expressionsplasmid mit *attB*-Stellen, sowie ein Nebenprodukt mit *ccdB*-Gen entstehen. Nach Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH10B können nur Zellen wachsen, welche kein *ccdB*-Gen enthalten. Das entstehende Nebenprodukt ist nicht dargestellt.

2.5. Hefe-Di-Hybrid-Analysen

Für direkte Interaktionsstudien wurde vorwiegend das “Hefe-interaction trap System” nach Gyuris *et al.* den Standardprotokollen (18, 135) folgend, verwendet (Abbildung 9A). Köder- (pEG202) und Beuteplasmide (pJG4-5) wurden in den Hefestamm EGY48,

welcher das β -Galaktosidase-Reporterplasmid pSH18-34 (18) enthält, kotransformiert. Im Genom dieses Stammes befindet sich mit *LEU2* ein zweites Reportergen (Abbildung 9C). Die Expression des Beutekonstrukt steht unter der Kontrolle eines Galaktose induzierbaren Promoters. Die Transformanten, welche auf selektivem Glukosemedium wuchsen, wurden auf Galaktosemedium mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X- β -Gal) übertragen, um die β -Galaktosidaseaktivität zu ermitteln. Um auf Leucinprototrophie zu testen, wurden die Hefen auf Galaktose haltiges Medium ohne Leucin übertragen. Hefen, die ohne Leucin wachsen können und X- β -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen, enthalten interagierende Köder-Beute-Komplexe. Dabei zeigt die Abhängigkeit von Galaktose, dass die Reportergene nur bei Anwesenheit des Beuteproteins angeschaltet wurden. Quantitative Analysen wurden nach Anzucht der Transformanten in Flüssigmedium durchgeführt. Dabei wurden je Konstrukt 3 bis 15 unabhängige Hefetransformanten über Nacht bei 30°C in selektivem Flüssigmedium mit Glukose angezogen. Die Übernachtkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und in induzierendem Galaktosemedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde unter Verwendung von o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranosid (ONPG) bestimmt (18).

Für die Sichtung der Tomaten-cDNA-Bank und direkte Protein-Interaktionsstudien wurde außerdem das MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-Di-Hybrid-System nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Abbildung 9B). Die Beuteplasmide (pGADT7-Rec2, in welchen die cDNA-Bank kloniert wurde; pGADT7att für direkte Interaktionsstudien) wurden in den Stamm Y187 transformiert. Nach Paarung mit dem Hefestamm AH109 wurden die diploiden Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert bzw. ausgestrichen, um auf Interaktion von Beute und Köder zu testen. Der Stamm AH109 enthält die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* und *lacZ* (Abbildung 9D). Y187 enthält ebenfalls das Reportergen *lacZ*. Bei Interaktion erfolgt die Aktivierung der Reportergene und die Hefezellen können ohne Adenin und Histidin wachsen und mit Hilfe der α -Galaktosidase (auch: Melibiase) das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-alpha-D-Galactopyranosid (X- α -Gal) und, katalysiert durch die β -Galaktosidase, das Substrat X- β -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. X- α -Gal wird dem Minimalmedium zugegeben, die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit Hilfe eines Übeschichtungsansatzes wie folgt bestimmt: Die Hefezellen wurden auf Minimalmedium ausgestrichen und bei 30°C für drei Tage inkubiert. Die Hefe wurde mit Chloroform betropft, um die Zellen aufzuschließen.

Nach Verdunstung des Chloroforms erfolgte die Überschichtung mit einer Agarose-X- α -Gal-Lösung (1 mg/ml X- α -Gal, 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7, 0,3% Agarose), die Blaufärbung wurde über sechs Stunden beobachtet.

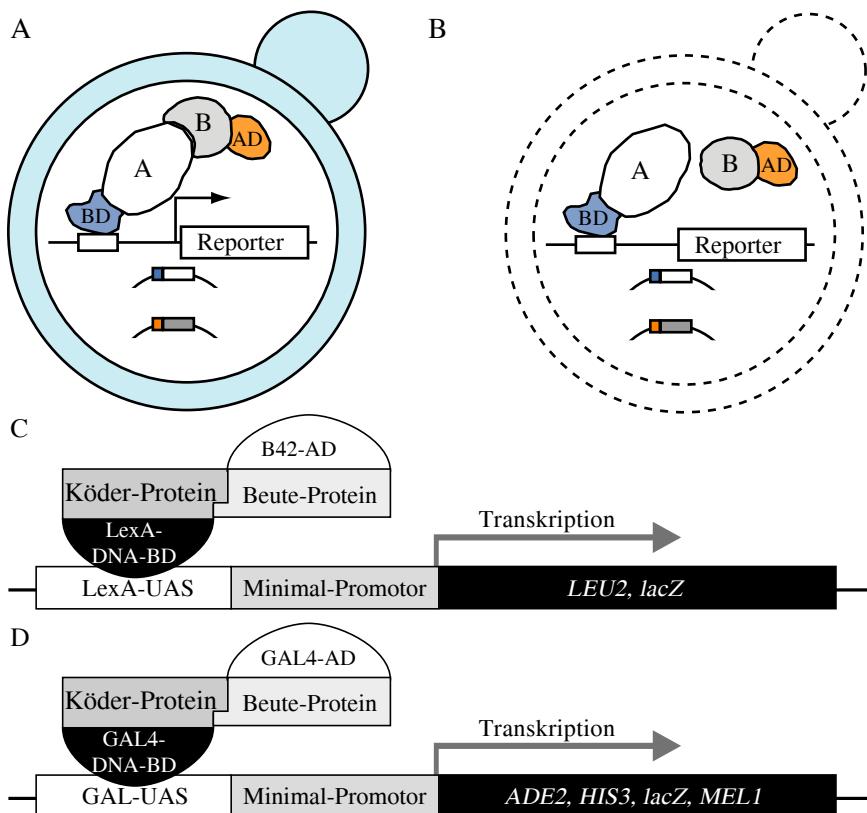


Abbildung 9: Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems und verwendete Reportergene

Dargestellt sind das generelle Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die verwendeten Fusionsdomänen und Reportergene des „interaction trap“-Systems (135) und des MATCHMAKER-GAL4-Systems (Clontech, Heidelberg, Deutschland). (A) Die zu untersuchenden Proteine werden als Fusionsproteine in Hefe synthetisiert. Das Köderprotein A ist an eine DNA-Binde-Domäne (BD) fusioniert, welche an spezifische Operatorsequenzen bindet. Das Beuteprotein B ist an eine Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Interagieren Köder- und Beuteprotein, gelangen BD und AD in räumliche Nähe, und die Reportergene (Reporter) werden exprimiert. (B) Interagieren die Proteine nicht, so wird die Transkription der Reportergene nicht aktiviert, die Hefen wachsen nicht und produzieren keinen blauen Farbstoff. (C) Für Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels „Interaction trap“-System dient als BD die LexA-BD und als AD die B42-Domäne („acid blob“; 289). Die verwendeten Reportergene sind *LEU2* und *lacZ*, die verwendeten Vektoren pEG202 (Ködervektor), pJG4-5 (Beutevektor), pSH18-34 (*lacZ*-Reporterplasmid) und der Hefestamm EGY48 (18, 96). (D) Für Interaktionsstudien mit dem MATCHMAKER-GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System liegen die Proteine an die GAL4-BD (Köder) bzw. die GAL4-AD (Beute) fusioniert vor. Als Reportergene dienen *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*. Es wurden die Vektoren pGADT7-Rec2 (cDNA-Bank-Vektor), pGADT7 (Beutevektor) und pGBT7 (Ködervektor) verwendet sowie die Hefestämme Y187 (69) und AH109 (159).

Erstellung der Plasmide für Expression von Genen in Hefe

Die verwendeten und neu erstellten Plasmide sind in Tabelle 3 im Anhang 1 aufgeführt. Die Konstruktion der für LexA-Hefe-Di-Hybrid-Studien verwendeten Plasmide wird im Folgenden erläutert. Für die Klonierung der ersten 150 bp von *avrBs3* in Hefevektoren wurde das *EcoRI/XhoI* Fragment von pBS*avrBs3*₁₋₁₅₀ (D. Büttner, unveröffentlichte Daten) in pEG202 und pJG4-5 (18), resultierend in pYB50 und pYP50, ligiert. pYBHpaB und pYPHpaB standen aus Vorarbeiten (L. Escolar, unveröffentlichte Daten) zur Verfügung. Die Plasmide pYB356, pYB310 und pYB312, welche die Gene für AvrBs3Δ2, AvrBs3Δ3 und AvrBs3Δ3Δrep-312 enthalten, standen bereits zur Verfügung (324). In dieser Arbeit wurden weitere Deletionsderivate von AvrBs3 erstellt, denen unterschiedliche Bereiche der „Repeat“-Region fehlen. Dazu wurde das Plasmid pBS356 verwendet, welches *avrBs3*Δ2 enthält. Für die Erstellung von pBS356ΔSphI wurde pBS356 mit *SphI* geschnitten und religiert. Verschiedene Deletionsderivate von AvrBs3 lagen in pUC19 vor: pUS300Δrep-16, pUS300Δrep-9, pUS300Δrep-109, pUS300Δrep-27, pUS300Δrep-29, pUS300Δrep-21, pUS300Δrep-121 (45, 145). Diese kodieren für AvrBs3-Derivate, welchen die „Repeats“ 11-14, 5-7, 13-15, 7-16, 2-11, 2-13 bzw. 2-16 fehlen. Von diesen Plasmiden wurden die *StuI/AgeI* Fragmente mit dem von pBS356 ausgetauscht, um pBS356Δrep-9, pBS356Δrep-109, pBS356Δrep-27, pBS356Δrep-29, pBS356Δrep-21 und pBS356Δrep-121 zu erhalten. Für die Konstruktion von pBS356ΔC wurde pBS356 mit *HincII* und *SacI* verdaut, glatte Enden erzeugt und religiert. Die gleichen Reaktionen wurden mit pBS310 durchgeführt, um pBS310ΔC zu erstellen. Anschließend wurden die *EcoRI/XhoI* Fragmente der erstellten *avrBs3* Konstrukte in die Hefevektoren pEG202 (18) kloniert. Dies resultierte in den Plasmiden pYB356ΔSphI, pYB356Δrep-16, pYB356Δrep-9, pYB356Δrep-109, pYB356Δrep-27, pYB356Δrep-29, pYB356Δrep-21, pYB356Δrep-121, pYB356ΔC und pYB310ΔC. Die Fragmente wurden außerdem in pJG4-5 kloniert, wodurch die Plasmide pYP356ΔSphI, pYP356Δrep-16, pYP356Δrep-9, pYP356Δrep-109, pYP356Δrep-27, pYP356Δrep-29, pYP356Δrep-21, pYP356Δrep-121, pYP356ΔC und pYP310ΔC entstanden. Um pYB356N und pYP356N für die Expression der N-terminalen 143 Aminosäuren von AvrBs3Δ2 in Hefe zu erstellen, wurde pBS356 mit *MscI/HincII* geschnitten und religiert. Dies resultierte im Plasmid pBS356N, von welchem das *EcoRI/XhoI*-Fragment in pEG202 und pJG4-5 (18) kloniert wurden. Für pYBC, wurden

die 3' gelegenen 867 bp mit den Oligonukleotiden 5'-GGAATTCAAGCAATGGCGGCG GCAG-3' und 5'-GCCTCGAGTCACTGAGGCAATA GC-3' mittels PCR amplifiziert, wobei eine *EcoRI*- sowie eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde zunächst in pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Das *EcoRI/XhoI*-Fragment des resultierenden Plasmides pTopoC wurde in die Hefeektoren pEG202 und pJG4-5 (18) kloniert.

Für die Klonierung von *Caimpα1* und *LeThiC* in die Vektoren des „interaction trap“-Systems wurden die Eingangsplasmide pENTRCaimpα1stop bzw. pENTRLeThiCstop für LR-Rekombinationsreaktionen mit dem Zielvektor pJCL (C. Lorenz und J. Boch, unveröffentlichte Daten) verwendet. Die Expressionsplasmide pJCLCaimpα1stop und pJCLLeThiCstop wurden in Hefe transformiert.

Für die Hefe-Di-Hybrid-Arbeiten mit dem MATCHMAKER-GAL4-System (Clontech, Heidelberg, Deutschland) wurden die Vektoren pGBKT7, pGADT7, pGADT7-Rec2 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) sowie pGBKT7att und pGADatt (A. Meyer, unveröffentlichte Daten) verwendet. Für die Generierung der Köderplasmide wurden die entsprechenden Fragmente durch Restriktion mit *EcoRI/XhoI* aus den bereits erstellten Köderplasmiden des „interaction trap“-Systems (siehe oben) erhalten und in den mittels *EcoRI/SalI* verdaulten Vektor pGBKT7 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) ligiert.

avrBs3-LZ wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'AGCAATGGCGGCCAGGCC3' and 5'GCAGCGTCCAGCACCGTGATGC3' mittels PCR amplifiziert, wodurch eine *EcoRI*- und eine *XhoI*-Schnittstelle angehängt wurden. Das PCR-Fragment wurde mittels *EcoRI* und *XhoI* geschnitten und in pGBKT7 und pGADT7 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) kloniert, um pGBKT7avrBs3-LZ und pGADT7avrBs3-LZ zu erhalten.

Für die Generierung von pGADattLeThiCstop wurde eine GATEWAY-Rekombinationsreaktion mit pGADatt und pENTRLeThiCstop durchgeführt (siehe oben).

Erstellung und Sichtung der Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate

Die verwendete Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Simona Masiero und Dr. Hans Sommer am MPIZ Köln hergestellt. Gesamt-RNA wurde aus nicht infizierten Laubblättern 6 Wochen alter Tomaten (*Lycopersicon esculentum* cv. MM)-Pflanzen isoliert. Für die Generierung der cDNA-Bank wurde das GAL4-Hefe-Di-Hybrid-„MATCHMAKER Library Construction&Screening Kit“

(Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte sowohl mittels oligodT-Oligonukleotiden als auch mit zufällig generierten Oligonukleotiden. Die cDNA-Populationen wurden separat gehalten. cDNA-Fragmente mit einer Größe von 0,5-2,0 kb wurden ausgewählt. Beide cDNA-Populationen wurden durch subtraktive Hybridisierung normalisiert und in pGADT7-Rec2, den Angaben des Herstellers folgend (Clontech, Heidelberg, Deutschland), rekombiniert. Die Rekombination und Generierung erfolgen dabei im Hefestamm AH109. Der Stamm wurde nachfolgend in Reaktionsgefäß mit einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml abgefüllt und bei -80°C gelagert. Die Sichtung der cDNA-Bank erfolgte mittels Hefe-Paarung wie im Protokoll des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) beschrieben.

2.6. Interaktionsstudien *in vitro*

Für Interaktionsstudien *in vitro* wurde die Methode des GST-„pull-down“ verwendet (Abbildung 10). AvrBs3, AvrBs3₁₋₅₀ und LeThiC wurden als Glutathion-S-Transferase-(GST) Fusion in *E. coli* BL21 synthetisiert. AvrBs3Δ2FLAG und HpaB-c-Myc wurden ebenfalls in *E. coli* BL21 synthetisiert. Die Genexpression erfolgte unter der Kontrolle des lac-Promoters. Die entsprechenden Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37°C angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 mit IPTG versetzt (Endkonzentration 1mM). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem PBS-Puffer (1/10 vol) resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. 150 µl des bakteriellen Proteinextraktes, welcher GST, GST-AvrBs3, GST-AvrBs3₁₋₅₀ oder GST-LeThiC enthielt, wurde mit 2 ml des AvrBs3Δ2-FLAG bzw. HpaB-c-Myc enthaltenden Extrakt gemischt und mit 50 µl Glutathionsepharose versetzt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Sepharosekugelchen 5x mit je 5 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution spezifisch gebundener Proteine wurde den Angaben des Herstellers entsprechend bei RT mit 50 µl 10 mM reduziertem Glutathion durchgeführt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

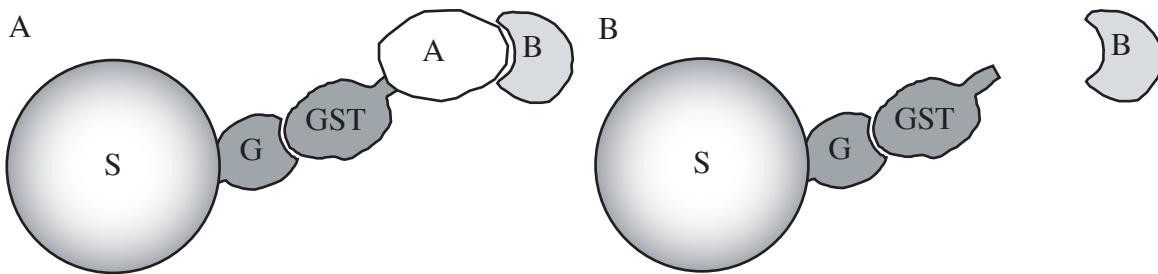


Abbildung 10: Prinzip des GST-„pull-down“-Ansatzes.

Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip eines GST-„pull-down“-Ansatzes, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu untersuchen. Das zu untersuchende Protein A wird als Fusion an die Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* synthetisiert. Die GST bindet an Glutathion (G), welches an Sepharose (S) gebunden ist. Die Elution des Komplexes erfolgt mittels reduziertem Glutathion, zu welchem die GST eine höhere Affinität aufweist als zu Glutathion. (A) Interagiert ein Protein B mit Protein A, so wird der gesamte Komplex an der Glutathionsepharose gebunden und aufgereinigt. (B) In einem Kontrollansatz wird das Protein B nur mit der GST inkubiert, wobei keine Interaktion erfolgen sollte.

Erstellung von Plasmiden zur Genexpression in *E. coli*

Das Plasmid pGEX300, für welches das *Eco*RI/*Xho*I Fragment von pBS300 in pGEX-2TKM (58) ligiert wurde, stand zu Beginn der Arbeit für die Synthese von GST-AvrBs3 zur Verfügung (B. Szurek, unveröffentlichte Daten). Das *Eco*RI/*Xho*I-Fragment von pBSavrBs3₁₋₅₀ (D. Büttner, unveröffentlichte Daten) wurde in pGEX-2TKM kloniert. Die Plasmide pDS356F (324) und pDMhpaB (56) standen zur Expression von AvrBs3Δ2-FLAG bzw. HpaB-c-Myc zur Verfügung. Für die Synthese von GST-LeThiC in *E. coli* wurde pDEST15LeThiCstop mittels GATEWAY-Rekombination mit pENTRLeThiCstop (siehe oben) und pDEST15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) generiert.

2.7. Interaktionsstudien *in planta*

2.7.1. Kolokalisierungsstudien

Kolokalisierungsstudien wurden mittels transienter Expression von Genen in Zwiebelepidermiszellen und in *N. benthamiana* durchgeführt. Für die transiente Expression von Genen in Zwiebelepidermiszellen wurden diese unter Verwendung des BioRad Biolistic PDS-1000/He Systems, wie bei Van den Ackerveken *et al.* beschrieben, mit 1 µm Goldkügelchen beschossen, welche zuvor mit DNA beladen wurden (336). Um

die β -Glucuronidaseaktivität zu messen, wurden die Zwiebelzellen mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure-Zyclohexylammoniumsalz (X-Gluc) gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch Behandlung der Zellen mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Die transformierten Zellen wurden mittels Zeiss Axioskop Mikroskop mit Sony 3CCD COLOR VIDEO Kamera (Sony, Deutschland) untersucht. Für die Kolokalisierungsstudien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte die transiente Expression der zu untersuchenden Gene in *N. benthamiana*, vermittelt durch *Agrobacterium*. Zwei Tage nach Infiltration (siehe oben) wurden die mit *Agrobacterium* infizierten *N. benthamiana*- Blätter mit DAPI infiltriert, geerntet und mittels konfokalem Zeiss Laser Fluoreszenz Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der entsprechenden Filtereinstellungen für EGFP, ECFP, EYFP und DAPI untersucht.

2.7.2. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Interaktionsstudien mittels BiFC wurden unter Verwendung des gelb fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*; YFP; 236) durchgeführt, welches in eine C-terminale und eine N-terminale Domäne geteilt wurde (YFP_C: Aminosäuren 155-239; YFP_N: Aminosäuren 1-154; 22, 149). Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 11 dargestellt. BiFC-Experimente erfolgten nach transienter Expression der entsprechenden Gene mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* wie von Walter und Kollegen beschrieben (349). Für die Fluoreszenzdetektion wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit spezifischen Filtern für YFP verwendet.

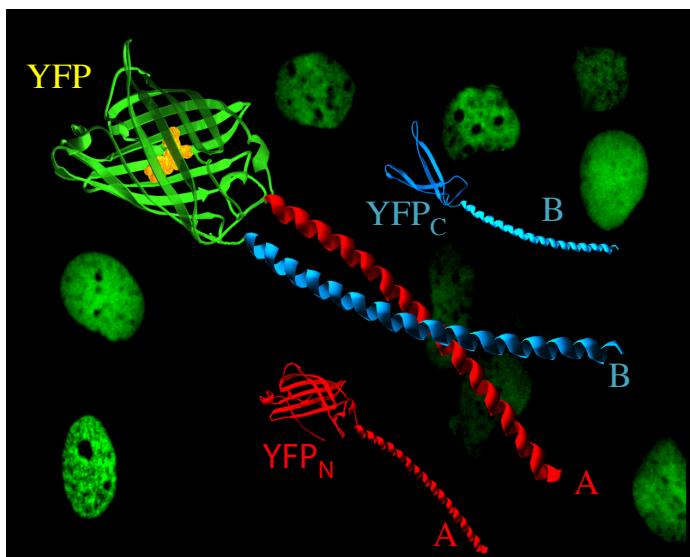


Abbildung 11: Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).

Die Abbildung zeigt das Prinzip der BiFC. Die N-terminalen Aminosäuren 1-155 des gelb fluoreszierenden Proteins YFP (YFP_N) werden an das zu untersuchende Protein A (rot) fusioniert, die C-terminalen Aminosäuren 156-239 (YFP_C) an Protein B (blau). Interagieren beide Proteine miteinander, so gelangen die YFP-Hälften in räumliche Nähe und assemblieren irreversibel zu einem funktionsfähigen YFP-Molekül, welches gelb fluoresziert. Die Abbildung wurde nach http://sitemaker.umich.edu/kerppola.lab/kerppola_lab_bifc modifiziert.

2.7.3. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

FRET-Analysen erfolgten unter Verwendung der gelben (*yellow*) und *cyan*-farbenen Spektralvarianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) YFP und CFP, welche an die Interaktionspartner fusioniert wurden, mittels „acceptor photobleaching“, wie von Karpova und Kollegen beschrieben (174). Die analysierten Fusionsproteine wurden transient in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium* synthetisiert. In Abbildung 12 ist das Prinzip des FRET schematisch dargestellt. CFP wird mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt. Im Fall einer Interaktion der CFP- und YFP-Fusionsproteine befinden sich CFP und YFP-Moleküle in räumlicher Nähe, so dass die CFP-Emissions-Strahlung auf das YFP-Molekül (Akzeptor) trifft und dieses anregt. Die resultierende Emissions-Strahlung wird als YFP-Fluoreszenz detektiert. Wird das Akzeptor-Molekül über einen längeren Zeitraum mit 514 nm angeregt, so erfolgt ein Ausbleichen des YFP („acceptor photobleaching“). Die CFP-Emissions-Strahlung kann nicht auf YFP übertragen werden und wird als verstärkte CFP-Fluoreszenz detektiert. Die Analysen erfolgten unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopes LSM510 Meta von Zeiss (Jena, Deutschland) mit Unterstützung von Dr. Bettina Hause (IPB, Halle).

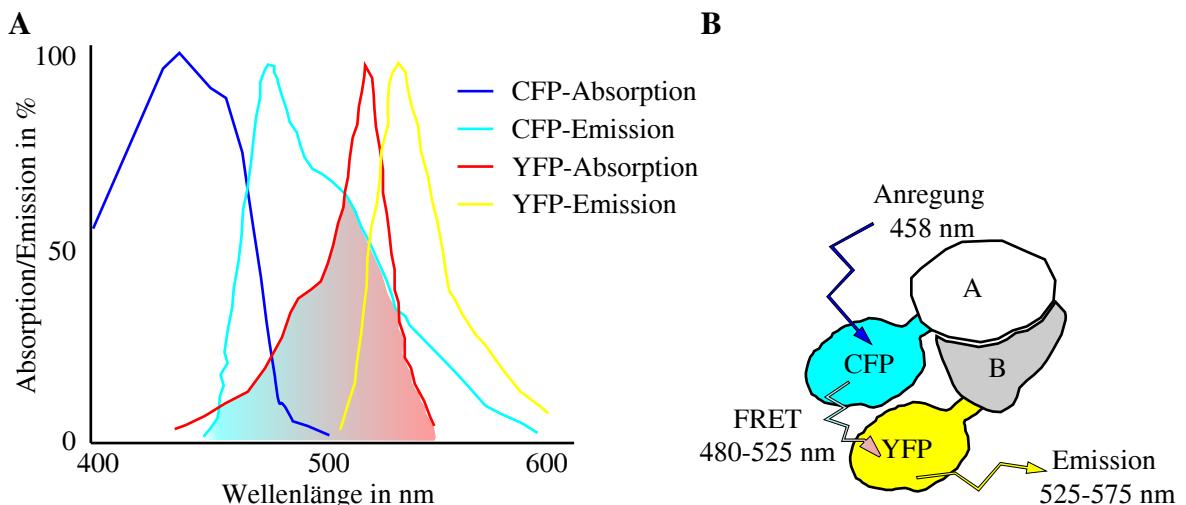


Abbildung 12: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).

Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP (modifiziert nach www.zeiss.de) sowie das Prinzip des FRET (modifiziert nach meds.queensu.ca/qcri/greer/ri_pag.htm). **(A)** Die Anregungswellenlänge (Absorption) für CFP beträgt 458 nm. Die CFP-Emissions-Strahlung (480-525 nm) überlappt mit der Absorptionswellenlänge von YFP. **(B)** Befinden sich CFP und YFP in räumlicher Nähe, so wird die abgegebene Emissions-Strahlung des CFP-Moleküls direkt von dem YFP-Molekül absorbiert (FRET). Für die Methode des FRET wird CFP an ein zu untersuchendes Protein A und YFP an ein zu untersuchendes Protein B fusioniert. Interagieren beide Proteine, so gelangen CFP und YFP in räumliche Nähe und bei Anregung des CFP mit 458 nm wird die YFP-Emission (525-575 nm) detektiert.

2.7.4. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation (KoIP)

For KoIP-Experimente wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine transient in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium* exprimiert. 48 Stunden nach Infiltration wurden 2 Blattscheiben mittels Korkbohrer ($d = 9$ mm) geerntet und in „Safe-lock“-Reaktionsgefäß (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der vollständigen Zerkleinerung des Blattmaterials wurde 1 ml KoIP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 μ l Protease-Inhibitor-Mischung (25 x konzentriert; complete, EDTA-free; Roche, Mannheim, Deutschland)) sowie 1 Spatelspitze Polyvinylpolypyrolidon zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen und 15 minütiger Zentrifugation wurde der Extrakt-Überstand mit 2,1 μ l 15%igem Nonidet-P40 versetzt, zu 25 μ l Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben und für 30 min bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Der vorgeklärte Extrakt wurde anschließend mit 25 μ l Sepharose gemischt, an welche Anti-FLAG-Antikörper kovalent gebunden waren (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und über Nacht bei 4°C über Kopf rotierend

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4°C kaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 1 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

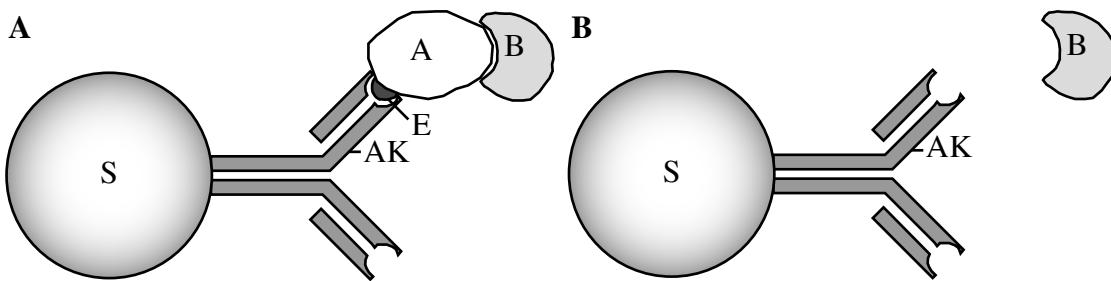


Abbildung 13: Prinzip der Koimmunopräzipitation (KoIP).

Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip der KoIP. Antikörper (AK) werden an Protein A oder Protein G-Sepharose (S) gebunden. Der Antikörper bindet an das entsprechende Epitop (E), welches an ein zu untersuchendes Protein (A) fusioniert ist und bewirkt dessen Immunopräzipitation. (A) Interagieren Protein B und A, so bindet der Proteinkomplex an die Sepharose-Matrix. Protein B wird mit Protein A koimmunopräzipitiert. (B) Fehlt das Protein A, welches an das Epitop fusioniert ist, so sollte Protein B nicht durch den Antikörper präzipitiert werden (Negativkontrolle).

Erstellung von Plasmiden zur Expression von Genen in Pflanzen

Zur Erstellung von pBI356ΔSphI für Kolokalisierungsstudien wurde das *EcoRI/XhoI* Fragment von pBS356ΔSphI in pBI1.4t (232) ligiert.

Die oben beschriebenen Eingangssplasmide wurden für GATEWAY-basierende Rekombinationsreaktionen verwendet. Dabei wurde *avrBs3Δ2* in die Vektoren pK7FWG2 (173), pK7CWG, pK7WGC, pK7YWG, pK7WGY (173), pGWB14 (Tsuyoshi Nakagawa) und pGWB735.1 (35S::HA-YFP_C-GW; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), welcher durch Einfügen von 35S::HA-YFP_C-GW mittels *HindIII/SacI* in pGWB1 (kein Promotor, kein Epitop, attR1-CmR-ccdB-attR2; Tsuyoshi Nakagawa) erstellt wurde, rekombiniert. Die resultierenden Plasmide, welche die Expression von *avrBs3Δ2-GFP*, *avrBs3Δ2-CFP*, *CFP-avrBs3Δ2*, *avrBs3Δ2-YFP*, *YFP-avrBs3Δ2*, *avrBsΔ2-HA* und *YFPc-avrBs3Δ2* ermöglichen, sind in Tabelle 3 (Anhang 1) aufgeführt. pENTRT356ΔNLS wurde zur GATEWAY-Rekombination von *avrBs3Δ2ΔNLS* in pK7FWG2, pGWB14 und pGWB735.1 zur Expression von *avrBs3Δ2ΔNLS-GFP*, *avrBs3Δ2ΔNLS-HA* und *YFPc-avrBs3Δ2ΔNLS* verwendet.

pENTRavrBs3Δ2ΔSphI wurde mittels GATEWAY-Technologie mit pK7FWG2 rekombiniert. Das erhaltene Plasmid pK7FWG2avrBs3Δ2ΔSphI ermöglichte die Expression von *avrBs3Δ2ΔSphI-GFP*.

Mit pENTRCaimp α 1 erfolgten Rekombinationsreaktionen in die Vektoren pK7YWG, pGWB735.1 und pSPYNE-35S-GW (35S-*attR*-c-myc-YFP_N; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), welcher durch Einführen der GATEWAY-*attR*-Kassette mittels *Xba*I/*Xho*I aus pUC-SPYNE (349) in pSPYNE-35S (349) erhalten wurde. Die erhaltenen Plasmide erlaubten die Expression von *Caimp α 1-YFP*, *Caimp α 1-FLAG* und *Caimp α 1-YFP_N*. Rekombinationsreaktionen mit pENTRLLeThiC bzw. pENTRLLeThiCstop und den Vektoren pK7CWG, pK7WGC, pK7YWG, pK7WGY (173), pGWB735.1, pSPYNE-35S-GW, pSPYCE-35S-GW (35S-*attR*-c-myc-YFP_N; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten); welcher durch Einführen der GATEWAY-*attR*-Kassette mittels *Xba*I/*Xho*I aus pUC-SPYCE (349) in pSPYCE-35S (349) erhalten wurde; pGWB2, pGWB9, pGWB11, pGWB12, pGWB14, pGWB15, pGWB20, pGWB21 und pGWB24 ermöglichen die Expression von *LeThiC-CFP*, *CFP-LeThiC*, *LeThiC-YFP*, *YFP-LeThiC*, *YFP_C-LeThiC*, *LeThiC-YFP_N*, *LeThiC*, *6xHIS-LeThiC*, *LeThiC-FLAG*, *FLAG-LeThiC*, *LeThiC-3xHA*, *3xHA-LeThiC*, *LeThiC-10xc-myc*, *10xc-myc-LeThiC* und *GST-LeThiC* in der Pflanze.

2.8. Virus induziertes Gen-„Silencing“ (VIGS)

VIGS wurde als schnelle, alternative Methode für die Stilllegung pflanzlicher Genexpression ohne Generierung transgener Pflanzen wie bei Liu *et al.*, 2002 beschrieben verwendet. Dafür wurden rekombinante TR- (*tobacco rattle*) Viren (V), welche Teile des zu untersuchenden pflanzlichen Gens enthielten, verwendet. Die pflanzlichen, endogenen Gentranskripte, welche Homologie zur Sequenz des eingefügten Genfragmentes im Virusgenom aufweisen, werden durch posttranskriptionelles Gen-„Silencing“ (PTGS; 26) reduziert. Die Fragmente des zu untersuchenden pflanzlichen Gens wurden dafür in den Virus-Vektor TRV2a (pYL279a; P. Römer und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), die GATEWAY-Technologie nutzend, eingefügt. Der TRV2a-Vektor wurde durch Einfügen des Gens für die Ampicillin-Resistenz in den Vektor pYL279 (pTRV2-*attR2-attR1*; 208) generiert. In dem TRV2-Vektor befindet sich außerdem das Gen für das virale Hüllprotein. Auf einem zweiten Plasmid (pTRV1) befinden sich unter der Kontrolle zweier 35S-

Promotoren aus dem Blumenkohlmosaik-Virus die Gene für die RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ein Movement-Protein (MP), ein 16 kDa großes Cystein reiches Protein (16K) und ein selbstschneidendes Ribozym (Rz). Die Plasmide TRV1 und TRV2 wurden jeweils in *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert. Beide Stämme wurden vor Infiltration gemischt. Nach transienter Expression der Plasmid kodierten Gene assemblieren die Viren und verbreiten sich systemisch in der wachsenden Pflanze.

Erstellung von Plasmiden für Virus induziertes Gen-„Silencing“ in Pflanzen

Das Plasmid TRV2LeThiC_{VIGS} zum Silencing von *LeThiC* und dessen Homologen in Pflanzen wurde wie folgt erstellt: Unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-CACCGGGAAACAATAATCCACAAAGT-3' und 5'-TCTCACGAGCAGCACAGTACACC-3' wurde ein 520 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *LeThiC* mittels PCR amplifiziert und in pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die GATEWAY-Technologie nutzend, kloniert. Eine GATEWAY-LR-Rekombinationsreaktion mit dem Vektor pTRV2a resultierte in dem Plasmid TRV2LeThiC_{VIGS}, welches in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert wurde.

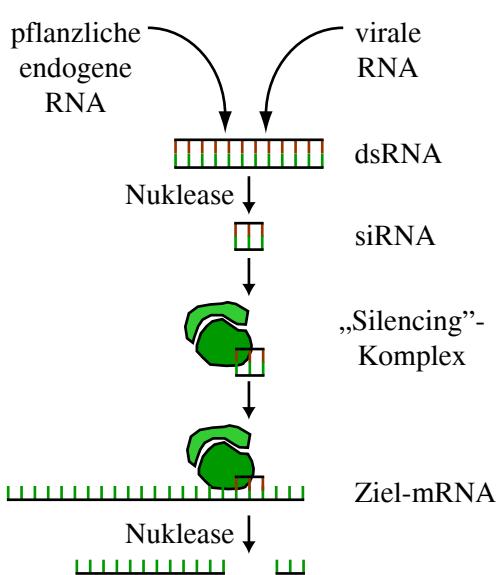


Abbildung 14 : Prinzip des Virus induzierten Gen-„Silencing“ (VIGS).

Das Virus induzierte Gen-„Silencing“ beruht auf natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen den Befall durch Viren. Wird in das Virus-Genom ein Fragment eines pflanzlichen Gens integriert, so paaren sich die entstehenden „viralen“ RNA-Moleküle mit den bereits vorhandenen endogenen pflanzlichen komplementären RNA-Molekülen. Die resultierenden doppelsträngigen RNA-Moleküle (dsRNA) werden durch Nuklease in kurze „Silencing“-RNA-Moleküle (20-25bp, siRNA) abgebaut. Durch Bindung spezifischer Proteine (grün) entsteht ein „Silencing“-Komplex, welcher an neue endogene mRNA-Moleküle (Ziel-mRNA) bindet. Die Bindung des Komplexes bewirkt den Abbau der mRNA zu kleinen Fragmente, die wiederum als siRNA dienen. Die endogenen mRNA-Moleküle sind somit nicht stabil und fehlen für den Translationsprozess.

2.9. Bestimmung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen

Der Austritt von Ionen aus Pflanzenzellen wurde wie folgt ermittelt: 1 und 4 Tage nach Infiltration von *Agrobacterium* wurden zwei Blattscheiben ($d = 9$ mm) je Infiltrationsstelle geerntet und für 15 Stunden in 6 ml destilliertem Wasser in 15 ml Plastikrörchen (Greiner BIO-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) Kopf-über-Kopf rotierend inkubiert. Die Leitfähigkeit wurde mit Hilfe des Konduktometers 703 (Knick, Berlin, Deutschland) gemessen. Die Proben wurden anschließend für 5 min auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf 22 °C wurde die Gesamtleitfähigkeit bestimmt. Die relative Leitfähigkeit, welche den Ionenaustritt aus der Pflanzenzelle in das Wasser reflektiert, wurde wie folgt berechnet: Leitfähigkeit/Gesamtleitfähigkeit x 100%.

2.10. Licht- und Elektronenmikroskopie

N. benthamiana wurde mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(pVuidA), GV3101(pVSavrBs4), GV3101(pVSavrBs3) und GV3101(pVSavrBs1) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 infiltriert. Das Blattmaterial wurde 4 Tage nach Infektion geerntet. Die Blattteile (2 x 5 mm) wurden 2 Stunden mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer (NCP; pH 7,2) bei Raumtemperatur fixiert, gewaschen, nachfixiert mit 1% Osmium-tetroxid in NCP und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Zur Anfertigung von Dünnschnitten wurde das fixierte und entwässerte Gewebe mit Epoxidharz nach Spurr (1969) über 3 Tage infiltriert (314). Nach Polymerisierung des Harzes bei 70°C für 24 h wurden Schnitte mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut-R, LEICA, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Semidünnschnitte (1 µm) wurden mit Toluidinblau (1% in 1% Na₂B₄O₇) gefärbt und mit einem Axioskop 20 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) analysiert. Ultradünnschnitte (80 nm) wurden auf Ceducol-beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen, mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die Aufnahmen wurden mit einer Slow-Scan-Kamera (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS, Dünzelbach, Deutschland) angefertigt. Für morphometrische Messungen wurde Aufnahmen von Mesophyllzellen mit Zellkernen mit Nukleoli verwendet, um die Analyse peripherer Dünnschnitte zu vermeiden. Die Messungen erfolgten mit Hilfe der analySIS

Software (SIS, Münster, Deutschland). Die mikroskopischen Analysen wurden von Simone Jahn und Dr. Gerd Hause durchgeführt.

2.11. Physiologische Vitamin B1-Komplementations-Analysen

Für physiologische Komplementationsanalysen mit Vitamin B1 wurden *N. benthamiana*-Pflanzen nach Infektion mit TRV für VIGS jeden zweiten Tag mit 50 ml einer 10 mM Thiaminlösung (pH 6,0) gegossen. Dafür wurde Thiamin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 25 mM Natrium-Phosphat (NaP)-Puffer gelöst. Kontrollpflanzen wurden mit 50 ml NaP-Puffer (pH 6,0) behandelt.

2.12. Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Pflanzen

Die Bestimmung des Vitamin B1 (Thiamin)-Gehaltes in Pflanzen erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) leicht modifiziert nach Pinto *et al.*, 2002 (270) in Kooperation mit Dr. Robert Kramell (IPB, Halle).

Standard-Lösungen von 10 mM Thiamin (TF; AppliChem), 10 mM Thiaminmonophosphat (TMP; AppliChem) und 10 mM Thiamindiphosphat (TDP; AppliChem) wurden in 0,1 M HCl hergestellt und bei -20°C aufbewahrt.

2.12.1. Extraktion der Thiamin-Verbindungen

Blattmaterial wurde mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in 2 ml „Safe lock tubes“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einer Kugelmühle (MM300, Retsch, Deutschland) zerkleinert und mit 0,1 M HCl versetzt (20 µl 0,1 M HCl je zwei Blattscheiben, d = 9 mm). Nach Inkubation im Thermomixer compact (Eppendorf, Deutschland) bei 4°C über Nacht wurden die Extraktionsansätze zentrifugiert und die Überstände mit Chloroform (20 µl/2 Blattscheiben) zum Entfernen von Proteinen ausgeschüttelt. Zur HPLC-Analyse mittels Fluoreszenz-Detektor wurden sowohl die Thiamin-Standard-Lösungen als auch die Extrakte mit Kaliumhexacyanoferrat (II) in Thiochromverbindungen überführt. Dafür wurden zu 60 µl eines Protein-freien

Pflanzenextraktes 5 µl einer frisch hergestellten 30 mM Lösung $K_3[Fe(CN)_6]$ gegeben und anschließend mit 300 µl 1 M NaOH sowie 550 µl MeOH versetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit Hilfe eines Vortex Genie 2 (Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) intensiv durchmischt und für 10 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden auf eine HPLC-Säule gegeben.

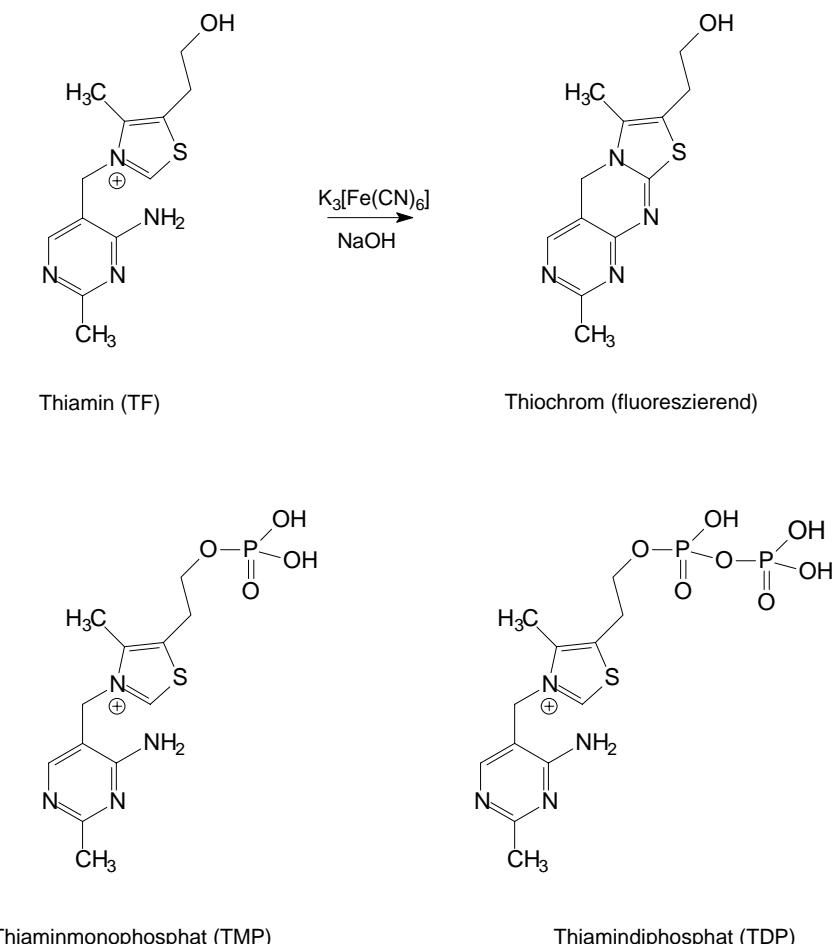


Abbildung 15: Strukturformeln von Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat.

Für Thiamin (TF) ist die Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (II) zum fluoreszierenden Thiochrom (2,7-Dimethyl-5H-thiachromine-8-ethanol) gezeigt.

2.12.2. HPLC-Bedingungen

Die HPLC-Analysen erfolgten unter Verwendung einer Agilent 1100-Anlage mit integrierter Software (Agilent Technologie, Waldbronn, Deutschland), gekoppelt mit einem Fluoreszenz-Detektor (Agilent 1100). Es wurde eine Anregungswellenlänge von 375 nm verwendet und die Emission bei 450 nm detektiert. Für die HPLC wurde eine

Säule des Typs LiChrospher 100 NH₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm sowie einer Partikelgröße von 10 µm verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die mobile Phase setzte sich aus dem Solvens A (0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) und dem Solvens B (MeOH) zusammen. Die HPLC wurde mit einem Gradienten wie folgt durchgeführt: In 5 min wurde von 30% (v/v) Solvens B auf 50% Solvens B erhöht, in weiteren 5 min wurde auf 60% Solvens B erhöht und für 10 min bei 60% Solvens B gehalten. Anschließend wurde die Säule bei 30% Solvens B für 8 min wieder äquilibriert.

2.13. Statistische Auswertungen

Für statistische Auswertungen wurden statistische Tests in Kooperation mit Ingrid Haufe am Rechenzentrum der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit der SPSS12-Software (Achim Bühl, Peter Zöfel, Pearson Sudium) mittels parametrischen und nicht-parametrischen Testverfahren. Unterschiede von $P \leq 0,05$ werden als signifikant gewertet. Alle Mittelwerte sind mit Standardabweichung angegeben. Die detaillierten Ergebnisse der Tests sind im Anhang aufgeführt.

2.14. Silberfärbung, Native Gel-Elektrophorese und Westernblot

Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE unter Verwendung 8-12%iger Gele aufgetrennt (196). Silberfärbung erfolgte nach Blum und Gross (39).

Für Blue-native-PAGE (BN-PAGE) von AvrBs3 wurde das *EcoRI/XhoI*-Fragment von pBS356 (siehe oben) in pGEX6p1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) kloniert, welcher einen *lac*-Promoter enthält. Die resultierende *GST-avrBs3Δ2*-Fusion wurde nach Induktion mittels IPTG in *E. coli* BL21 exprimiert. 500 ml Bakterienkultur wurden 1.5 Stunden nach Induktion pelletiert, in 10 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der aufgeschlossenen Zellen über eine GTrapTM F-Säule gegeben (Amersham Pharmacia Biotech). Die Affinitäts-aufreinigung und Elution mittels PreScission-Protease (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte wie im mitgelieferten Protokoll beschrieben. Die BN-PAGE wurde mit 100 µg des gereinigten AvrBs3Δ2 Proteins nach Schägger und von Jagow durchgeführt (293). Nach Entfärbung des Gels erfolgte der Transfer der Proteine auf eine

Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell BioScience GmbH, Dassel, Deutschland), welche mit einem AvrBs3-spezifischen Antikörper inkubiert wurde.

In einem weiteren Ansatz wurden 5 µg des affinitätsgereinigten AvrBs3Δ2 Proteins in 5 x Proteinpuffer nach Lämmli aufgenommen, welcher kein Mercaptoethanol, aber 1,4-Dithiothreitol (DTT) enthielt. Ein Teil der Proben wurde mit Puffer ohne DTT versetzt. Die Hälfte der Proteinproben wurde auf 95°C erhitzt. Alle Proteinproben wurden auf ein 8%iges SDS-Gel geladen und nach Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Für Westernblotanalysen wurden Proteine auf 8-12%igen SDS-Gelen mittels SDS-PAGE (196) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit monoklonalem Anti-LexA-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper (Maus; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland), polyklonalem Anti-GST-Antikörper (Ziege; Amersham Pharmacia Biotech), polyklonalem Anti-GFP-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonalem Anti-HA-Antikörper (Ratte; Santa Cruz), monoklonalem Anti-c-Myc-Antikörper (Maus; Roche) oder polyklonalem Anti-AvrBs3-Antikörper (Kaninchen; (187) inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden sekundären Antikörpers erfolgte die Detektion der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

2.15. 5'- und 3'- RACE (“rapid amplification of cDNA ends”)

Die RNA für 5'- und 3'-RACE wurde aus *L. esculentum* cv. MM mit Hilfe des Qiagen RNeasy Plant Mini Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen GmbH, Hilden). 5'-und 3'-RACE erfolgten mittels BD SMART™ RACE cDNA Amplifikationskit nach Angaben des Herstellerprotokolls (Clontech, Heidelberg, Deutschland).

3. Ergebnisse

3.1. Sekretion aus dem Bakterium: Wie wird die Sekretion von AvrBs3 gesteuert?

3.1.1. Das Typ-III-Chaperon HpaB interagiert mit dem N-Terminus von AvrBs3

3.1.1.1. Einführung und Vorarbeiten

Vorarbeiten zeigten, dass das 122 kDa große Effektorprotein AvrBs3 T3SS abhängig von *Xcv* sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert wird (288, 325). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. D. Büttner sollte analysiert werden, welche Bereiche von AvrBs3 die Sekretion durch das T3SS regulieren. T3-Effektoren enthalten kein konserviertes Sekretionssignal. Wie für andere Effektoren gezeigt wurde, sind N-terminale Proteinbereiche auch für die Sekretion von AvrBs3 notwendig (325). In weiteren Vorarbeiten wurden Domänen-Austausch-Experimente mit den N-Termini von HrpF, dem Translokonprotein, und AvrBs3 durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein AvrBs3₁₋₅₀-HrpFΔN von *Xcv* sekretiert wird (56). Die N-terminalen 50 Aminosäuren von AvrBs3 vermitteln somit die Sekretion von HrpFΔN, welches normalerweise nicht sekretiert wird. Weitere Vorarbeiten ergaben, dass die Sekretion von AvrBs3 durch das Protein HpaB, welches typische Eigenschaften eines T3-Chaperons aufweist, beeinflusst wird. Interaktionsstudien *in vitro* zeigten, dass HpaB mit AvrBs3 interagiert (56).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die HpaB-Bindestelle in den N-terminalen 50 Aminosäuren von AvrBs3 lokalisiert ist.

3.1.1.2. Untersuchung der HpaB-AvrBs3₁₋₅₀-Interaktion *in vitro*

Die Interaktion zwischen HpaB und dem N-Terminus von AvrBs3 wurde mittels GST-„pull-down“-Experiment *in vitro* untersucht. Dazu wurde GST sowie die Fusionsproteine GST-AvrBs3₁₋₅₀ und GST-AvrBs3Δ2, in welchem die N-terminalen Aminosäuren 2-152 fehlen, in *E. coli* synthetisiert. *avrBs3*₁₋₅₀ und *avrBs3*Δ2 wurden dafür in Derivate von pGEX2TK (pGEXTKM bzw. pGEX6p1) kloniert. *hpaB-c-myc* wurde unter Kontrolle

eines IPTG-induzierbaren Promotors in *E. coli* exprimiert. Dafür lag das Plasmid pDMhpaB bereits vor (L. Noël, 56). GST, GST-AvrBs₃₁₋₅₀ und GST-AvrBs_{3Δ2} wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit Zelllysaten des *hpaB-c-myc* exprimierenden *E. coli*-Stammes inkubiert. Gebundene Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von reduziertem Glutathion eluiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Wie in Abbildung 16 gezeigt, wurde HpaB-c-Myc in denselben Eluaten wie GST-AvrBs₃₁₋₅₀ detektiert, nicht jedoch in Eluaten, welche GST oder GST-AvrBs_{3Δ2} enthielten. Die Resultate zeigen, dass HpaB-c-Myc spezifisch mit GST-AvrBs₃₁₋₅₀ interagiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die N-terminalen 50 Aminosäuren von AvrBs3, welche für die Sekretion notwendig sind, auch die Bindestelle für HpaB bereitstellen.

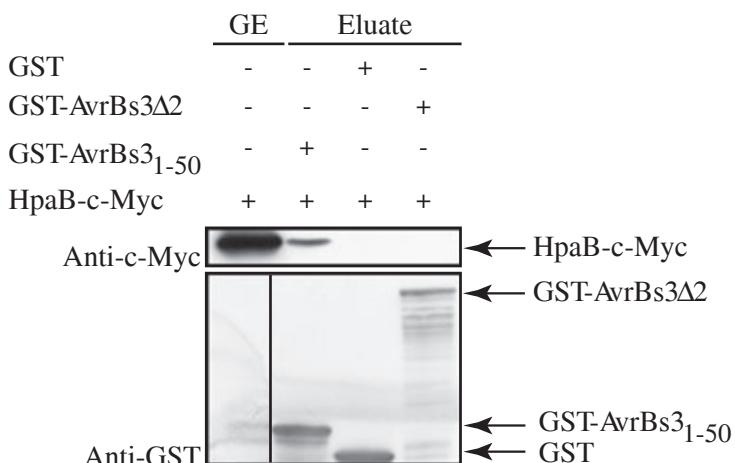


Abbildung 16: HpaB interagiert mit den ersten 50 Aminosäuren von AvrBs3.

GST, GST-AvrBs₃₁₋₅₀ und GST-AvrBs_{3Δ2} wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Lysat eines *E. coli*-Stammes inkubiert, welcher HpaB-c-Myc synthetisierte. 5 µl der Gesamtproteinextrakte (GE) und 20 µl der Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung des Anti-c-Myc-Antikörpers analysiert. Die Membran wurde anschließend mit Anti-GST-Antikörper inkubiert, um GST und die GST-Fusionsproteine nachzuweisen.

Abbildung nach Büttner *et al.*, 2004.

3.2. Ankunft des Effektors in der Pflanzenzelle - Interaktionspartner von AvrBs3 im pflanzlichen Zytoplasma

3.2.1. AvrBs3 dimerisiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle

3.2.1.1. Einführung und Vorarbeiten

In Vorarbeiten wurde in Hefe eine AvrBs3-AvrBs3-Interaktion beobachtet (B. Szurek, Doktorarbeit, 2001). Da angenommen wird, dass AvrBs3 ein Transkriptionsaktivator ist und viele Transkriptionsfaktoren als Dimere aktiv sind, sollte die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in dieser Arbeit detaillierter untersucht werden.

3.2.1.2. AvrBs3 interagiert mit AvrBs3 in Hefe

Für die Überprüfung der AvrBs3-AvrBs3 Interaktion in Hefe mittels LexA-Hefe-Di-Hybrid-System lagen die notwendigen Fusionen an DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne (BD bzw.AD) bereits vor (pYBavrBs3Δ2, pYPavrBs3Δ2; 324). Da BD-AvrBs3 die Transkription der Reportergene *LEU2* und *lacZ* anschaltet, wurde das nicht-autoaktivierende AvrBs3Δ2-Protein, welches die Aminosäuren 2-152 fehlen, als Köder (BD-AvrBs3Δ2) und Beute (AD-AvrBs3Δ2) verwendet. Die stabile Synthese beider Fusionsproteine in Hefe wurde mittels Westernblot bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Bei gleichzeitiger Synthese von BD-AvrBs3Δ2 und AD-AvrBs3Δ2 konnten die Hefezellen ohne Zugabe von Leucin auf Galaktosemedium, welches die Expression von *AD-avrBs3Δ2* induziert, wachsen (Abbildung 17A). Des Weiteren wurde die Expression des β-Galaktosidase-Reportergens induziert (Abbildung 17B). Diese Ergebnisse zeigten, dass AvrBs3Δ2-Moleküle in Hefe miteinander interagieren. Auf Glukosemedium erfolgte keine Induktion der Reportergene (Abbildung 17C), wodurch die Abhängigkeit der Reportergenaktivierung von der Anwesenheit des Beuteproteins AD-AvrBs3 gezeigt wird. Wurde *AD-avrBs3Δ2* jedoch in Hefe mit *BD-bicoid* koexprimiert, so erfolgte keine Induktion der Reporter (Abbildung 17A und B). Demnach konnte bestätigt werden, dass AvrBs3 spezifisch mit einem anderen AvrBs3-Molekül in Hefe interagiert.

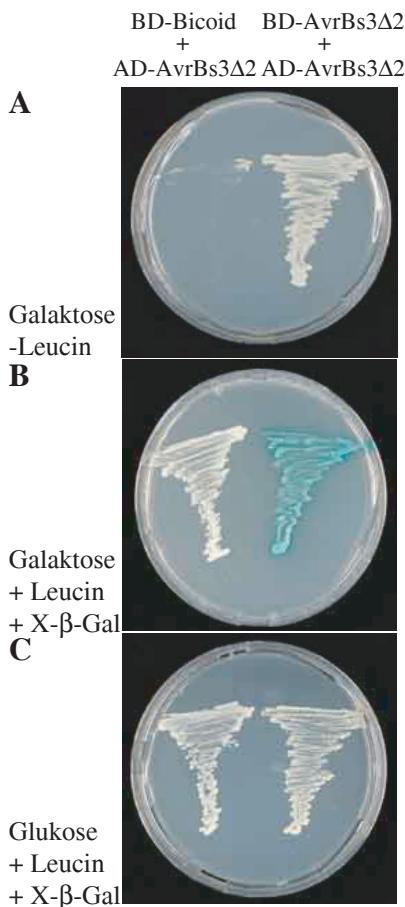


Abbildung 17: AvrBs3-Moleküle interagieren in Hefe. Hefetransformanten, welche die Konstrukte für BD-AvrBs3Δ2, BD-Bicoid und AD-AvrBs3Δ2 enthielten, wurden (A) auf Galaktosemedium ohne Leucin, (B) auf Galaktosemedium mit Leucin und X- β -Gal und (C) auf nicht induzierendes Glukosemedium mit Leucin und X- β -Gal ausgestrichen. Die Platten wurden für 48 h bei 30°C inkubiert. Wachstum der Hefezellen auf Galaktosemedium ohne Leucin sowie Blaufärbung auf X- β -Gal enthaltendem Galaktosemedium weisen auf Interaktion von Köder- und Beuteprotein hin. Die Wiederholung des Experimentes mit 10 unabhängigen Transformanten zeigte identische Ergebnisse.
Abbildung nach Gürlebeck et al., 2005.

3.2.1.3. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion erfolgt auch *in vitro*

Es sollte nun untersucht werden, ob AvrBs3 auch *in vitro* mit anderen AvrBs3-Molekülen interagiert. Dafür wurden die Fusionsproteine GST-AvrBs3 und AvrBs3Δ2-FLAG in *E. coli* synthetisiert und GST-„pull-down“-Experimente durchgeführt. AvrBs3Δ2 wurde für die Interaktionsstudien verwendet, da das Wildtyp-AvrBs3-Protein unspezifisch mit Sepharose interagierte (Daten nicht gezeigt). Die Zelllysate der GST-AvrBs3 und AvrBs3Δ2-FLAG synthetisierenden *E. coli*-Stämme wurden mit Glutathion-Sepharose inkubiert und gebundene Proteine anschließend mittels reduziertem Glutathion eluiert. Westernblotanalysen zeigten, dass AvrBs3Δ2-FLAG mit GST-AvrBs3, nicht aber mit GST von der Matrix eluiert wurde (Abbildung 18). Die Inkubation des Westernblots mit Anti-GST-Antikörper bestätigte vergleichbare gebundene Proteinmengen für GST und GST-AvrBs3 (Abbildung 18A, Spuren 6 und 7). Die detektierten Proteinbanden geringerer Molekularmasse in Eluaten mit GST-AvrBs3 sind C-terminale Degradationsprodukte

Ergebnisse

(Abbildung 18A; Spuren 3, 5 und 7; U. Bonas, persönliche Mitteilung). Um auszuschließen, dass GST-AvrBs3 unspezifisch mit jedem zugegebenen Protein interagiert, wurden die Eluate parallel auf einem zweiten SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. Das Protein-Banden-Muster des Ansatzes, in welchem AvrBs3 Δ 2-FLAG zu GST gegeben wurde, glich in Qualität und Quantität dem Muster des Ansatzes, in welchem AvrBs3-FLAG mit GST-AvrBs3 inkubiert wurde (Abbildung 18B, Spuren und 2). Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass AvrBs3-Moleküle spezifisch *in vitro* oligomerisieren. Die Ergebnisse bestätigen die in Hefe beobachtete Interaktion und zeigen außerdem die Unabhängigkeit der AvrBs3-AvrBs3-Interaktion von anderen Proteinen aus *Xanthomonas* und der Pflanze.

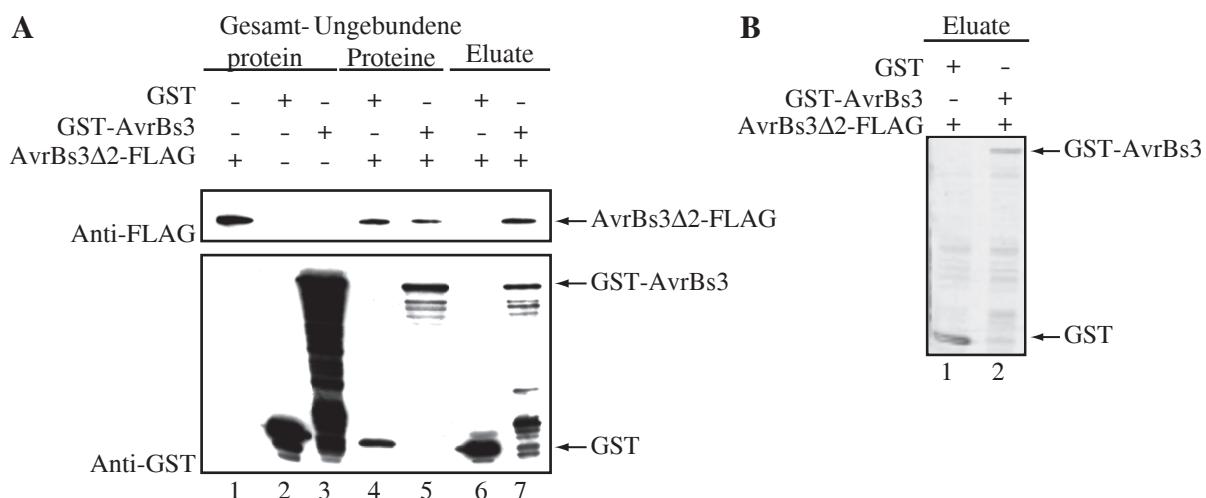


Abbildung 18: AvrBs3-Moleküle interagieren *in vitro*.

Zelllysate eines *E. coli*-Stammes, welcher AvrBs3 Δ 2-FLAG synthetisierte wurde mit Zelllysaten GST bzw. GST-AvrBs3 synthetisierender *E. coli*-Stämme und Glutathion-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels reduziertem Glutathion eluiert. (A) 2,5 µl Gesamtproteinextrakt; 5 µl der Fraktion ungebundener Proteine und 10 µl der eluierten gebundenen Proteine wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot mit Anti-FLAG- und Anti-GST-Antikörper analysiert. (B) 10 µl der Eluate wurden auf ein SDS-Gel gegeben, aufgetrennt und mit Silberlösung gefärbt. Abbildung nach Gürlebeck et. al, 2005.

3.2.1.4. Die Koexpression von mutanten *avrBs3*-Derivaten *in planta* induziert die hypersensitive Reaktion

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die AvrBs3-AvrBs3 Interaktion auch in der Pflanze erfolgt, wie es bereits in einem Versuch von B. Szurek in Vorarbeiten mit Paprikapflanzen gezeigt wurde. Um das Ergebnis abzusichern, wurde das Experiment in der vorliegenden

Arbeit in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Dafür wurden die *avrBs3*-Derivate *avrBs3Δrep-16*, welchem vier „Repeats“ fehlen (145), und *avrBs3ΔAD*, welchem die AD fehlt (324), in *C. annuum* ECW-30R-Pflanzen mittels *Agrobacterium* exprimiert. *C. annuum* ECW-30R enthält das Resistenzgen *Bs3*, welches die Erkennung von AvrBs3 vermittelt, wodurch eine HR induziert wird. Weder AvrBs3Δrep-16 noch AvrBs3ΔAD lösen eine HR auf *C. annuum* ECW-30R aus. Die Koexpression beider Derivate führte zur Induktion der HR, obgleich 24 h verzögert im Vergleich zu der HR, die durch AvrBs3 ausgelöst wurde (Daten nicht gezeigt). Die Induktion der HR bei gleichzeitiger Expression von *avrBs3ΔAD* und *avrBs3Δrep-16* in der Pflanze lässt den Schluss zu, dass beide Proteine interagierten und dadurch einen funktionalen Komplex bildeten. In suszeptiblen Paprikapflanzen und in *N. benthamiana* wurde hingegen keine Transkomplementation für die Induktion einer Hypertrophie beobachtet (Daten nicht gezeigt), welche durch das Wildtyp-AvrBs3-Protein hervorgerufen wird (221).

3.2.1.5. AvrBs3-Moleküle interagieren im pflanzlichen Zytoplasma

Es sollte nun untersucht werden, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion erfolgt. Es wird angenommen, dass Effektorproteine zumindest teilweise ungefaltet durch das T3SS transportiert werden, da gefaltete Proteine zu groß wären, um den Typ III-Pilus zu passieren (98). Deshalb wurde vermutet, dass die Interaktion von AvrBs3-Molekülen nach deren Translokation in der Pflanzenzelle erfolgt. Für die Studien *in planta* sollte *avrBs3ΔNLS*, welchem die NLS fehlen, allein sowie mit *avrBs3* in Pflanzenzellen exprimiert werden. Um die Detektion der Proteine zu ermöglichen, wurden diese an den N-Terminus des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert. *Agrobacterium* vermittelte Expression von *avrBs3-GFP* in der Pflanzenzelle unter der Kontrolle des 35S-Promotors resultierte in der Induktion einer HR in *Bs3*-Paprikapflanzen und einer Hypertrophie in *N. benthamiana*. Die Anwesenheit von GFP am C-Terminus von AvrBs3 beeinflusst demnach nicht dessen bekannte Avirulenz- und Virulenzaktivität. AvrBs3ΔNLS-GFP induzierte erwartungsgemäß weder eine HR noch eine Hypertrophie, da die NLS für beide Aktivitäten unerlässlich sind (324). Mikroskopische Studien zeigten, dass AvrBs3-GFP in den Zellkernen der Pflanzenzellen lokalisiert ist. Die Lokalisierung im Zellkern wurde mittels Färbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) bestätigt, welches sich an DNA anlagert (Abbildung 19A). Im

Gegensatz dazu wurde AvrBs3 Δ NLS-GFP im Zytoplasma detektiert (Abbildung 19B). Wurden jedoch *avrBs3* Δ NLS-GFP und *avrBs3* koexprimiert, so konnte eine GFP-Akkumulation nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in Zellkernen der Pflanzenzellen beobachtet werden (Abbildung 19C). Dies deutet darauf hin, dass AvrBs3 mit AvrBs3 Δ NLS-GFP im Zytoplasma interagiert und dadurch dessen Transport in den Zellkern der Pflanzenzelle vermittelt.

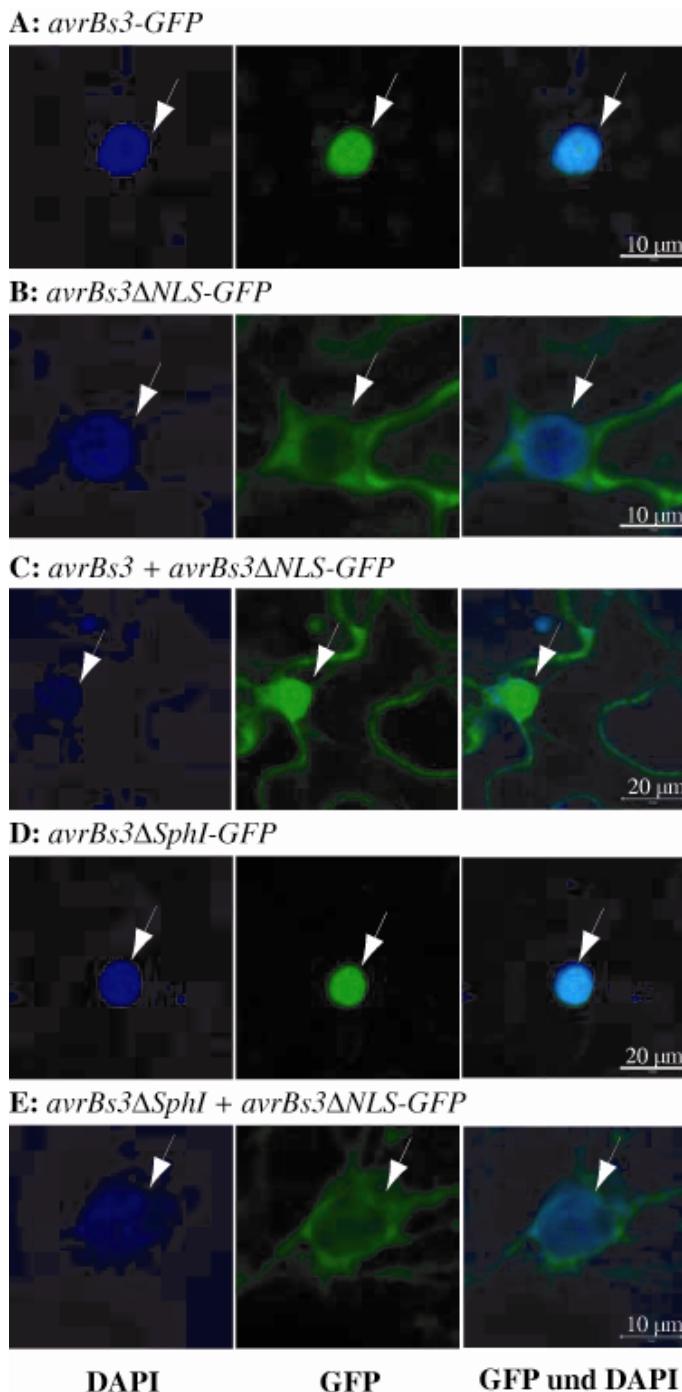


Abbildung 19: AvrBs3 Δ NLS-GFP kann durch AvrBs3 in den Nukleus der Pflanzenzelle importiert werden, nicht jedoch durch AvrBs3 Δ SphI.

avrBs3-GFP und die Deletions-derivate *avrBs3* Δ NLS-GFP und *avrBs3* Δ SphI-GFP wurden transient in *N. benthamiana* mittels *A. tumefaciens* exprimiert (A, B, D). In (C) und (E) wurden Ko-expressionsstudien unter Verwendung zweier *A. tumefaciens*-Stämme durchgeführt. Dafür wurden die *Agrobacterium* Stämme GV3101(*avrBs3*) und GV3101(*avrBs3* Δ NLS) in (C) bzw. GV3101(*avrBs3* Δ SphI) und GV3101(*avrBs3* Δ NLS) in (E) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Um die Zellkerne zu visualisieren, erfolgte 48h nach Infektion eine Infiltration mit DAPI-Lösung. Eine Stunde später wurde Blattmaterial geerntet und mikroskopisch mit Hilfe eines konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet. Dabei wurden spezifische Filter für EGFP und DAPI verwendet. Die Zellkerne sind durch Pfeile markiert.

Abbildung nach Gürlebeck et al., 2005.

3.2.1.6. Die zentralen „Repeats“ vermitteln die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion

Um zu untersuchen, welcher Bereich des AvrBs3-Proteins für die Oligomerisierung notwendig ist, wurden Hefe-Di-Hybrid-Studien durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene BD-AvrBs3-Deletionsderivate (Köder) auf Interaktion mit AD-AvrBs3Δ2 (Beute) in Hefe getestet und die Stärke der Interaktionen durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Bei gleichzeitiger Expression von *AD-avrBs3Δ2* und *BD-avrBs3Δ2* in Hefe war die β -Galaktosidaseaktivität etwa 120 Mal höher als bei Expression mit *BD-bicoid* (Abbildung 20). Da AvrBs3Δ2 die 152 N-terminalen Aminosäuren fehlen, ist diese Region offensichtlich nicht für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe notwendig. Auch die Deletion des kompletten N-terminalen Bereiches (in BD-AvrBs3Δ3) oder des gesamten C-Terminus (in BD-AvrBs3Δ2ΔC) führten nicht zur Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 20). Wurde jedoch die zentrale „Repeat“-Region deletiert, wie in BD-AvrBs3Δ2ΔSphI, so führte dies zu einer stark reduzierten β -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 20A). Diese Daten zeigen, dass die „Repeats“ für die Interaktion zweier AvrBs3Δ2-Moleküle notwendig sind. Wurde die „Repeat“-Region (Konstrukt BD-AvrBs3Δ3ΔC) zusammen mit AD-AvrBs3Δ2 in Hefe synthetisiert, war die Induktion des β -Galaktosidase-Reportergens geringer als bei der Interaktion von AvrBs3Δ2 mit AvrBs3Δ3 (N-Terminus deletiert) oder AvrBs3Δ2ΔC (C-Terminus deletiert). Diese Ergebnisse deuten an, dass sowohl C- als auch N-terminale Bereiche von AvrBs3 an dessen Dimerisierung beteiligt sind. Die N-terminalen 143 Aminosäuren zweier AvrBs3Δ2-Moleküle interagierten jedoch nicht in Hefe, wenn sie als Beute- und Köderprotein synthetisiert wurden. Es erfolgte auch keine Interaktion von N- und C-Terminus zweier AvrBs3Δ2-Proteine. Da ein den C-Terminus umfassendes Köderprotein die Reportergene in Hefe autoaktivierte, konnte diese Region nicht auf Dimerisierung in Hefe getestet werden. Es scheint wahrscheinlich, dass N- und C-Terminus von AvrBs3 eher indirekt an dessen Selbstinteraktion beteiligt sind und sterische Verhältnisse die Interaktion in Hefe beeinflussen. So könnte die Anwesenheit von N- bzw. C-Terminus in AvrBs3Δ2 eine Interaktion mit AvrBs3Δ3ΔC behindern, oder aber die „Repeat“-Region von AvrBs3Δ3ΔC ist weniger gut exponiert als in AvrBs3Δ2 und bietet somit keine ausreichende Interaktionsoberfläche. Experimente mit AvrBs3Δ3ΔC als Köder und Beute konnten allerdings nicht durchgeführt werden, da das Beuteprotein AD-AvrBs3Δ3ΔC unspezifisch mit Bicoid (Negativkontrolle) interagierte. Zusammenfassend kann

festgestellt werden, dass die „Repeat“-Region essentiell und ausreichend für die AvrBs3-AvrBs3 Interaktion ist.

3.2.1.7. Eine Region von 5,5 „Repeats“ erlaubt eine AvrBs3-AvrBs3 Interaktion in Hefe

Die 17,5 „Repeats“ von AvrBs3 sind homolog, aber nicht völlig sequenzidentisch (45, 47). Die Frage war demzufolge, in wieweit einzelne „Repeats“ an der AvrBs3-AvrBs3 Interaktion beteiligt sind. Dafür wurden mehrere Derivate von AvrBs3 als Köderproteine eingesetzt, welche in verschiedenen Bereichen und in unterschiedlichem Umfang in der „Repeat“-Region deletiert waren, zusammen mit AD-AvrBs3Δ2 in Hefe synthetisiert und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (Abbildung 20A). Die Tatsache, dass bis zu 12 „Repeats“ entfernt werden konnten, ohne die β -Galaktosidaseaktivität stark zu beeinträchtigen, deutet an, dass 5,5 „Repeats“ für eine AvrBs3-Dimerisierung ausreichen. Dabei scheinen sowohl die Sequenz der „Repeats“ als auch deren Position innerhalb der zentralen Region unbedeutend. Wurden jedoch 15 oder 16 der 17,5 „Repeats“ von AvrBs3 entfernt, wie z.B. in BD-AvrBs3Δ2Δrep-121 und BD-AvrBs3Δ3Δrep-312, so resultierte deren gleichzeitige Synthese mit AD-AvrBs3Δ2 in Hefe in einer sehr stark reduzierten β -Galaktosidaseaktivität. Die Ergebnisse zeigen, dass 2,5 „Repeats“ für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe nicht ausreichen.

Um auszuschließen, dass die verminderte Interaktion von AvrBs3Δ2Δrep-121 (2,5 „Repeats“) mit AvrBs3Δ2 (17,5 „Repeats“), im Vergleich zur AvrBs3Δ2-AvrBs3Δ2-Interaktion durch sterische Probleme aufgrund der starken Größenunterschiede der Interaktionspartner bedingt ist, wurde AvrBs3Δ2Δrep-121 als Köder und Beute in einer Hefezelle synthetisiert. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der β -Galaktosidase Aktivität (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint die Anzahl der „Repeats“ tatsächlich für die Stärke der AvrBs3-AvrBs3-Interaktion bedeutend zu sein.

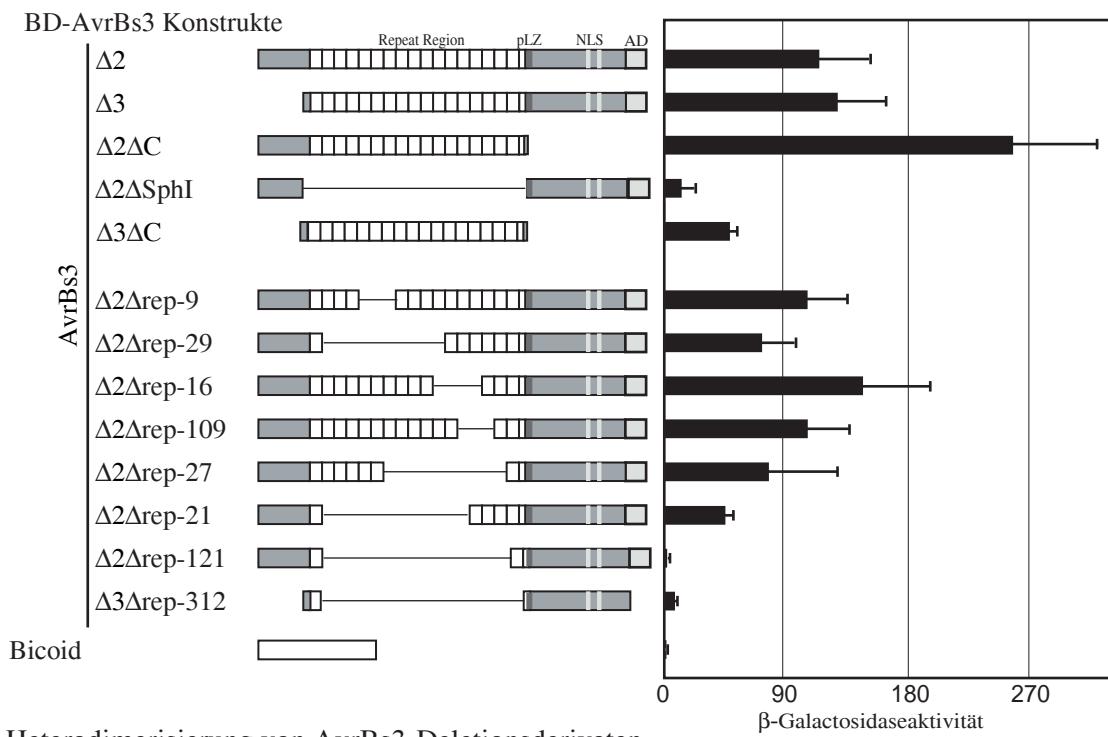
3.2.1.8. Die putativen Leucin-Zipper-„Repeats“ sind nicht an der Dimerisierung von AvrBs3 beteiligt

Um die Beteiligung bestimmter „Repeats“ an der AvrBs3-AvrBs3-Interaktion, besser untersuchen zu können, wurden die früher beschriebenen Deletionsderivate (45, 145) sowohl in den Köder- als auch in den Beute-Vektor kloniert und die resultierenden Plasmide in Hefe transformiert, um sämtliche Köder-Beute-Kombinationen zu erhalten. Die Köder- bzw. Beuteproteine unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Fusionsdomänen (BD bzw. AD) möglicherweise in ihrer Faltung und Flexibilität. Dies könnte zu quantitativen Unterschieden in der β -Galaktosidaseaktivität führen, obwohl die Interaktion zweier AvrBs3-Derivate unter natürlichen Bedingungen vergleichbar wäre. Aus diesem Grund wurden nur solche Köder-Beute-Kombinationen ausgewertet, welche in reziproken Ansätzen zu ähnlichen Resultaten führten (Abbildung 20B). Außerdem wurden einige Derivate auch auf Homodimerisierung getestet (Abbildung 20C). Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseaktivitäts-Messungen zeigen, dass in Hefe im Falle einer Deletion innerhalb der „Repeat“-Region in beiden AvrBs3-Molekülen mehr als 7,5 „Repeats“ in zumindest einem der Moleküle für die Interaktion notwendig sind (Abbildung 20B). Da AvrBs3 Δ 3 Δ rep-312, welchem 16 „Repeats“ fehlen, nicht dimerisierte (Abbildung 20C), reicht der putative „Leucin-Zipper“, C-terminal von der „Repeat“-Region gelegen (111), offenbar nicht aus, um eine AvrBs3-AvrBs3-Interaktion zu vermitteln.

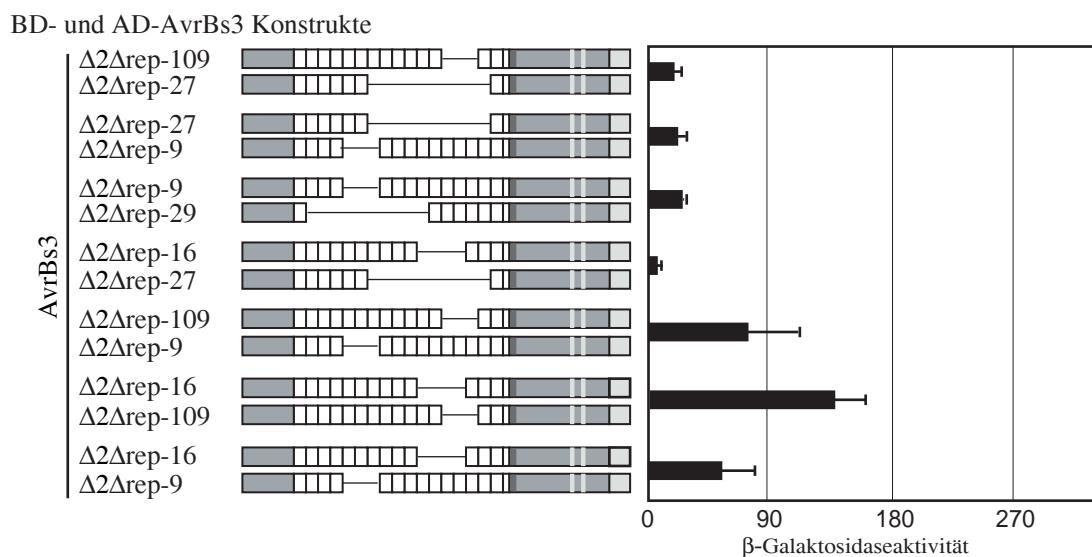
Wie aus Abbildung 20D hervorgeht, war die Proteinmenge aller verwendeten Köder- und Beuteproteine vergleichbar und die Unterschiede in der Interaktionsstärke sind nicht auf Unterschiede in der Proteinmenge zurückzuführen.

Ergebnisse

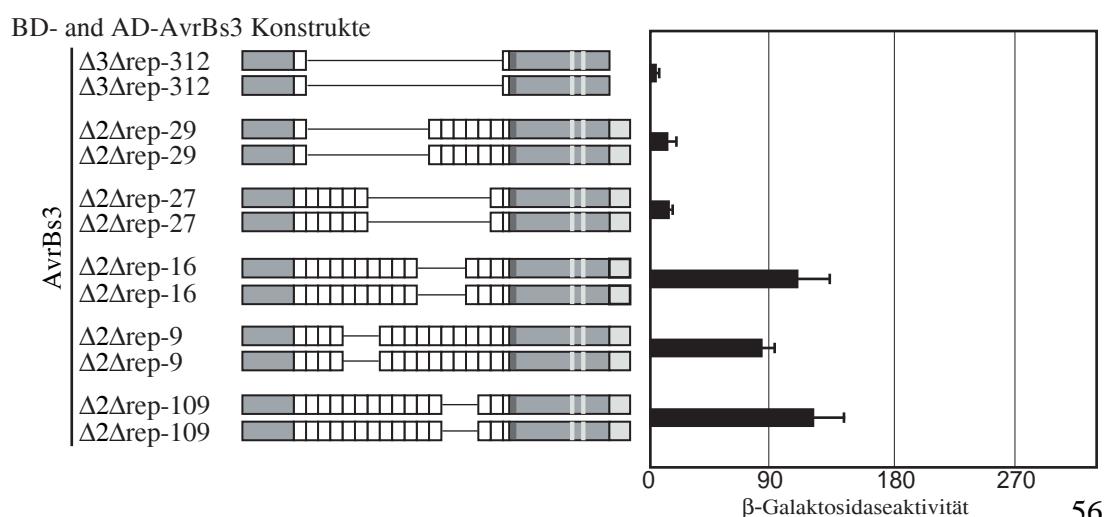
A Interaktion von AvrBs3 und dessen Deletionsderivaten mit AD-AvrBs3 Δ 2



B Heterodimerisierung von AvrBs3-Deletionsderivaten



C Homodimerisierung von AvrBs3-Deletionsderivaten



D Expression der BD- und AD-Konstrukte in Hefe

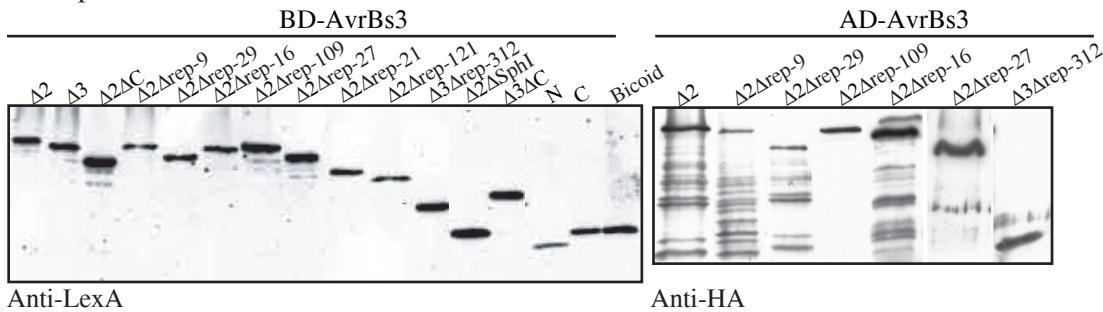


Abbildung 20: Bestimmung der Proteinregion, welche die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe vermittelt.

(A) Der Hefestamm EGY48(pSH18-34), welcher *avrBs3Δ2* als Beutekonstrukt enthielt, wurde mit *avrBs3Δ2*-Derivaten oder *bicoid* im Ködervektor transformiert. Die verwendeten Köder sind links dargestellt. Dabei sind die strukturellen Merkmale und Proteinmotive von AvrBs3 [„Repeat“-Region, putativer Leucin-Zipper (pLZ), Kernlokalisierungssignale (NLS) und die saure Aktivierungsdomäne (AD)] angegeben. Die Intensitäten der Interaktionen wurden mittels β -Galaktosidase-Ansatz quantifiziert. Die angegebenen Messwerte repräsentieren Mittelwerte sowie Standardabweichungen von Messungen mindestens drei unabhängiger Transformanten. (B) β -Galaktosidaseaktivitäten der Hefetransformanten, welche die verschiedenen, links angegebenen Köder- und Beutekonstrukte enthielten oder (C) welche identische *avrBs3*-Derivate sowohl als Köder als auch als Beute exprimierten. Die Experimente wurden dreimal wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden. (D) Überprüfung der Stabilität der Köder- und Beuteproteine in Hefe. Gleiche Mengen Gesamtproteinextrakt von Hefestämmen, welche *BD-avrBs3* bzw. *AD-avrBs3*-Derivate, wie angegeben, exprimierten, wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung von Anti-LexA-Antikörper und Anti-HA-Antikörper analysiert.

Abbildung nach Gürlebeck et al., 2005.

3.2.1.9. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird nicht durch Disulfidbrücken vermittelt

In AvrBs3 befindet sich in jedem „Repeat“ an der Aminosäureposition 30 ein Cysteinrest. Daher stellte sich die Frage, ob intermolekulare Disulfidbrücken zur Ausbildung von AvrBs3-Oligomeren beitragen. Da das Wildtyp-Protein AvrBs3 unspezifisch mit Sepharose interagiert, wurde für das folgende Experiment AvrBs3 Δ 2 mittels Affinitätssäule aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Expression in *E. coli*, um ein gleichzeitiges Aufreinigen möglicherweise interagierender *Xanthomonas*- oder Pflanzenproteine zu vermeiden. Das gereinigte AvrBs3 Δ 2-Protein wurde in Proteinprobenpuffer mit und ohne Zugabe von 1,4-Dithiothreitol (DTT) aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 4°C oder 95°C inkubiert und mittels Gel-Elektrophorese analysiert. DTT reduziert intra- und intermolekulare Disulfidbrücken. In allen Proben zeigte das aufgereinigte Protein jedoch ein apparetentes Laufverhalten eines 110 kDa Proteins, wie es für ein AvrBs3 Δ 2 Monomer erwartet wird (Abbildung 21, oben). Das SDS-Gel wurde nachfolgend auf Nitrozellulose transferiert und mittels Westernblot

analysiert. Dieser bestätigte, dass es sich um AvrBs3 Δ 2-Moleküle handelte (Abbildung 21, unten).

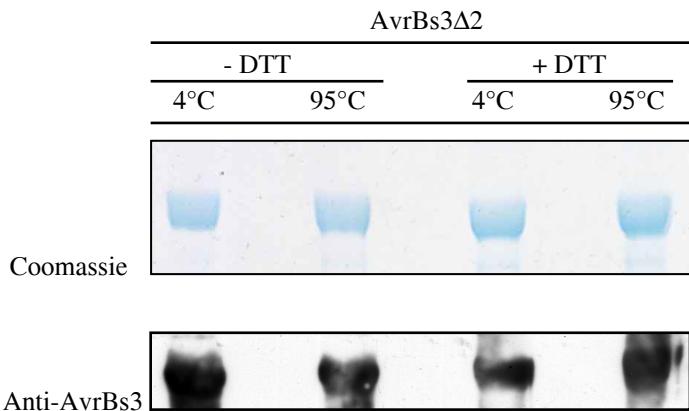


Abbildung 21: Die AvrBs3-Oligomerisierung erfolgt nicht durch Disulfidbrücken. AvrBs3 Δ 2 wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Proteinlösung wurde mit Probenpuffer ohne (Spur 1 und 2) und mit (Spur 3 und 4) DTT versetzt. Ein Teil der Proben wurden bei 95°C erhitzt (Spur 2 und 4). Nach Auf trennung der Proben mittels 8%igem SDS-Gel erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie. Die Proteine des entfärbten Gels wurden anschließend mittels Westernblot unter Verwendung eines spezifischen Anti-AvrBs3-Antikörpers analysiert.

3.2.1.10. Wie viele AvrBs3-Moleküle sind im Oligomer enthalten?

Nachdem die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe, *in vitro* und in der Pflanze gezeigt wurde, sollte geklärt werden, ob AvrBs3 Dimere, Oligomere oder Polymere bildet. Um dies zu untersuchen, wurde *GST-avrBs3 Δ 2* in *E. coli* exprimiert, über eine Glutathion-Affinitätssäule aufgereinigt und nach Entfernen der GST-Domäne mittels „Blue-Native“-Gel-Elektrophorese analysiert (Abbildung 22A). Dabei entsprach das apparetive Laufverhalten der dominanten Proteinspezies der Größe eines dimeren Komplexes. Eine weitere Proteinspezies mit der vorhergesagten Größe für das Monomer wurde ebenfalls detektiert. Dass es sich bei den sichtbaren Proteinen tatsächlich um AvrBs3 Δ 2 handelt, wurde mittels Westernblotanalysen nachgewiesen (Abbildung 22B). Das Ergebnis legt den Schluss nahe, dass AvrBs3 Δ 2 als Dimer agiert.

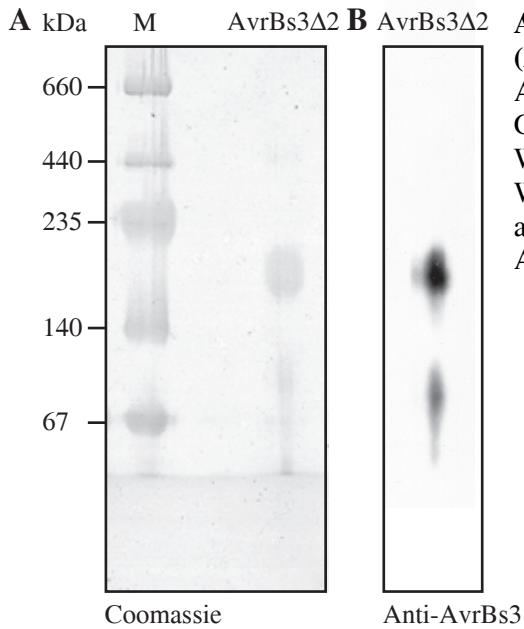


Abbildung 22: AvrBs3 bildet Dimere.

(A) Mittels Affinitätschromatographie gereinigtes AvrBs3 Δ 2-Protein wurde auf ein „Blue-Native“-Gradientengel aufgetragen und durch Entfärbung mit Wasser visualisiert. (B) Das entfärbte Gel wurde mittels Westernblot mit spezifischem Anti-AvrBs3-Antikörper analysiert.

Abbildung nach Gürlebeck et al., 2005.

3.2.1.11. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird auch *in planta* von der „Repeat“-Region vermittelt

In Hefe-Di-Hybrid-Studien konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von AvrBs3 von der „Repeat“-Region abhängt. Um dies in der Pflanze zu prüfen, wurde die Lokalisierung von *avrBs3 Δ NLS-GFP* (Abbildung 19B) bei Koexpression mit *avrBs3 Δ SphI*, in welchem die gesamte „Repeat“-Region fehlt, funktionale NLS aber enthalten sind, untersucht. Dafür erfolgte die Expression beider *avrBs3*-Derivate mittels *Agrobacterium* in Blättern von *N. benthamiana*-Pflanzen. AvrBs3 Δ SphI-GFP lokalisierte erwartungsgemäß im Zellkern (Abbildung 19D). Die Koexpression von *avrBs3 Δ NLS-GFP* und *avrBs3 Δ SphI* führte jedoch nicht zur Lokalisierung von AvrBs3 Δ NLS-GFP im pflanzlichen Zellkern (Abbildung 19E). Das Fehlen der „Repeats“ in AvrBs3 Δ SphI erlaubte demnach keine Interaktion dieses Proteins mit AvrBs3 Δ NLS-GFP in der Pflanze und bestätigte die in Hefe beobachteten Ergebnisse.

Zusammenfassend lassen die Daten der Transkomplementationanalysen und der Kolokalisierungsexperimente den Schluss zu, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion über die zentrale „Repeat“-Region im Zytoplasma der Pflanzenzelle erfolgt.

3.2.2. AvrBs3 interagiert mit Importin α in der Pflanze

3.2.2.1. Einführung und Vorarbeiten

Um die Funktion von AvrBs3 und dessen Wirkungsweise zu studieren, sollten vor allem pflanzliche Zielproteine des Effektorproteins analysiert werden. Während erster Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen zweier cDNA-Bibliotheken der resistenten Paprikalinde *C. annuum* cv. ECW-123 wurden zwei AvrBs3-Interaktoren identifiziert, welche Homologie zu Importin α -Proteinen zeigten (324). Es wurde gezeigt, dass CaIMP α 1 spezifisch mit NLS 2 von AvrBs3 in Hefe und *in vitro* interagiert (324). Importin α -Proteine vermitteln den Transport eukaryotischer Proteine in den Zellkern (124, 125, 194). Die Tatsache, dass AvrBs3 in den Zellkern von Pflanzenzellen lokalisiert (325), in Hefe und *in vitro* mit CaIMP α 1 interagiert (324) sowie die bekannten Daten über homologe Importin α -Proteine (5, 123, 155, 356) zeigen, dass CaIMP α 1 einen sehr guten Kandidaten für ein pflanzliches Zielprotein von AvrBs3 darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob tatsächlich eine Interaktion zwischen AvrBs3 und CaIMP α 1 in der Pflanze erfolgt.

3.2.2.2. Untersuchung der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion in Hefe mittels GATEWAY-Technologie

Für die nachfolgenden Studien der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion wurden *Caimp α 1* und *avrBs3 Δ 2* mittels GATEWAY-Technologie in verschiedene Vektoren kloniert. Auf diesem Wege erstellte Konstrukte enthalten aufgrund der *att*-Stellen 25 bis 50 zusätzliche Basenpaare. Zunächst wurde deren Auswirkung auf die Interaktion mittels Hefe-Di-Hybrid-Studien überprüft. Der Beute-Vektor pJG4-5 war bereits durch Einfügen der *attR*-Rekombinations-Kassette in einen GATEWAY-System-kompatiblen Vektor konvertiert (C. Lorenz und J. Boch, unveröffentlichte Daten). Nach Rekombinationsreaktion mit pENTRCaimp α 1 wurde das resultierende Plasmid pJCLCaimp α 1 in Hefe, welche *BDavrBs3 Δ 2* exprimierte, transformiert. Wie in Abbildung 23 ersichtlich, wuchsen die Transformanten auf induzierendem Galaktosemedium ohne Zugabe von Leucin (Abbildung 23D) und setzten im Medium enthaltenes X- β -Gal um (Abbildung 23E). Dies deutet auf die Aktivierung der Reportergene *LEU2* und *lacZ* und damit auf Interaktion von

CaIMPa1 und AvrBs3Δ2 hin. Auf Glukosemedium induzierten die Transformanten weder *LEU2* noch *lacZ*, wodurch die Abhängigkeit der Aktivierung der Reportergene von der Expression des Beuteproteins gezeigt wird (Abbildung 23B und C). Die Interaktion von AD-CaIMPa1 und BD-AvrBs3Δ2 ist spezifisch, da bei Synthese von AD-CaIMPa1 und der Negativkontrolle BD-Bicoid in einem Hefestamm keines der Reportergene exprimiert wurde (Abbildung 23, linke Seite). Die stabile Synthese der Beute- und Köderfusionsproteine in Hefe wurde mittels Westernblot bestätigt (Abbildung 23F und G).

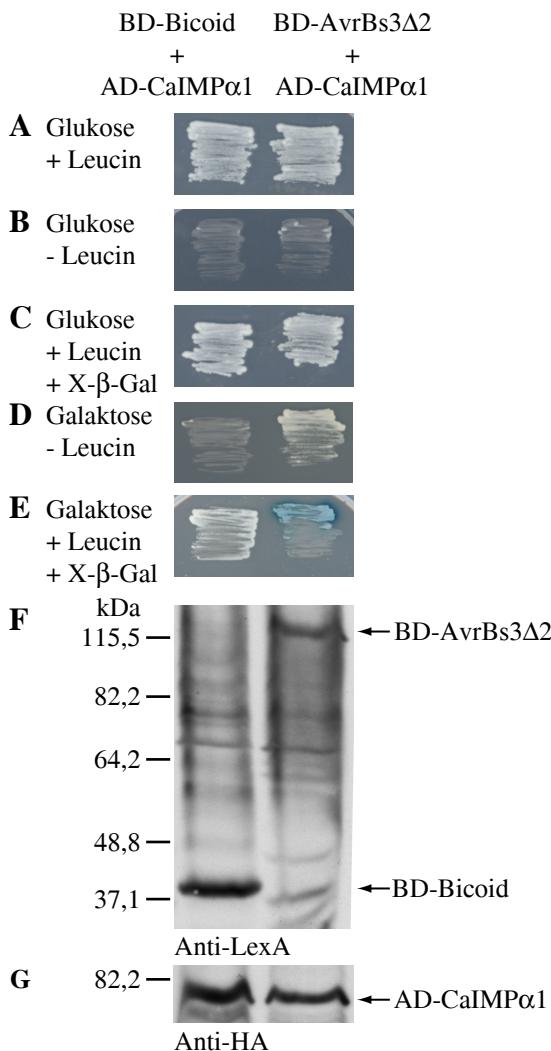


Abbildung 23: CaIMPa1 interagiert mit AvrBs3Δ2 bei Verwendung der GATEWAY-Technologie.

Das Beuteplasmid pJCLCaimpa1 wurde in den Stamm EGY48(pSH18-34) transformiert, welcher *BD-avrBs3Δ2* oder *BD-bicoid* exprimierte. Die Transformanten wurden auf Glukosemedium mit Leucin (**A**) ausgestrichen, um die Anwesenheit der Plasmide zu überprüfen. Nach Ausstreichen der Transformanten auf Glukosemedium ohne Leucin (**B**) bzw. mit Leucin und X- β -Gal (**C**) erfolgte keine Synthese der Beuteproteine und daher keine Interaktion und kein Wachstum der Hefezellen. Auf induzierendem Galaktosemedium (**D, E**) konnten nur Hefen, welche BD-AvrBs3Δ2 und AD-CaIMPa1 enthielten, wachsen und X- β -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Dies ist indikativ für eine spezifische Interaktion von AvrBs3Δ2 und CaIMPa1. Gesamtproteinextrakte wurden mittels Westernblot unter Verwendung eines Anti-LexA-Antikörpers (Köder; **F**) bzw. eines Anti-HA-Antikörpers (Beute; **G**) analysiert.

3.2.2.3. CaIMPa1 und AvrBs3 lokalisieren im gleichen Kompartiment der Pflanzenzelle

Um CaIMPa1 und dessen mögliche Interaktion mit AvrBs3 in der Pflanze mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu untersuchen, wurden Fusionen beider Proteine an die C- und N-Termini der GFP-Varianten CFP (cyan fluoreszierendes Protein) und YFP („yellow fluorescing protein“, gelb fluoreszierendes Protein) hergestellt. Die *avrBs3Δ2*-Fusionen wurden mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana*-Pflanzen exprimiert, wodurch eine Hypertrophie induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf die Funktionalität der fluoreszierenden AvrBs3-Fusionsproteine hin. Die Fusionsproteine lokalisierten wie das Wildtyp-Protein AvrBs3 in Zellkernen der Pflanzenzellen (Abbildung 24 und Daten nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, ist CaIMPa1-YFP sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus transformierter *N. benthamiana*-Zellen detektierbar. Die Fusionsproteine CaIMPa1-CFP, YFP-CaIMPa1 und CFP-CaIMPa1 lokalisierten ebenfalls im Nukleus und im Zytoplasma (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass CaIMPa1-Moleküle als „shuttle“ zwischen den zwei Zellkompartimenten dienen.

Bei Koexpression von *Caimpα1-YFP* und *avrBs3Δ2-CFP* in der Pflanzenzelle wurden beide Proteine im Nukleus detektiert (Abbildung 24). Dabei war die Kolokalisierung unabhängig von den verwendeten Fusionsproteinen (YFP oder CFP) und der Fusionsstelle (N- oder C-Terminus). Die Detektion der fluoreszierenden Fusionsproteine im Zytoplasma ist schwieriger, da Proteine in diesem Kompartiment gleichmäßig verteilt und weniger konzentriert als im Zellkern vorliegen. Die Stabilität der Fusionsproteine in der Pflanzenzelle wurde unter Verwendung eines Anti-GFP-Antikörpers in Westernblotanalysen bestätigt (Abbildung 24 und Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die kolokalisierenden CFP- und YFP-Fusionsproteine in einem Proteinkomplex in der Pflanze vorliegen. Im Falle einer stabilen Interaktion im Nukleus erfolgt ein Energietransfer von angeregten CFP-Molekülen auf YFP. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erste FRET-Analyse mit CaIMPa1-YFP und AvrBs3Δ2-CFP durchgeführt. Dafür wurden *Caimpα1-YFP* und *avrBs3Δ2-CFP* mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* koexprimiert. 48 Stunden nach Infektion erfolgte die mikroskopische Analyse. Es wurden zehn Zellkerne, welche sowohl YFP- als auch CFP-Fluoreszenz aufwiesen, mittels Bleichverfahren („photo bleaching“) analysiert. Dabei wird

Ergebnisse

YFP über einen längeren Zeitraum angeregt, so dass das fluoreszierende Protein zerstört wird. Somit fehlt bei Anregung von CFP ein entsprechender Akzeptor, auf welchen die Energie bei erfolgreichem FRET übertragen werden könnte und die CFP-Fluoreszenz nimmt mit abnehmender YFP-Fluoreszenz zu. Nur in diesem Fall kann von einer Interaktion der untersuchten Fusionsproteine ausgegangen werden.

In sieben der zehn Nuklei sank die detektierbare YFP-Fluoreszenz während des Bleichvorganges (Tabelle 3, **fett** gedruckt). Eine Zunahme der gemessenen CFP-Fluoreszenz konnte für fünf dieser sieben Zellkerne festgestellt werden (Tabelle 3, unterstrichen). Dabei wurden FRET-Effizienzen von 5,9 bis 22,3 gemessen. Die Ergebnisse weisen auf eine Interaktion von CaIMPa1 und AvrBs3Δ2 innerhalb dieser Zellkerne hin. In zwei Zellkernen nahm die CFP-Fluoreszenz zeitgleich mit der YFP-Fluoreszenz während des Bleichverfahrens ab. Diese Kerne weisen demnach keine mittels FRET messbare Interaktion der beiden untersuchten Proteine im Zellkern auf. Die Resultate der bisher durchgeföhrten FRET-Analysen lassen vermuten, dass der Komplex aus AvrBs3Δ2-CFP und CaIMPa1-YFP relativ schnell im Zellkern dissoziert. Die FRET-Studien wurden nur mit Zellkernen durchgeführt, da die verwendeten Fluoreszenzproteine in diesem Kompartiment konzentrierter vorliegen als im Zytoplasma und deren Detektion sowie die Messung von FRET somit möglich sind. Um jedoch statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, sind in zukünftigen Arbeiten zusätzliche FRET-Experimente erforderlich.

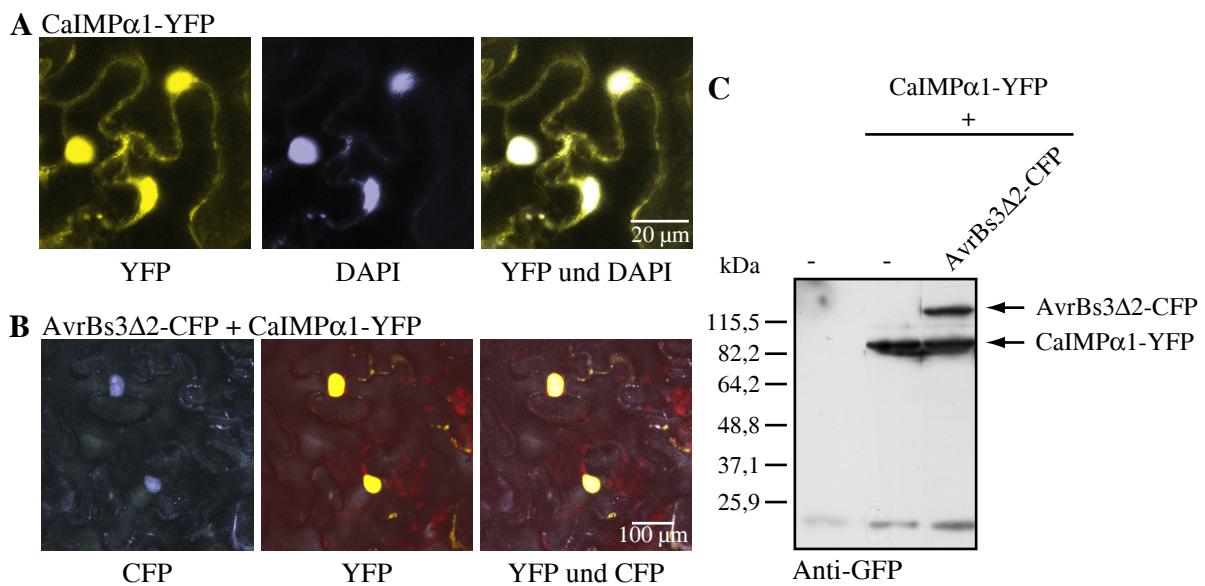


Abbildung 24: Lokalisierung von CaIMPa1 und Kolokalisierung mit AvrBs3Δ2.

Für Lokalisierungsstudien wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58CI(p19) mit dem Stamm (**A**) GV3101 (*Caimpα1-YFP*) in *N. benthamiana* infiltriert. (**B**) Für Kolokalisierungsstudien wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58CI(p19) mit den Stämmen GV3101(*Caimpα1-YFP*) und GV3101(*avrBs3Δ2-CFP*) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Um Zellkerne zu visualisieren, erfolgte 48 h nach Infektion eine Infiltration mit DAPI-Lösung. Eine Stunde später wurde Blattmaterial geerntet und mikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops unter Verwendung spezifischer Filter für ECFP, EYFP und DAPI ausgewertet. Rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. (**C**) Gesamtproteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE (10 %) und Westernblot unter Verwendung eines Anti-GFP-Antikörpers untersucht.

Tabelle 3: Analyse der Interaktion von AvrBs3Δ2 und CaIMPa1 in Zellkernen mittels FRET.

Analysierter Zellkern ^a	YFP-Fluoreszenz ^b		CFP-Fluoreszenz ^c		FRET- Effizienz ^d
	I _{VB}	I _{NB}	I _{VB}	I _{NB}	
1	52,9	30,3	67,4	71,6	5,9
2	39,5	32,6	60,5	73,4	17,6
3	30,6	31,3	51,5	55,9	
4	45,3	43,8	87,3	95,5	8,6
5	44,4	59,0	131,5	170,6	
6	54,9	76,2	67,4	116,8	
7	134,5	68,5	166,8	124,7	-33,8
8	188,7	139,2	158,2	203,5	22,3
9	213,1	162,8	185,4	229,8	19,3
10	61,5	18,4	127,9	43,7	

^a Insgesamt wurden 10 Zellkerne analysiert

^b Fluoreszenzintensität von YFP vor (I_{VB}) und nach dem Bleichverfahren (I_{NB})

^c Fluoreszenzintensität von CFP vor (I_{VB}) und nach dem Bleichverfahren (I_{NB})

^d FRET-Effizienzen E_F (E_F = I_{NB}-I_{VB} / I_{NB} x 100%)

fett: abnehmende YFP-Fluoreszenz während des Bleichens; unterstrichen: zunehmende CFP-

Fluoreszenz während des Bleichens; I: Intensität, NB: nach Bleichen, VB: vor Bleichen

Bei nicht erfolgtem Bleichen von YFP wurde keine FRET-Effizienz berechnet.

3.2.2.4. AvrBs3 und CaIMPa1 koimmunopräzipitieren NLS abhängig aus pflanzlichem Proteinextrakt

Um mögliche zytoplasmatische Komplexe mit AvrBs3Δ2 und CaIMPa1 zu detektieren, wurden Koimmunopräzipitationsanalysen durchgeführt. Dafür wurden die Epitope HA bzw. FLAG an die 3'-Enden von *avrBs3Δ2*, *avrBs3Δ2ΔNLS* und *Caimpα1* fusioniert und die resultierenden Fusionen mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Proteine aus der Pflanze extrahiert und mit Anti-FLAG-Sepharose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, war CaIMPa1-FLAG an die Matrix gebunden (Abbildung 25, Spur 2). Die Inkubation mit einem spezifischen

Ergebnisse

AvrBs3-Antikörper zeigte, dass AvrBs3 Δ 2-HA mit CaIMP α 1-FLAG koimmunopräzipitiert werden konnte, AvrBs3 Δ NLS-HA jedoch nicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass AvrBs3 und CaIMP α 1 in Abhängigkeit von den NLS des Effektors in der Pflanze interagieren.

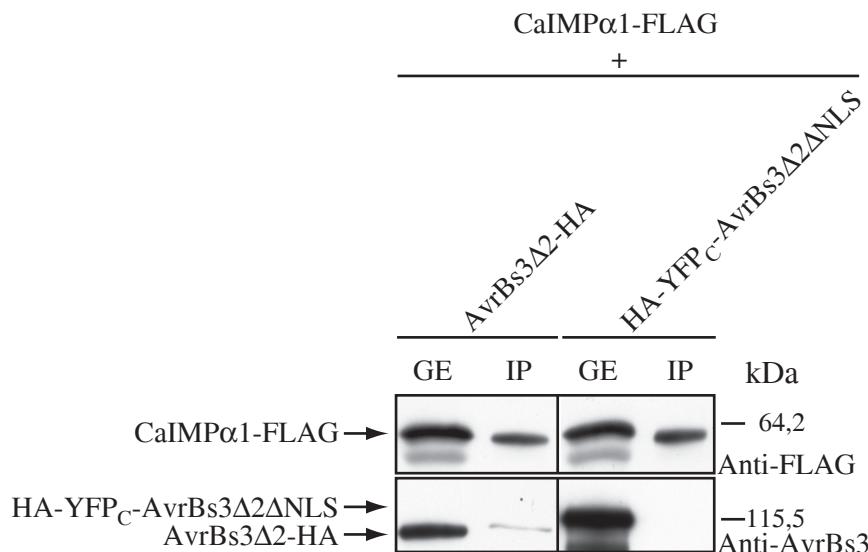


Abbildung 25: CaIMP α 1 koimmunopräzipitiert mit AvrBs3 Δ 2 aus Pflanzenzellen. Für Koimmunopräzipitationsexperimente wurden die *A. tumefaciens*-Stämme C58CI(p19), GV3101(*Caimp α 1-FLAG*) und GV3101(*avrBs3 Δ 2-HA*) bzw. GV3101(*YFP $_C$ -HA-avrBs3 Δ 2 Δ NLS*) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Proteine wurden 48 Stunden nach Infiltration extrahiert und mit Anti-FLAG-Sepharose inkubiert. 5 µl der Gesamtproteinextrakte (GE) und 20 µl der Immunopräzipitationsreaktionen (IP) wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung von Anti-FLAG- und spezifischem Anti-AvrBs3-Antikörper analysiert.

3.2.2.5. Nachweis der AvrBs3 Δ 2-CaIMP α 1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen

Um die Komplexe aus bakteriellem Effektorprotein und pflanzlichem CaIMP α 1 in lebenden Zellen zu visualisieren, wurden bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations (BIFC)-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die C-terminalen 83 Aminosäuren von YFP an den N-Terminus von AvrBs3 Δ 2 fusioniert und die N-terminalen 155 Aminosäuren von YFP an den C-Terminus von CaIMP α 1 (Abbildung 26A). Wenn beide Fusionsproteine interagieren, gelangen die YFP-Hälften in räumliche Nähe, so dass ein fluoreszierendes YFP resultiert (Abbildung 26B, oben). Nach Assoziation der YFP-Fragmente ist der entstandene Komplex stabil und kann nicht mehr dissoziieren, wodurch auch transiente Interaktionen visualisiert werden können (149, 349). *YFP $_C$ -avrBs3 Δ 2* und *Caimp α 1-YFP $_N$* wurden in *N. benthamiana*-Zellen mittels *Agrobacterium* exprimiert. Mit Blattscheiben der

Ergebnisse

Infiltrationsstelle wurden 48 Stunden nach Infektion Fluoreszenz-Mikroskopie-Studien durchgeführt. Dabei wurden starke Fluoreszenzsignale in den Zellkernen des transformierten Pflanzengewebes beobachtet (Abbildung 26B, oben). Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurde $\text{YFP}_C\text{-AvrBs3}\Delta 2\Delta\text{NLS}$ mit $\text{CaIMP}\alpha 1\text{-YFP}_N$, in *N. benthamiana* koy synthetisiert, wobei in unabhängigen Experimenten keine bis maximal drei sehr schwach fluoreszierende Zellkerne detektiert wurden (Abbildung 26A und B, unten). Westernblotanalysen bestätigten die vergleichbare Expression von *Caimpα1-YFP_N*, *YFP_C-avrBs3Δ2* und des NLS-Deletionsderivates (Abbildung 26C). Die Ergebnisse wurden mindestens dreimal reproduziert und weisen darauf hin, dass AvrBs3Δ2 und CaIMPα1 tatsächlich einen Komplex in Zellen lebender Pflanzen bilden. Des Weiteren zeigen die Experimente die Abhängigkeit der Interaktion beider Proteine von den NLS in AvrBs3 in lebenden Pflanzen.

Ergebnisse

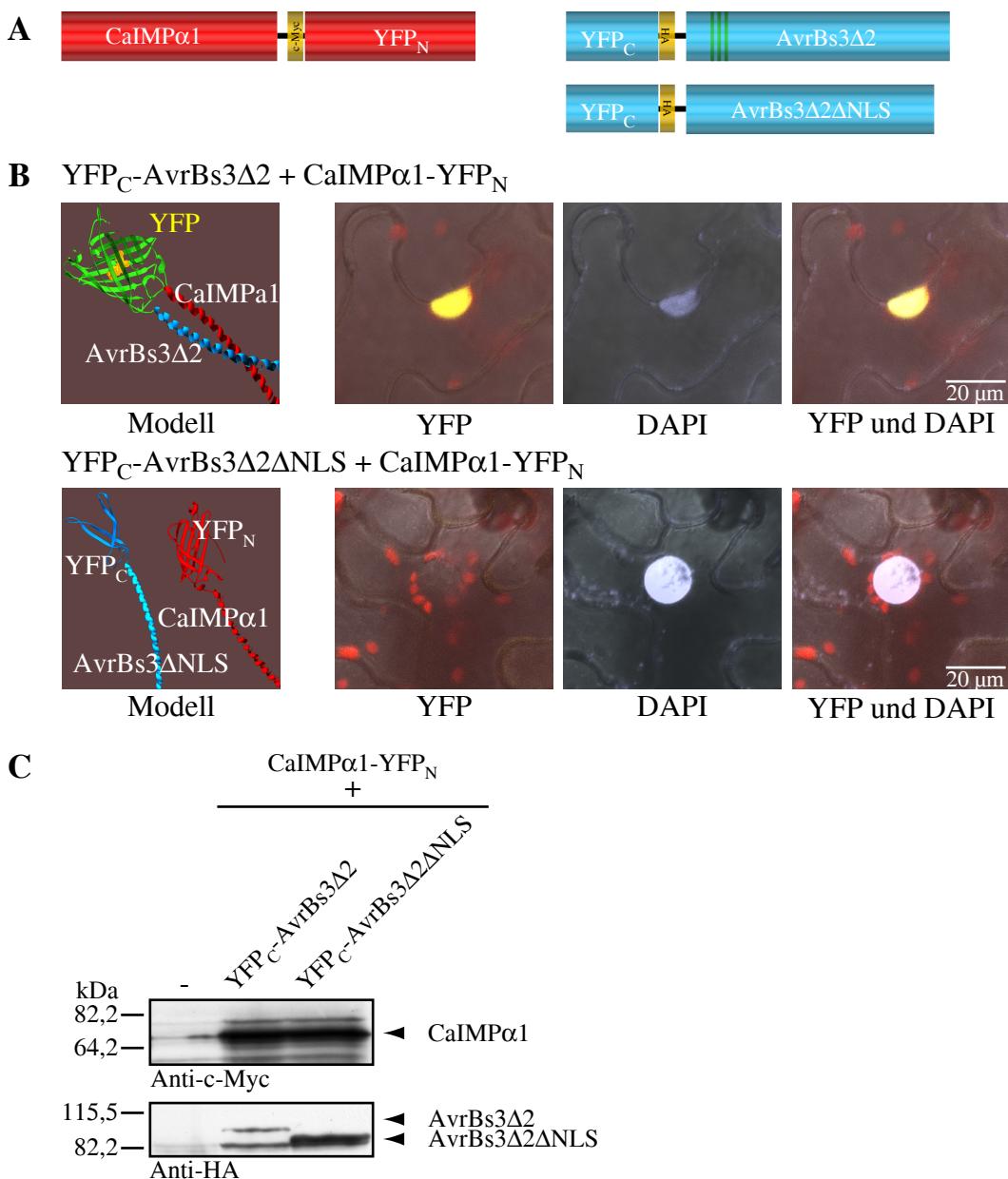


Abbildung 26: Visualisierung der AvrBs3Δ2-CaIMPa1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen mittels BiFC. (A)

Darstellung der verwendeten Konstrukte für die Durchführung von BiFC-Studien. AvrBs3Δ2 und AvrBs3Δ2ΔNLS wurden an den C-Terminus der C-terminalen YFP-Hälfte fusioniert, CaIMPa1 an den N-Terminus der N-terminalen 155 Aminosäuren von YFP. (B) Der *A. tumefaciens*-Stamm C58CI(p19) wurde mit den Stämmen GV3101(*Caimpα1-YFP_N*) und GV3101(*YFP_C-avrBs3Δ2*) oder GV3101(*YFP_C-avrBs3Δ2ΔNLS*) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Um die Zellkerne zu visualisieren, erfolgte 48 h nach Infektion eine Infiltration mit DAPI-Lösung. Eine Stunde später wurde Blattmaterial geerntet und mikroskopisch mit Hilfe eines konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops mit spezifischen Filtern für EYFP und DAPI ausgewertet. Rot: Autofluoreszenz der Chloroplasten. (C) 10 µl Gesamtproteinextrakt wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung eines Anti-HA bzw. Anti-c-Myc-Antikörpers analysiert.

3.2.3. Isolierung neuer AvrBs3-Interaktoren aus Tomate

3.2.3.1. Einführung und Vorarbeiten

In Vorarbeiten führten Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen zweier Paprika-cDNA-Bibliotheken neben der Identifizierung von CaIMP α 1 und CaIMP α 2 auch zur Isolierung von fünf weiteren cDNA-Fragmenten, welche putative AvrBs3-Interaktoren kodieren („AvrBs3 interacting proteins“; Aip; B. Szurek, Doktorarbeit, 2001; 324). Die Analyse dieser Interaktoren wurde in Zusammenarbeit mit S. Hahn im Rahmen eines Praktikums begonnen und in deren Diplom- und Doktorarbeit fortgesetzt. Bisher konnte für keinen dieser AvrBs3-Interaktoren eine eindeutige Rolle als Virulenzzielprotein des Effektors AvrBs3 nachgewiesen werden (S. Hahn, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren wurde in früheren Arbeiten eine cDNA-Bank von *Lycopersicon esculentum* MM (B. Baker) unter Verwendung von AvrBs3 Δ 2 als Köder gesichtet. Dabei wurden 165 putative Interaktoren identifiziert, welche jedoch unspezifisch mit AvrBs3 interagierten (D. Gürlebeck, 2001, Diplomarbeit).

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des Hefe-Di-Hybrid-Ansatzes weitere putative AvrBs3-Interaktoren zu identifizieren. Dafür wurde zunächst eine neue cDNA-Bank erstellt.

3.2.3.2. Wahl und Erstellung der cDNA-Bank

Um Zielproteine von AvrBs3 zu ermitteln, sollte eine cDNA-Bank einer Pflanze gesichtet werden, auf welcher *Xanthomonas* die bakterielle Fleckenkrankheit auslöst. Dazu zählt neben Paprika auch Tomate. In beiden Arten löst AvrBs3 eine Hypertrophie des Mesophyllgewebes aus. Es sollte eine Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank aus *L. esculentum* verwendet werden, da das Arbeiten mit Tomate im Vergleich zu Paprika wichtige Vorteile bietet. Durch das TIGR-Sequenzier-Projekt stehen für *L. esculentum* bereits Sequenz-Daten zur Verfügung. Außerdem erlaubt die Verwendung einer solchen cDNA-Bank spätere Arbeiten mit Zellkulturen während der Analyse der identifizierten Interaktoren, z.B. um stabile transgene Pflanzenlinien zu generieren. Die Erstellung transgener Linien von Paprika ist schwieriger und wurde nach unserem Wissen bisher nur in einer Studie mit

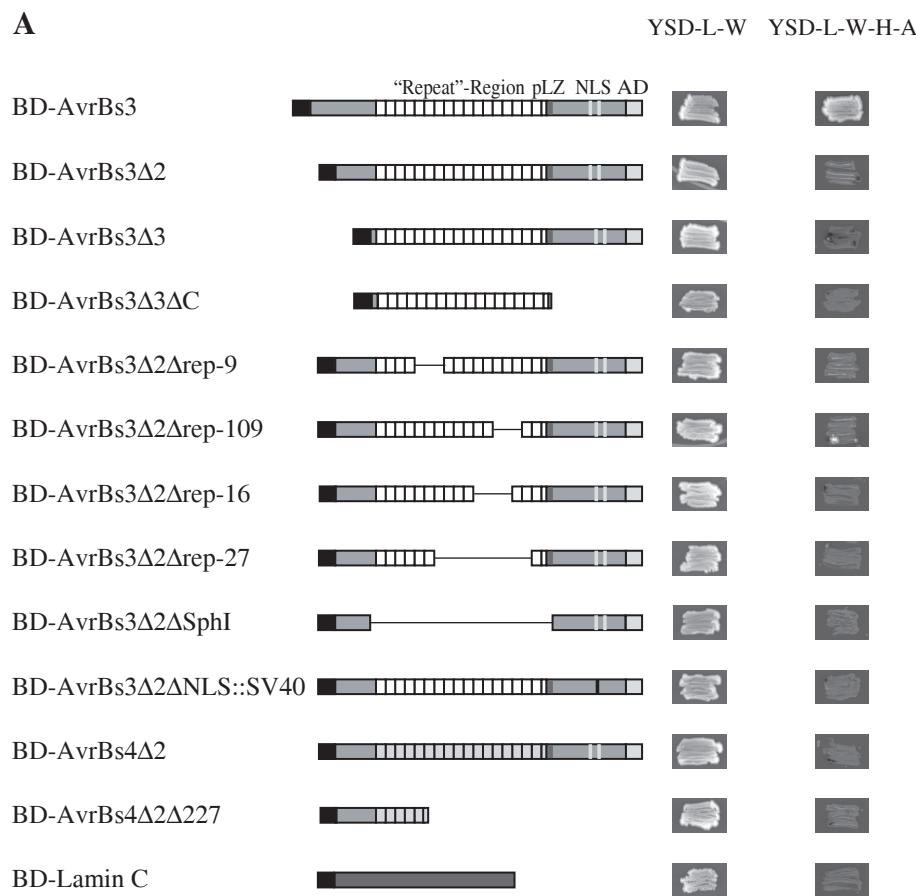
Capsicum frutescens erfolgreich durchgeführt (274). Die Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank wurde in Kooperation mit dem MPIZ Köln erstellt (D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas). Dafür wurden junge und ausgewachsene, nicht mit *Xanthomonas* infizierte Laubblätter von *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Aus 3 g Blattmaterial wurden insgesamt 1,25 mg RNA isoliert. Die Erstellung der cDNA-Bank erfolgte unter Verwendung des QIAGEN MATCHMAKER-Systems nach den Angaben des Herstellers. Es wurde sowohl eine oligodT-cDNA-Bank als auch eine cDNA-Bank unter Verwendung zufälliger Oligonukleotide hergestellt. Beide Banken wurden separat gehalten. Die durchschnittliche Größe der Fragmente der cDNA-Banken beträgt 1-1,5 kb. Die cDNA-Fragmente wurden in den Hefe-Di-Hybrid-Beutevektor des MATCHMAKER-GAL4-Systems den Angaben des Herstellers folgend rekombiniert. Dabei wurde eine Mischung von Beutevektor und cDNA-Fragmenten direkt in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Rekombinationsreaktion erfolgte in den Hefezellen durch deren zelleigene Enzyme. Diese Strategie benötigt keine zusätzliche Amplifizierung der cDNA in *E. coli*, wodurch oft Plasmide mit kleineren cDNA-Fragmenten angereichert und somit große cDNA-Fragmente verdünnt werden. Ein weiterer Vorteil dieser cDNA-Banken ist, dass vor der Rekombination eine Normalisierung erfolgte (H. Sommer, MPIZ Köln, unveröffentlichte Daten). Dies sollte zu einer vergleichbaren Anzahl der verschiedenen cDNA-Fragmente unabhängig von der Expressionsstärke der korrespondierenden Gene in der Pflanze führen. Die Zelldichte beider cDNA-Banken wurde nach dem Einfrieren mit 8×10^8 Hefeklonen/ml für die oligodT-cDNA-Bank und 2×10^8 Hefeklonen/ml für die mit zufällig generierten Oligonukleotiden erstellte cDNA-Bibliothek bestimmt.

3.2.3.3. Wahl und Konstruktion geeigneter Köderproteine

In Vorarbeiten wurde AvrBs3Δ2 als Köder verwendet. Um zu vermeiden, bereits bekannte Interaktoren zu isolieren, sollten für neue Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen andere Deletionsderivate von AvrBs3 verwendet werden. Dafür wurden die bereits unter 3.2.1. beschriebenen AvrBs3-Derivate in den Ködervektor des GAL4-Systems (pGBKT7) kloniert. Für spätere Interaktionsstudien wurden neben verschiedenen AvrBs3-Deletionsderivaten auch AvrBs4-Konstrukte in pGBKT7 kloniert. Nach Transformation der resultierenden Köderplasmide in die Hefestämme AH109 und Y187 wurde die

Ergebnisse

Expression und mögliche Fähigkeit zur Transkriptionsautoaktivierung der verschiedenen Köderproteine untersucht (Abbildung 27A und B). Der Autoaktivierungstest erfolgte im Hefestamm AH109, welcher die Reportergene enthält. Um zu überprüfen, ob die erstellten Köderkonstrukte die Reportergene *HIS3* und *ADE2* aktivieren können, wurden die AH109-Transformanten auf selektives Medium, welchem Adenin und Histidin fehlte, ausgestrichen (Abbildung 27). Wie bereits in den Vorarbeiten mit dem „interaction trap“-System beobachtet, induzierten das vollständige AvrBs3-Protein sowie AvrBs4 (trotz abweichender DNA-BD im GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System) die Reportergenexpression (Abbildung 27). Frühere Arbeiten kartierten die autoaktivierende AvrBs3-Region innerhalb der Aminosäuren 2-152 und führten zur Generierung des Kontraktes *avrBs3Δ2* (324). Hefezellen des Stammes AH109, welche *BD-avrBs3Δ2*, *BD-avrBs4Δ2* bzw. Deletionsderivate von *BD-avrBs3Δ2* oder *BD-avrBs4Δ2* exprimierten, wuchsen nicht ohne Zugabe von Adenin und Histidin (Abbildung 27). Dies zeigt, dass die getesteten Köderproteine nicht zur Induktion der Expression der Reportergene führen. Westernblotanalysen bestätigten die Synthese der getesteten Köderfusionsproteine in Hefe (Abbildung 27).



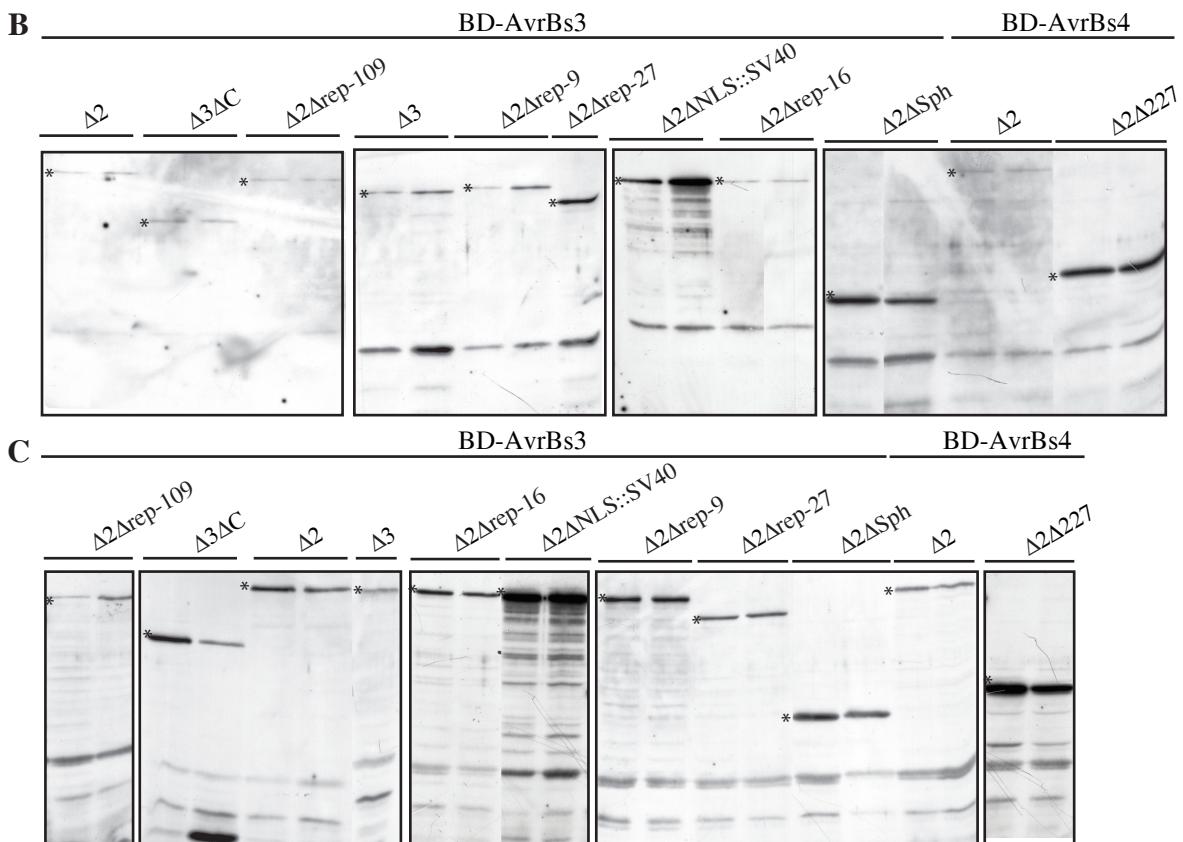


Abbildung 27: Überprüfung der AvrBs3- und AvrBs4-Köderproteine.

(A) Die für Hefe-Di-Hybrid-Studien in diesem Teil der Arbeit verwendeten Köderkonstrukte von *avrBs3* und *avrBs4* sind dargestellt (pLZ: putative Leucin-Zipper, NLS: Kernlokalisierungssignale, AD: Aktivierungssdomäne). pGBKT7-Köderplasmide wurden in den Hefestamm AH109 transformiert, welcher die Reportergene enthält. Die transformierten Hefezellen wurden auf Selektivmedium ohne Tryptophan (YSD-W) ausgestrichen, um auf Anwesenheit der Köderplasmide zu testen und auf Selektivmedium ohne Tryptophan, Adenin und Histidin (YSD-W-H-A), um auf Autoaktivierung der Reporter zu testen. Wachsen die Hefezellen nicht, so induziert das enthaltene Köderprotein das Reportergen *ADE2* nicht und ist für Hefe-Di-Hybrid-Arbeiten geeignet. (B) Gesamtproteinextrakte unabhängiger Transformanten der AH109-Hefestämme für den Autoaktivierungstest und (C) Gesamtproteinextrakte der Y187-Hefestämme für Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung eines Anti-c-Myc-Antikörpers in einem Westernblot analysiert. Sterne markieren detektierte Proteine mit apparentem Laufverhalten der erwarteten Größe.

Für Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen wurde das Derivat AvrBs3 $\Delta 2\Delta NLS::SV40$ NLS verwendet, welches in Hefe nicht mit den bereits identifizierten Interaktoren Aip5 und CaIMPo1 (Aip1) interagiert (324; S. Hahn, Diplomarbeit, 2004), in resistenten Pflanzen aber eine HR und in suszeptiblen Pflanzen eine Hypertrophie induziert (221, 336). AvrBs3 $\Delta 2\Delta NLS::SV40$ NLS enthält anstelle der AvrBs3-NLS die heterologe 8 Aminosäuren umfassende NLS des großen T-Antigens des Simian Virus SV40.

3.2.3.4. Die Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3Δ2ΔNLS::SV40NLS als Köder

BD-AvrBs3Δ2ΔNLS::SV40NLS wurde als Köder verwendet, um die beiden neuen cDNA-Bibliotheken von Tomate zu sichten. Dafür wurde der Stamm Y187, der das Köderkonstrukt enthielt, mit dem Stamm AH109, in welchen die cDNA-Bank transformiert wurde, gepaart. Insgesamt wurden $1,284 \times 10^8$ Hefeklone gesichtet; 1013 putativ positive Klone wurden selektiert und davon 231 nachfolgend analysiert.

Nach Transformation der isolierten Beuteplasmide in frische Hefezellen des Stammes AH109 (pGBKT7avrBs3Δ2), welcher das BD-AvrBs3Δ2-Protein synthetisiert, wuchsen sieben der resultierenden Transformanten auf Medium ohne Adenin und Histidin. Die in diesen Transformanten enthaltenen Beuteproteine interagierten demnach reproduzierbar mit BD-AvrBs3-Köderfusionen. Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurden die Plasmide in den Stamm AH109(pGBKT7lamC) transformiert, welcher das humane Lamin C-Protein, fusioniert an die DNA-BD, synthetisierte. Lamin C dient als Negativkontrolle des GAL4-MATCHMAKER-Hefe-Di-Hybrid-Systems, da vermutet wurde, dass es nur mit anderen Lamin C-Proteinen und weiteren Laminen interagiert. Sechs der sieben getesteten Beuteproteine interagierten mit BD-Lamin C und demzufolge vermutlich auch unspezifisch mit BD-AvrBs3Δ2. Eines der isolierten cDNA-Fragmente kodierte dagegen für einen putativen Interaktor, welcher spezifisch mit AvrBs3Δ2 in Hefe interagiert (Aip6; Abbildung 28). Da beinahe alle untersuchten Hefeklone falsch positiv waren oder unspezifisch interagierende Proteine enthielten, wurden die verbliebenen 782 Klone nicht analysiert.

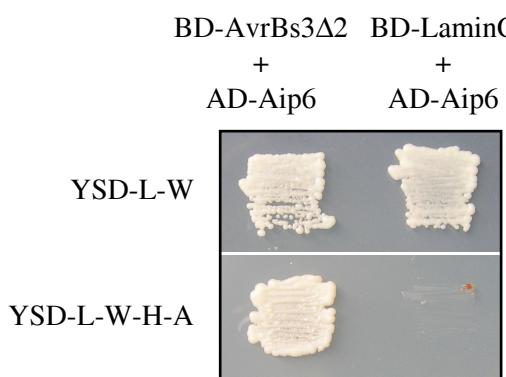


Abbildung 28: Aip6 interagiert spezifisch mit AvrBs3 in Hefe.

Das aus Hefe isolierte Beuteplasmid pGADT7-Rec2Aip6 wurde in die Stämme AH109(*BD-avrBs3Δ2*) und AH109(*BD-lamC*) transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan (YSD-L-W) ausgestrichen, um die Anwesenheit der Plasmide zu überprüfen, sowie auf Selektivmedium ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin (YSD-L-W-H-A), um auf Induktion der Reportergene zu testen. Eine Prototrophie für Adenin und Histidin der Hefen ist indikativ für eine Interaktion der Fusionsproteine. Das Ergebnis wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten reproduziert.

3.2.3.5. Aip6 interagiert spezifisch mit der „Repeat“-Region von AvrBs3

Es sollte nun bestimmt werden, welcher Teil des Effektorproteins AvrBs3 an das potentielle Zielprotein Aip6 bindet. Dafür wurden Hefestämme, die verschiedene *avrBs3Δ2*-Deletionsderivate exprimierten, mit dem isolierten Beuteplasmid pGADT7-Rec2Aip6 transformiert und auf Selektivmedium ohne Adenin und Histidin ausgestrichen (Abbildung 29). Wurde AD-Aip6 in derselben Hefezelle synthetisiert wie BD-AvrBs3Δ3, welchem der gesamte N-Terminus fehlt, wurde eine Induktion der Reportergene beobachtet. AD-Aip6 interagierte außerdem mit BD-AvrBs3Δ3ΔC, dem zusätzlich der C-terminale Bereich fehlt. Die Koexpression von *AD-Aip6* und *BDavrBs3Δ2ΔSphI*, welchem die gesamte „Repeat“-Region fehlt, führte hingegen nicht zur Induktion der Reportergene in Hefe. Die Resultate deuten an, dass N- und C-Terminus von AvrBs3 für die Interaktion mit Aip6 entbehrlich sind, wohingegen die zentralen „Repeats“ die interagierende Oberfläche für Aip6 zu enthalten scheinen.

Im Folgenden wurde ermittelt, welcher Teil der zentralen Region von AvrBs3 an der Interaktion mit dem pflanzlichen Protein Aip6 beteiligt ist. Dafür wurden die „Repeat“-Deletionsderivate *avrBs3Δ2Δrep-9*, *avrBs3Δ2Δrep-109*, *avrBs3Δ2Δrep-16* bzw. *avrBs3Δ2Δrep-27* als Köderfusionen mit *AD-Aip6* in Hefe koexprimiert und die Induktion der Reportergene analysiert. *AvrBs3Δ2Δrep-9*, *AvrBs3Δ2Δrep-109* und *AvrBs3Δ2Δrep-16* interagierten mit Aip6 in Hefe. Fehlten dagegen zehn der 17,5 „Repeats“ von AvrBs3, wie in *AvrBs3Δ2Δrep-27*, so erfolgte keine Interaktion mit Aip6 (Abbildung 29). Demnach wird die Interaktion von AvrBs3 mit Aip6, ähnlich der Dimerisierung von AvrBs3, nicht durch spezifische „Repeats“ vermittelt. Die durchgeführten Studien zeigten vielmehr, dass eine Mindestanzahl an „Repeats“ von AvrBs3 notwendig ist, um eine Interaktion mit dem Pflanzenprotein Aip6 zu gewährleisten. Dies deutet an, dass das Leucin reiche Rückgrat der „Repeats“, nicht aber deren variablen Aminosäure-Reste für die AvrBs3-Aip6-Interaktion verantwortlich ist.

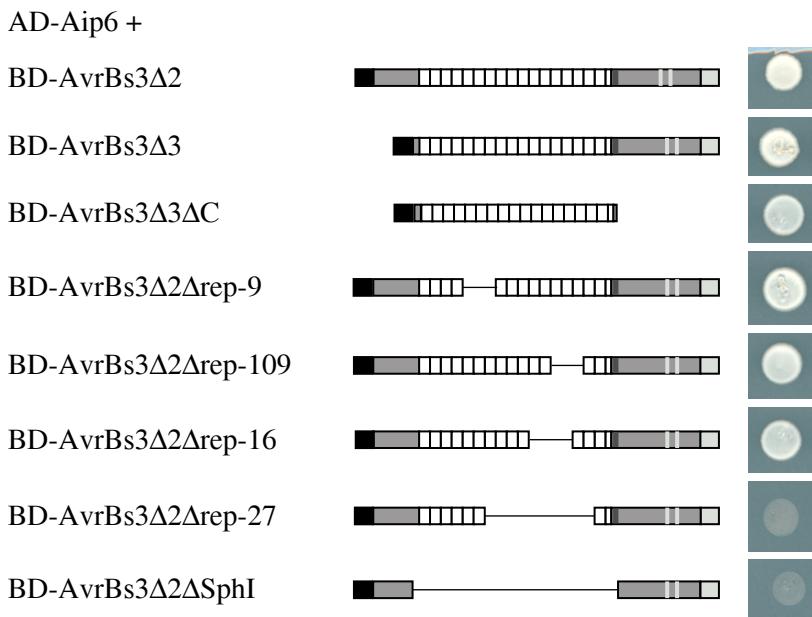


Abbildung 29: Bestimmung der Aip6-Bindestelle in AvrBs3.

AH109-Hefestämme, die *BD-avrBs3Δ2*-Derivate, wie angegeben, enthielten, wurden mit pGADT7-Rec2Aip6 transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsmedium ohne Hisidin und Adenin ausgetropft. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

3.2.3.6. *Aip6* kodiert für ein Thiaminbiosyntheseprotein C-Homolog

Die aus Tomate isolierte *Aip6*-cDNA wurde sequenziert und mit den erhaltenen Sequenzinformationen BLAST N- und BLAST X-Analysen durchgeführt. Diese ergaben eine Identität von 84% zu dem putativen Thiaminbiosyntheseprotein C-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (AAC3523) und eine 60%ige Identität zu ThiC (Thiamin-Biosynthese-Enzym C) aus *E. coli* K12 (M88701; 344). ThiC wurde in Pflanzen bisher noch nicht näher charakterisiert. In *E. coli* K12 liegt *ThiC* in einem Operon, dessen Gene die verschiedenen an der Vitamin B1-Synthese beteiligten Enzyme kodieren (344; Abbildung 30). Demnach katalysiert ThiC die Synthese von Hydroxymethylpyrimidin zu Beginn der Enzymkaskade, welche zur Bildung von Thiamin (Vitamin B1) führt.

In der TIGR-Datenbank sind bisher zwei Sequenzen („expressed sequence tag“, EST) von Tomate veröffentlicht (TC156399, TC156399), welche Ähnlichkeiten zu *Aip6* aufweisen. TC156399 zeigte eine 100%ige Identität zum 5'-Ende der *Aip6*-cDNA. TC156940 weist eine Identität von 100% zum 3'-Bereich der *Aip6*-cDNA auf. Diese Daten deuteten an, dass beide Tomaten-EST demselben Gen entsprechen. Da kein vollständiger EST für Tomate in der Datenbank vorlag, wurden 5'- und 3'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“)-Experimente durchgeführt. Die dabei erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in den Vektor TOPO-TA kloniert und sequenziert. Mehrere unabhängige RACE-cDNA-Fragmente wurden sequenziert, so dass nun die vollständige Sequenz für das *ThiC*-Homolog aus *L. esculentum* MM (*LeThiC*) vorliegt. Der Sequenzvergleich mit den EST-

Daten ergab sieben Basenpaar-Unterschiede. Der vorhergesagte Translationsstart in TC156399 ist identisch zum Start-ATG, welches durch 5'-RACE-Experimente ermittelt wurde. Drei Stop-Kodone 5' von diesem ATG gelegen, deuten an, dass dieses ATG tatsächlich die Translations-Startstelle ist.

Basierend auf der ermittelten Sequenz des 5'- und 3'-Endes wurde mittels PCR die vollständige *LeThiC*-cDNA aus *L. esculentum* MM (mit und ohne Stopkodon) amplifiziert und, die GATEWAY-Technologie nutzend, in den Vektor pENTR/D-TOPO kloniert. Der Sequenzvergleich der klonierten cDNA, des Fragmentes aus dem Hefevektor pGADT7-Rec2Aip6 sowie der EST aus der Datenbank ergaben, dass das vollständige *LeThiC*-Gen isoliert wurde (Abbildung 30, Anhang 2). Die cDNA, welche für LeThiC kodiert, umfasst 1872 Basenpaare, das korrespondierende Protein hat eine molekulare Masse von 69,6 kDa. Die Nukleotidsequenz um das erste ATG ähnelt der pflanzlichen Initiations-Konsensus-Sequenz (169; Anhang 2). Ein typisches eukaryotisches Polyadenylierungsmotiv wurde im 3'-RACE-Fragment nicht identifiziert, der zum 3'-Bereich identische, jedoch längere Tomaten-EST TC156940 enthält allerdings ein solches konserviertes Motiv (AATAAA; (271).

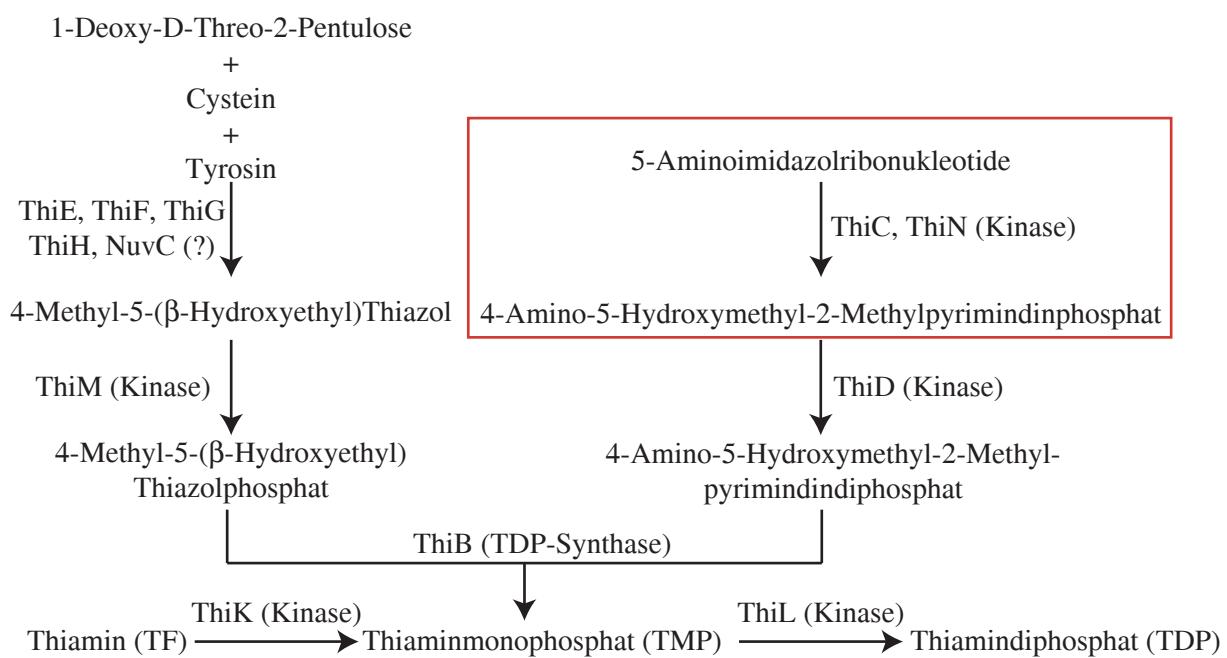


Abbildung 30: Die Vitamin B1-Synthese in *E. coli*.

Die Synthese von Thiamin (Vitamin B1), Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat ist schematisch dargestellt. Die von ThiC katalysierte Reaktion ist rot hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach Van der Horn et al. (1993).

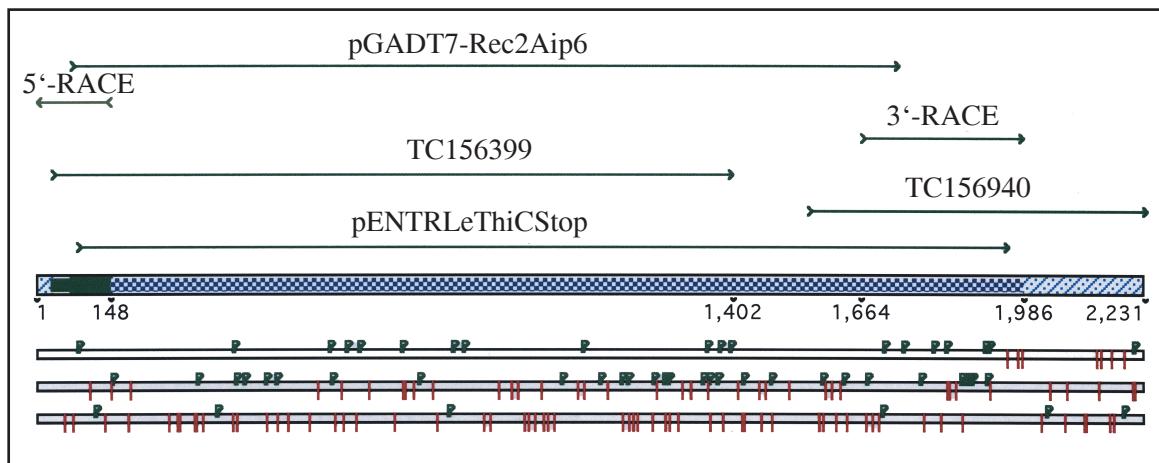


Abbildung 31: Vergleich der isolierten cDNA-Fragmente mit Sequenzen aus der EST-TIGR-Datenbank.

Die isolierte cDNA kodiert für ein Protein mit Homologie zum Thiamin-Biosynthese-Enzym C aus Bakterien (ThiC). Dargestellt sind die Sequenz der isolierten cDNA (pGADT7-Rec2Aip6), die verfügbaren EST-Sequenzen von Tomate TC156399 und TC156940 aus der Datenbank, je eines der mittels RACE-PCR erhaltenen cDNA-Fragmente für die 5'- und 3'-Bereiche des Gens (5'-Race und 3'-Race) sowie die vollständige cDNA, welche aus *L. esculentum* amplifiziert und in pENTRD/TOPO kloniert wurde (pENTRLeThiCStop). Die Sequenzen sind vergleichend relativ zueinander dargestellt. Die ermittelte vollständige cDNA-Sequenz von *LeThiC* aus *L. esculentum* MM ist unter Angabe der Transkriptions-Start- (Grün) und Stop- (Rot) Kodone dargestellt (offenes Leseraster 1).

3.2.3.7. LeThiC interagiert mit AvrBs3 in Hefe unabhängig von den fusionierten Aktivierungs- und DNA-Bindedomänen

In weiteren Analysen sollte untersucht werden, ob auch das vollständige LeThiC-Protein mit AvrBs3 in Hefe interagiert. Unter Verwendung der GATEWAY-Strategie wurde das Plasmid pGADattLeThiC hergestellt und in Hefezellen des Stammes AH109 transformiert, welcher pGBK7avrBs3 Δ 2 enthielt. Der resultierende Stamm, welcher AD-LeThiC und BD-AvrBs3 Δ 2 synthetisierte, wurde auf selektives Medium ohne Adenin und Histidin ausgestrichen. Das Wachstum der Hefezellen war indikativ für eine Interaktion beider Proteine (Abbildung 32). AD-LeThiC wurde auch mit dem als Negativkontrolle dienenden Konstrukt BD-LaminC in Hefe koexprimiert. In diesem Fall konnte keine Induktion der Reportergene festgestellt werden (Abbildung 32).

LeThiC wurde ebenfalls in den GATEWAY-Beute-Vektor pJCL des „interaction trap“-Systems rekombiniert. Das resultierende Plasmid pJCLLeThiC wurde in den Hefestamm EGY48 transformiert, welcher chromosomal das *LEU2*-Reportergen, das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 sowie das Köderplasmid pYBavrBs3 Δ 2 enthielt. Die

erhaltenen Transformanten konnten ohne Leucin wachsen und färbten sich auf X-Gal enthaltendem Selektivmedium blau (Abbildung 33). Die Reportergene wurden nicht aktiviert, wenn *AD-LeThiC* mit der Spezifitätskontrolle *BD-bicoid* in EGY48(pSH18-18-34) exprimiert wurde (Abbildung 33). Westernblotanalysen zeigten, dass die untersuchten Köder- und Beute-Proteine in den Hefetransformanten synthetisiert wurden (Abbildung 32, 33 und Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse in Hefe zeigen, dass das vollständige LeThiC-Protein aus Tomate spezifisch mit AvrBs3 interagiert, unabhängig von den fusionierten AD- und BD-Domänen.

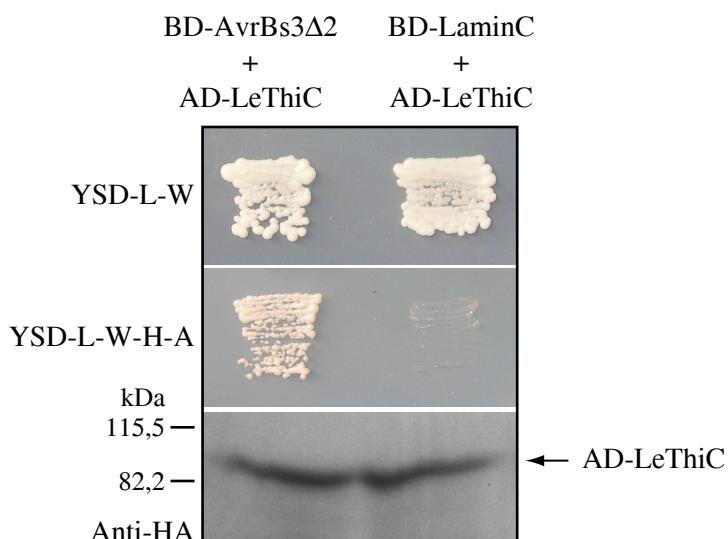


Abbildung 32: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3Δ2 im GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System.

Das Beuteplasmid pGADT7attLeThiCstop wurde in die Stämme AH109(pGBKT7avrBs3Δ2) und AH109(pGBKT7lamC) transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan (YSD-L-W) und auf Selektivmedium ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin (YSD-L-W-H-A) ausgestrichen. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot mit Anti-HA-Antikörper zur Detektion des Beuteproteins analysiert. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

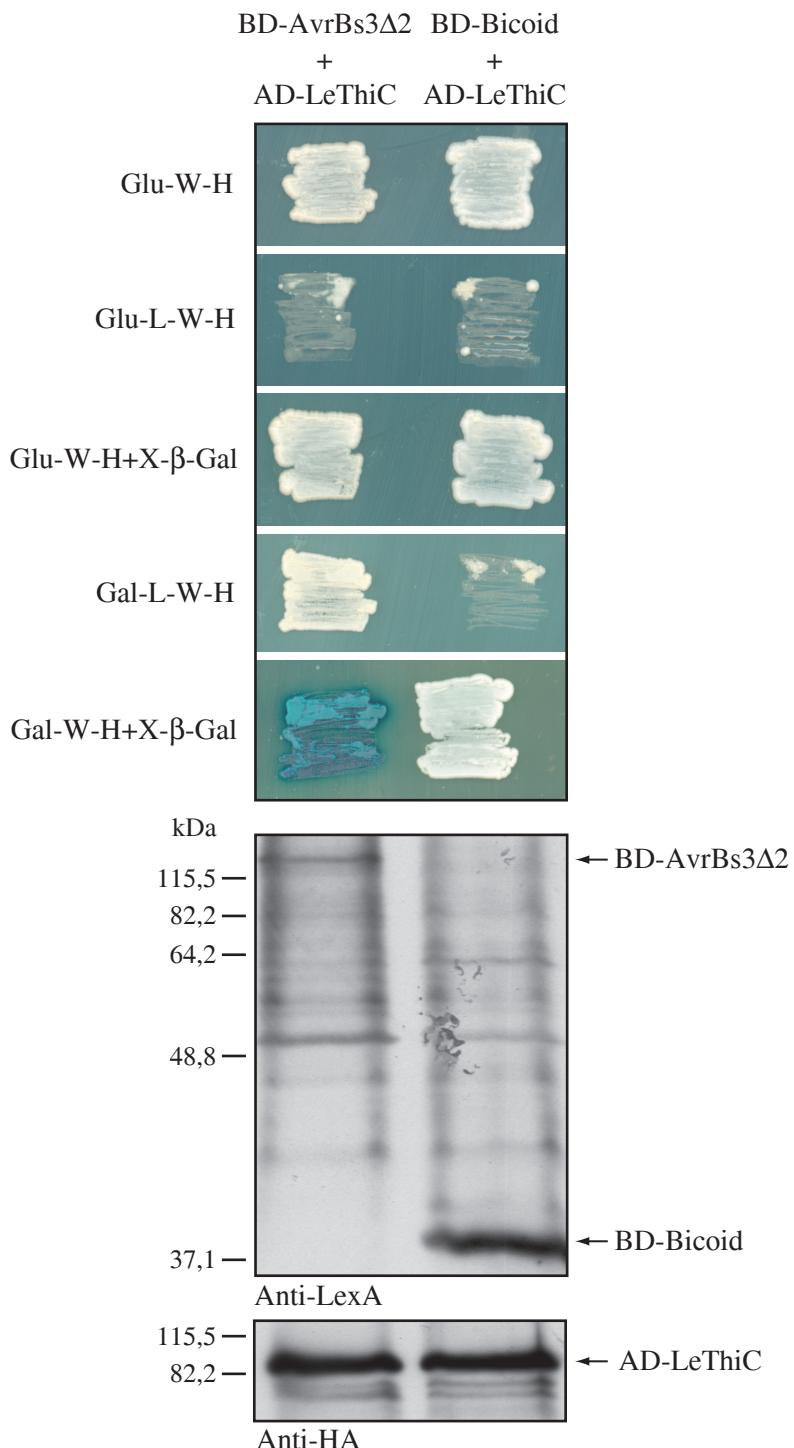


Abbildung 33: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3Δ2 im „interaction trap“-System.

Das Beuteplasmid pJCLLeThiC wurde in den Hefestamm EGY48(pSH18-34), welcher das Köderplasmid pYBavrBs3Δ2 enthielt, sowie in EGY48(pSH18-34), welcher pYBbicoid enthielten, transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsplatten ohne Histidin und Tryptophan (-W-H), auf Selektivmedium ohne Leucin (-L) und auf Medium mit Leucin und X-β-Gal (+ X-β-Gal) ausgestrichen. Gesamtproteinextrakte der Hefestämme wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot mit Anti-LexA- bzw. Anti-HA-Antikörper analysiert. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

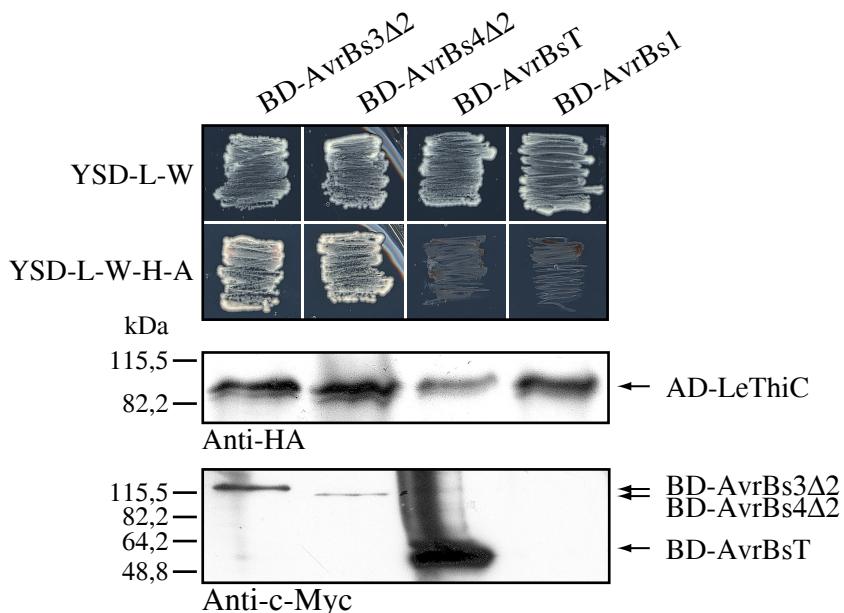


Abbildung 34: LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Familie.

Das Beuteplasmid pGADT7attLeThiC wurde in die Hefestämme AH109(pGBKT7LamC), AH109(pGBKT7avrBs3 Δ 2), AH109(pGBKT7avrBs4 Δ 2), AH109(pGBKT7attavrBs1) und AH109(pGBKT7attavrBsT) transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan (YSD-L-W) und auf Selektivmedium ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin (YSD-L-W-A-H) ausgestrichen. Gesamtproteinextrakte der Hefestämme wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot unter Verwendung eines Anti-HA-Antikörpers bzw. eines Anti-c-Myc-Antikörpers analysiert. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

3.2.3.8. LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Effektor-Familie

In einem nächsten Experiment sollte die Spezifität der Interaktion von AvrBs3 mit LeThiC überprüft werden. Dafür wurden die Effektorogene *avrBs1*, *avrBsT* und *avrBs4* aus *Xcv* mit *LeThiC* in Hefe koexprimiert und auf Induktion der Reportergene *ADE2* und *HIS3* getestet. AvrBs1 weist keine Homologie zu bekannten Proteinen auf, *avrBsT* kodiert eine putative Cysteinprotease und AvrBs4 ist ein Mitglied der AvrBs3-Familie.

Transformanten, welche AD-LeThiC und gleichzeitig BD-AvrBs1 oder BD-AvrBsT synthetisierten, zeigten keine Aktivierung der Reportergene (Abbildung 34). Dies zeigt, dass LeThiC in Hefe nicht mit den Effektorproteinen AvrBs1 und AvrBsT interagiert. Hefezellen, welche AD-LeThiC und BD-AvrBs4 Δ 2 synthetisierten, zeigten dagegen eine Adenin- und Histidinprototrophie, was auf eine Interaktion der Fusionsproteine hinweist (Abbildung 34). Westernblotanalysen bestätigten die Synthese von BD-AvrBs3, BD-AvrBs4 und BD-AvrBsT in Hefe. Das BD-AvrBs1-Protein konnte nicht detektiert werden,

wurde jedoch erfolgreich in Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen verwendet (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Dies deutet auf eine geringe Expression des *BDavrBs1*-Gens hin, wodurch die Detektion mittels Westernblot erschwert werden könnte.

Zusammenfassend legen die Resultate den Schluss nahe, dass LeThiC spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Familie interagiert.

3.2.3.9. LeThiC ist im Zytoplasma lokalisiert

Nachdem gezeigt wurde, dass LeThiC spezifisch mit AvrBs3 und AvrBs4 in Hefe interagiert, sollte LeThiC sowie dessen Interaktion mit AvrBs3 in der Pflanzenzelle untersucht werden. Verschiedene, durchgeführte Analysen *in silico* lieferten unterschiedliche Ergebnisse für die Lokalisierung von LeThiC. Daher wurden zunächst Lokalisierungsstudien mittels *Agrobacterium* vermittelter Expression von *LeThiC* in *N. benthamiana* durchgeführt. Dafür wurde LeThiC sowohl an den N- als auch den C-Terminus von YFP und CFP fusioniert. Westernblotanalysen bestätigten, dass YFP-LeThiC und CFP-LeThiC in *N. benthamiana* stabil synthetisiert werden (Abbildung 35). Mittels Fluoreszensmikroskop wurde sowohl YFP-LeThiC als auch CFP-LeThiC im Zytoplasma der Pflanzenzellen detektiert (Abbildung 35). Dabei waren die Fusionsproteine von den in diesen Zellen enthaltenen Zellkernen ausgeschlossen (Abbildung 35). Es wurden außerdem die Fusionen *LeThiC-YFP* und *LeThiC-CFP* erstellt. Nach Infektion von *N. benthamiana* mit den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen konnten die Fusionsproteine jedoch weder mikroskopisch noch immunologisch detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

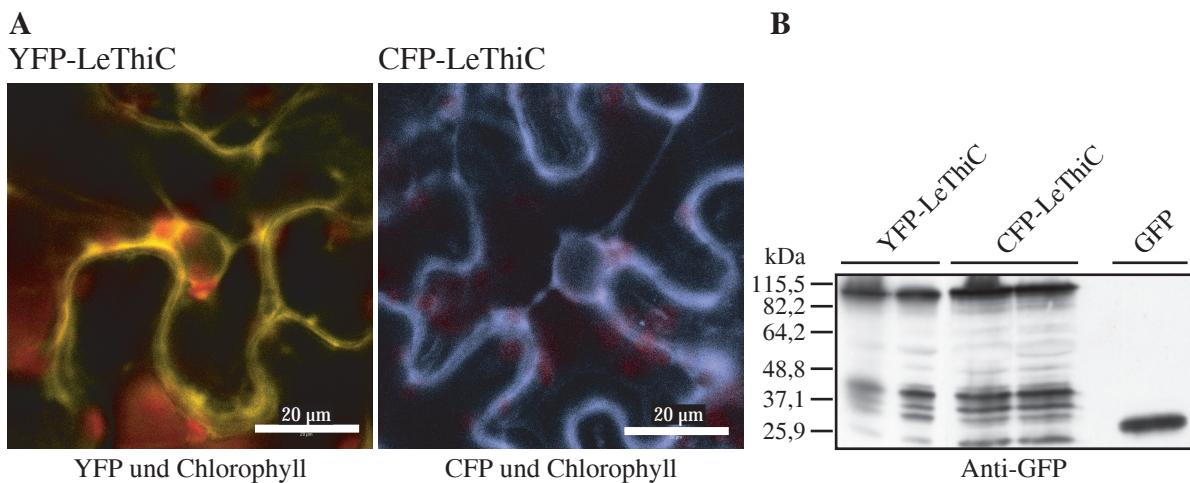


Abbildung 35: LeThiC ist im Zytosplasma von Pflanzenzellen lokalisiert.

Für Lokalisierungsstudien von LeThiC wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58CI(p19) mit dem Stamm GV3101(YFP-LeThiC) bzw. GV3101(CFP-LeThiC) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Blattmaterial wurde 48 Stunden nach Infektion geerntet und mit Hilfe des konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops mit spezifischen Filtern für EYFP und ECFP ausgewertet (A). 10µl Gesamtproteinextrakt von je zwei unabhängigen Blattproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem Anti-GFP-Antikörper inkubiert (B). Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

3.2.3.10. Interagiert AvrBs3 mit LeThiC in planta?

Wie zuvor gezeigt wurde, lokalisieren fluoreszierende AvrBs3-Fusionsproteine in Zellkerne von Pflanzenzellen. Der AvrBs3-Interaktor LeThiC ist hingegen im Zytosplasma der Pflanzenzelle lokalisiert. AvrBs3 wird jedoch bei Infektion mit *Xcv* zunächst ins Zytosplasma von Pflanzenzellen injiziert. Eine Interaktion zwischen AvrBs3 und LeThiC könnte somit vor dem Kernimport erfolgen und LeThiC könnte dann im Komplex mit AvrBs3 in den Zellkern importiert werden.

Kolokalisieren AvrBs3 und LeThiC?

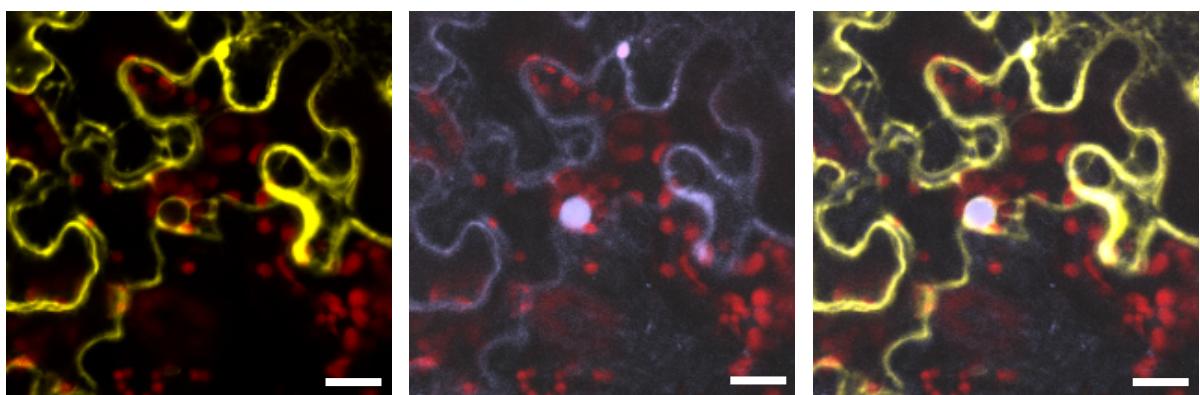
Um die Hypothese zu überprüfen, dass AvrBs3 mit LeThiC im Zytosplasma interagiert und in den Nukleus koimportiert wird, wurden Kolokalisierungsstudien mit CFP- und YFP-Fusionsproteinen durchgeführt. *CFP-avrBs3Δ2* und *YFP-LeThiC* wurden dafür in *N. benthamiana* vermittelt durch *Agrobacterium* koexprimiert. Fluoreszenzmikroskopische Studien 48 Stunden nach Infektion detektierten YFP nur im Zytosplasma der Pflanzenzelle, vergleichbar mit dem Kontrollexperiment, in welchem YFP-LeThiC allein in den

Pflanzenzellen synthetisiert wurde (Abbildung 36A und B). Dies weist darauf hin, dass YFP-LeThiC im Zytosol lokalisiert und nicht in den Zellkern importiert wird, wenn CFP-AvrBs3 in derselben Pflanzenzelle synthetisiert wird. Interessanterweise war das CFP-Signal des CFP-AvrBs3-Fusionsproteins jedoch nicht nur im Zellkern detektierbar wie im Kontrollansatz bei alleiniger Expression von *CFP-avrBs3*, sondern auch im Zytosol (Abbildung 36 A und C). Die Ergebnisse deuten an, dass ein Teil der AvrBs3-Moleküle im Zytosol zurückgehalten wurde, möglicherweise durch eine Interaktion mit YFP-LeThiC in diesem Kompartiment.

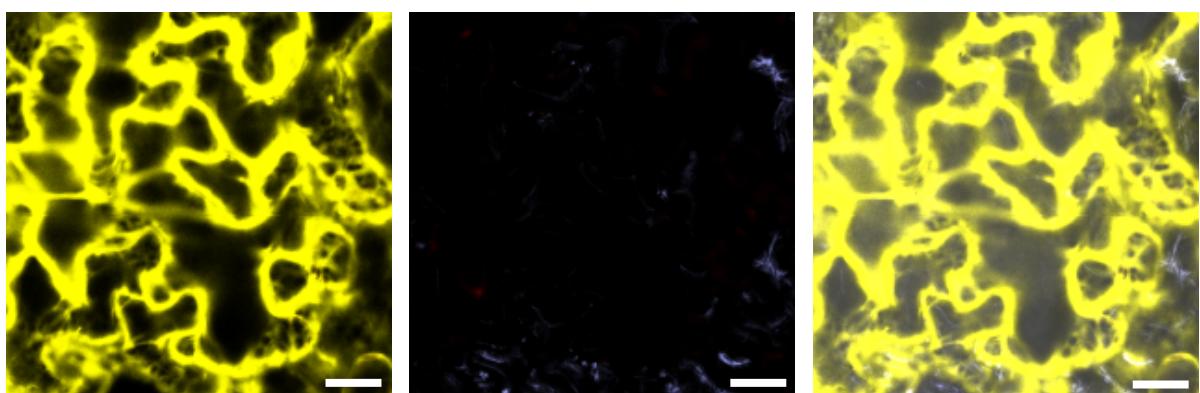
Da die Absorptions- und Emmissionsspektren von CFP und YFP überlappen (Abschnitt 2.7.3, Abbildung 12), könnte die Detektion von CFP im Zytosol aufgrund des stark synthetisierten YFP-LeThiC-Proteins ein falsch-positives Signal sein. Deshalb wurde das Pflanzenmaterial des Kontrollexperimentes, in welchem nur *YFP-LeThiC* exprimiert wurde, ebenfalls mit 458 nm (CFP-Anregungswellenlänge) angeregt. Es war jedoch in diesem Fall, trotz sehr starker *YFP-LeThiC*-Expression keine CFP-Emmission detektierbar (Abbildung 36B). Auch zeigten die Pflanzenzellen, in welchem nur *CFP-avrBs3* exprimiert wurde, kein vergleichbares CFP-Signal im Zytosol, welches erwartet werden könnte, da die Proteinsynthese in diesem Kompartiment erfolgt (Abbildung 36C). Zusammenfassend deuten diese Resultate an, dass das erhaltene CFP-Signal im Zytosol während der Koexpression beider Gene tatsächlich von einer Interaktion von YFP-LeThiC mit CFP-AvrBs3 herrührt.

Um die beschriebene technische Problematik bei Verwendung von zwei fluoreszierenden Proteinen zu umgehen, wurde das Experiment mit einem nicht-fluoreszierenden Interaktionspartner wiederholt. Dafür wurde LeThiC translational an das FLAG-Epitop fusioniert und anschließend mit *CFP-avrBs3Δ2*, *YFP-avrBs3Δ2*, *avrBs3Δ2-CFP* oder *avrBs3Δ2-YFP* in *N. benthamiana* koexprimiert. In Kontrollansätzen wurden außerdem alle verwendeten Fusionen allein exprimiert. Wie in Abbildung 37 exemplarisch für eine Kombination gezeigt, wurde bei Koexpression von *LeThiC-FLAG* mit *avrBs3Δ2*-Fusionen kein verstärktes Fluoreszenzsignal für die AvrBs3-Fusionsproteine im Zytosol im Vergleich zur Einzelexpression der *avrBs3*-Konstrukte beobachtet. Westernblotanalysen zeigten, dass sowohl die AvrBs3-Fusionen als auch LeThiC-FLAG in den untersuchten Pflanzengeweben in vergleichbaren Mengen synthetisiert wurden (Abbildung 37D). Zusammenfassend kann demnach bisher nicht eindeutig gesagt werden, ob LeThiC tatsächlich mit AvrBs3 *in planta* interagiert.

A: CFP-AvrBs3Δ2+YFP-ThiC



B: YFP-ThiC



C: CFP-AvrBs3Δ2

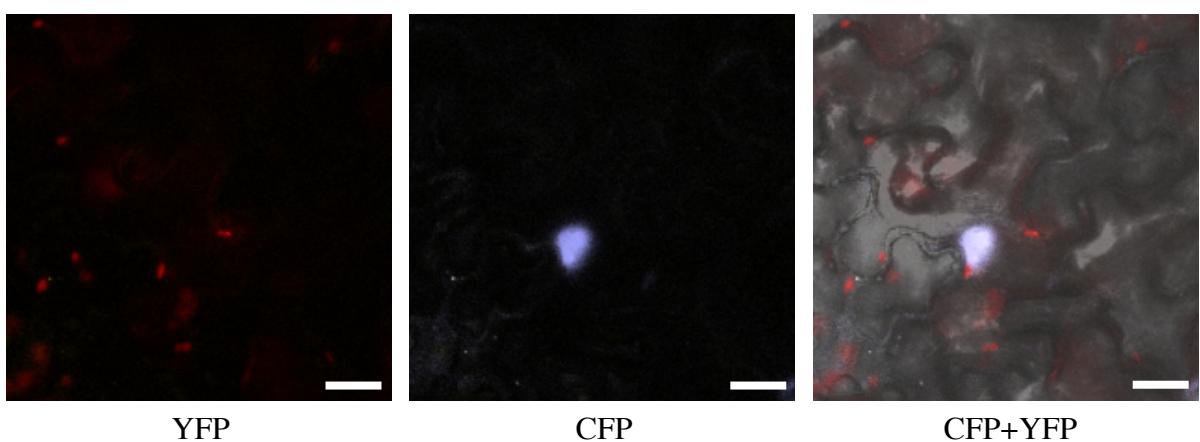
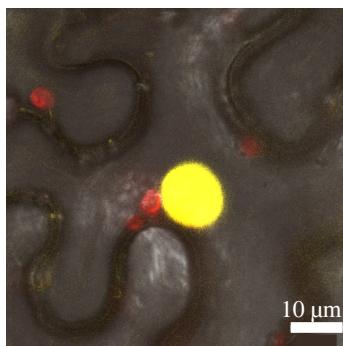


Abbildung 36: Kolokalisieren AvrBs3Δ2 und LeThiC in Pflanzenzellen?

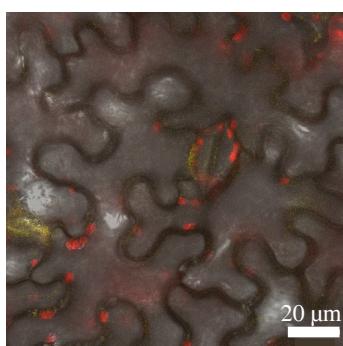
Für Kolokalisierungsstudien mit LeThiC und AvrBs3Δ2 wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58CI(pBin6Ip19) mit den Stämmen (A) GV3101(YFP-LeThiC) und GV3101(avrBs3Δ2-CFP); (B) GV3101(pBI4.1) und GV3101(YFP-LeThiC) bzw. (C) GV3101(pBI4.1) und GV3101(avrBs3Δ2-CFP) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. 48 h nach Infektion wurde Blattmaterial geerntet und mit Hilfe eines konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops mit spezifischen Filtern für EYFP und ECFP ausgewertet. Rot: Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Chloroplasten. Das Experiment wurde wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden. Die Balken entsprechen 20 µm.

Ergebnisse

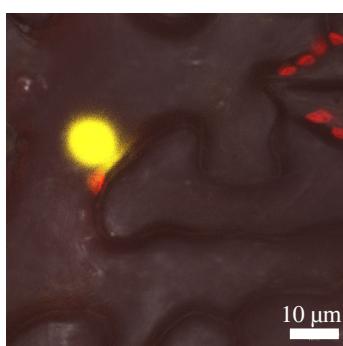
A YFP-AvrBs3Δ2



B FLAG-LeThiC



C YFP-AvrBs3Δ2 + FLAG-LeThiC



D

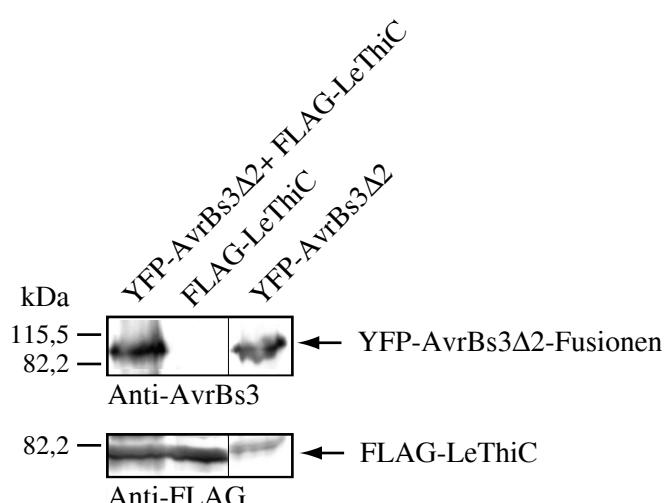


Abbildung 37: LeThiC-FLAG bewirkt keine Retardierung von YFP-AvrBs3 im Zytosapton von Pflanzenzellen.

Für Kolokalisierungsstudien mit FLAG-LeThiC und fluoreszierenden AvrBs3Δ2-Fusionsproteinen wurden der *A. tumefaciens*-Stamm C58CI(pBin6Ip19) mit den Stämmen (**A**) GV3101(pBI4.1) und GV3101(*YFP-avrBs3Δ2*), (**B**) GV3101 (pBI4.1) und GV3101(*FLAG-LeThiC*) und (**C**) GV3101 (*YFP-avrBs3Δ2*) und GV3101(*FLAG-LeThiC*) gemischt und in *N. benthamiana*-Blätter mit einer relativen OD₆₀₀ von 0,33 je Stamm infiltriert. 48 h nach Infiltration wurde Blattmaterial geerntet und mit Hilfe des konfokalen Laser-Fluoreszenz-Mikroskops und spezifischen Filtern für EYFP und ECFP ausgewertet. Rot: Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Chloroplasten. Gesamtprotein-Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Westernblots unter Verwendung von Anti-AvrBs3- bzw. Anti-FLAG-Antikörpern analysiert.

Untersuchung der LeThiC-AvrBs3-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation

Da die Kolokalisierungsstudien die Frage nach der Interaktion in der Pflanzenzelle nicht schlüssig beantworten konnten, wurden Konstrukte von LeThiC für BiFC-Analysen erstellt. Hierbei stand mit der zuvor gezeigten AvrBs3Δ2-CaIMPa1-Interaktion eine Positivkontrolle zur Verfügung. *LeThiC-YFP_N* und *Caimpα1-YFP_N* wurden transient mittels *Agrobacterium* mit *YFP_C-avrBs3Δ2* in *N. benthamiana* koexprimiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen, welche *YFP_C-AvrBs3Δ2* und *CaIMPa1*

YFP_N enthielten, ergaben erwartungsgemäß gelb-fluoreszierende Zellkerne (Daten nicht gezeigt). Wurden LeThiC-YFP_N und YFP_C-AvrBs3Δ2 in derselben Zelle synthetisiert, konnte jedoch kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die Anzahl der AvrBs3Δ2-LeThiC-Komplexe, welche sich im Zytoplasma gebildet haben könnten, zu gering ist, um detektiert zu werden, wurde in einem parallelen Ansatz ein AvrBs3-NLS-Deletionsderivat verwendet, welches nicht in den Zellkern importiert wird. Dafür wurden *YFP_C-avrBs3Δ2ΔNLS* und *LeThiC-YFP_N* in einer Pflanzenzelle exprimiert. Während fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurden jedoch keine YFP-Signale detektiert (Daten nicht gezeigt). Westernblotanalysen bestätigten die Synthese der Fusionsproteine in der Pflanze (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen eines Fluoreszenzsignals in beiden Ansätzen weist darauf hin, dass zumindest mit den verwendeten Fusionsproteinen keine Interaktion von AvrBs3Δ2 und LeThiC *in planta* mittels BiFC nachgewiesen werden kann.

3.2.3.11. Interagiert LeThiC mit AvrBs3 *in vitro*?

In einem weiteren Ansatz sollte geprüft werden, ob die in Hefe beobachtete Interaktion zwischen AvrBs3Δ2 und LeThiC *in vitro* mittels GST-„pull-down“-Experimenten bestätigt werden kann. Die bereits gezeigte *in vitro*-Interaktion von GST-CaIMPα1 und AvrBs3Δ2-FLAG diente dabei als Positivkontrolle.

GST, GST-CaIMPα1, GST-LeThiC und AvrBs3Δ2-FLAG wurden dafür in *E. coli* synthetisiert. Das Lysat, welches das GST-Protein (GST, GST-CaIMPα1 bzw. GST-LeThiC) enthielt, wurde mit dem Lysat *avrBs3Δ2-FLAG* exprimierender Bakterien gemischt und zu Glutathion-Sepharose gegeben. Gebundene Proteine wurden mit reduziertem Glutathion eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Inkubation des Westernblots mit Anti-GST-Antikörper zeigte, dass GST, GST-CaIMPα1 und GST-LeThiC an Glutathion-Sepharose gebunden waren (Daten nicht gezeigt). Der spezifische Anti-AvrBs3-Antikörper detektierte jedoch nur in den Ansätzen gebundenes AvrBs3-Protein, in welchen GST-CaIMPα1 an der Sepharose immobilisiert war (Daten nicht gezeigt).

Es erfolgte ein weiteres GST-„pull-down“-Experiment unter Zugabe von DTT vor der Lyse der Bakterien. In Westernblotanalysen konnte AvrBs3Δ2-FLAG erwartungsgemäß im Eluat mit GST-CaIMPα1 detektiert werden (Abbildung 38). AvrBs3Δ2-FLAG wurde

außerdem in dem Eluat mit GST-LeThiC nachgewiesen (Abbildung 38). Die Interaktion zwischen AvrBs3 Δ 2 und GST-LeThiC war schwächer als mit GST-CaIMPa1, jedoch nicht unspezifisch, wie das fehlende AvrBs3 Δ 2-Signal im Eluat mit GST zeigt (Abbildung 38). Die Westernblotanalysen mit Anti-GST-Antikörper zeigten aber auch, dass eine größere Menge an GST-CaIMPa1 an die Sepharose gebunden hatte als GST-LeThiC, wodurch das schwächere AvrBs3-Signal in den GST-LeThiC enthaltenden Eluaten erklärt werden könnte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zugabe von DTT die Detektion einer Interaktion von AvrBs3 Δ 2 und LeThiC *in vitro* ermöglichte.

Vor weiteren Untersuchungen mittels GST-„pull-down“- und KoIP-Experimenten wurde zunächst untersucht, ob die in Hefe beobachtete Interaktion für das Pathogen tatsächlich von Bedeutung ist.

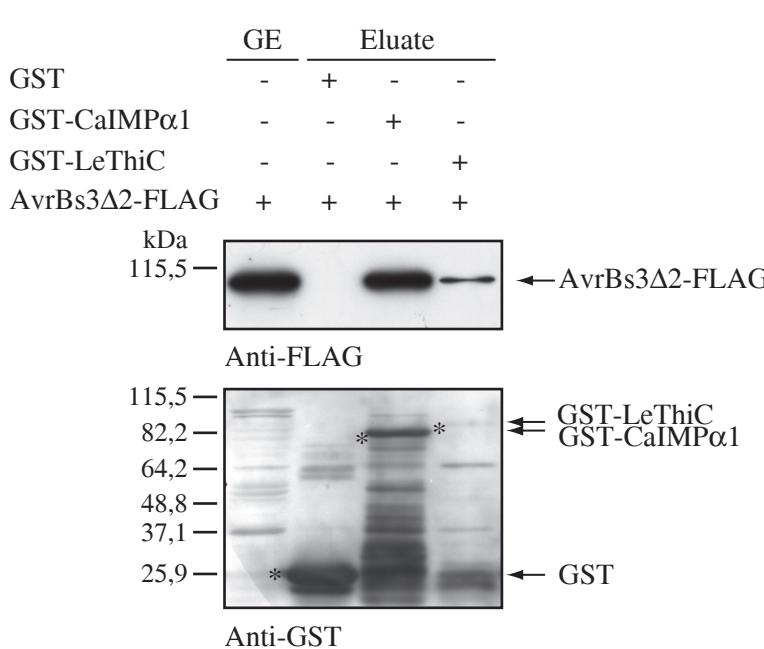


Abbildung 38: AvrBs3 Δ 2 und LeThiC interagieren *in vitro*.

Die Interaktion von AvrBs3 und LeThiC wurde mittels GST-„pull-down“-Experiment untersucht. Das Lysat eines *E. coli*-Stammes, welcher AvrBs3 Δ 2-FLAG synthetisierte wurde mit Lysaten von *E. coli*-Stämmen, welche GST, GST-CaIMPa1 bzw. GST-LeThiC synthetisierten und Glutathionsepharose inkubiert. 5 µl der Gesamtextrakte (GE) und 10 µl der Eluate wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und unter Verwendung von Anti-FLAG- und Anti-GST-Antikörpern mittels Westernblot analysiert.

3.2.3.12. Untersuchung der biologischen Bedeutung der AvrBs3-LeThiC-Interaktion

Die Bedeutung der AvrBs3-Interaktion mit LeThiC in der Pflanze wurde vorwiegend in heterologen Ansätzen mit *N. benthamiana* untersucht, da diese Pflanzen sowohl für die Überexpression als auch für das „Silencing“ von Genen sehr gut geeignet sind. Es erfolgten ebenfalls Untersuchungen in der Wirtspflanze Paprika.

LeThiC wurde zunächst mit und ohne Epitop transient in *N. benthamiana* und Paprika mittels *Agrobacterium* exprimiert. Dies führte jedoch zu keiner makroskopisch sichtbaren Reaktion (Daten nicht gezeigt). Auch die Koexpression mit AvrBs3 resultierte nicht in einer Verstärkung oder Verminderung der durch AvrBs3 induzierten Hypertrophie und HR (Daten nicht gezeigt).

Da die Überexpression von *LeThiC* keinen Aufschluss über mögliche Einflüsse von LeThiC auf die Wirkungsweise von AvrBs3 gaben, wurde Virus induziertes Gen-„Silencing“ mit Hilfe des Tabak rattle virus (TRV) in *N. benthamiana*-Pflanzen durchgeführt, um die Transkriptmenge homologer Gene von *LeThiC* zu reduzieren (siehe auch Abschnitt 28.).

Für die „Silencing“-Experimente wurde ein 520 bp langes Fragment von *LeThiC* in den VIGS-Vektor TRV2a kloniert (siehe Abschnitt 2 und Anhang 2) und das resultierende Plasmid pYL279aThiCVIGS in *A. tumefaciens* transformiert. Für Kontrollansätze wurden außerdem die Plasmide TRV2aNbPDS_{VIGS} und TRV2aGFP_{VIGS} in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert, welche ein cDNA-Fragment des Photoendesaturase-Gens aus *N. benthamiana* bzw. ein cDNA-Fragment des GFP-Gens aus der Qualle *Aequorea victoria* enthalten. Um das „Silencing“ in den Pflanzen durchzuführen, wurden die erhaltenen Transformanten mit dem *Agrobacterium*-Stamm GV3101(TRV1), welcher das RNA1-Konstrukt für die Synthese des viralen Hüllproteins enthielt, gemischt. Die Mischungen wurden anschließend in je fünf *N. benthamiana* infiltriert. Eine Pflanze wurde mit *Agrobacterium*-Stämmen infiltriert, welche zur Assemblierung von Viren mit einem Fragment des NbPDS-Gens führten, um das „Silencing“ zu visualisieren. Die Verwendung des GFP-„Silencing“-Konstruktes diente der Untersuchung eines möglichen Virus spezifischen Effektes, da in diesen Pflanzen Viren gebildet werden, jedoch aufgrund des Fehlens eines homologen GFP-Gens in *N. benthamiana* und *C. annuum* kein „Silencing“ erfolgt.

Silencing von *LeThiC*-Homologen in *N. benthamiana*

Um den Einfluss von ThiC auf die Entwicklung der Hypertrophie-Symptome zu untersuchen, erfolgte das „Silencing“ zunächst in *N. benthamiana*-Pflanzen. Zuerst wurde das Wachstum der Virus infizierten Pflanzen beobachtet. Dabei wurden die Phänotypen dieser Pflanzen mit unbehandelten Pflanzen verglichen sowie mit Pflanzen, welche mit

Ergebnisse

Viren infiziert wurden, die Fragmente des *NbPDS*- oder *GFP*-Gens enthielten. Pflanzen, die ein aktives Virus enthielten, wiesen ein leicht reduziertes Wachstum im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen auf (Abbildung 39). Pflanzen, in welchen die enthaltene Virus-DNA für Teile des *GFP* kodierte, zeigten keinen weiteren „Silencing“-Effekt. Blätter von Pflanzen, in denen ein Silencing des *NbPDS*-Gens erfolgte, waren 14 Tage nach Beginn des Experimentes beinahe vollkommen ausgeblieben. Dieser Phänotyp diente als Indikator für den Zeitpunkt, an welchem das „Silencing“ eines Gens in *N. benthamiana* erfolgt.

Interessanterweise zeigten alle Pflanzen, in welchen das TRV ein Fragment des *LeThiC*-Gens enthielt, ebenfalls ein Ausbleichen der Laubblätter. Die Blätter waren jedoch hellgrün und daher verschieden von den weißen Blättern, in welchem *NbPDS* stillgelegt wurde. Ähnlich war jedoch, dass in beiden Fällen neue grüne Blätter wuchsen und erst dann ein Ausbleichen erfolgte (Abbildung 39).

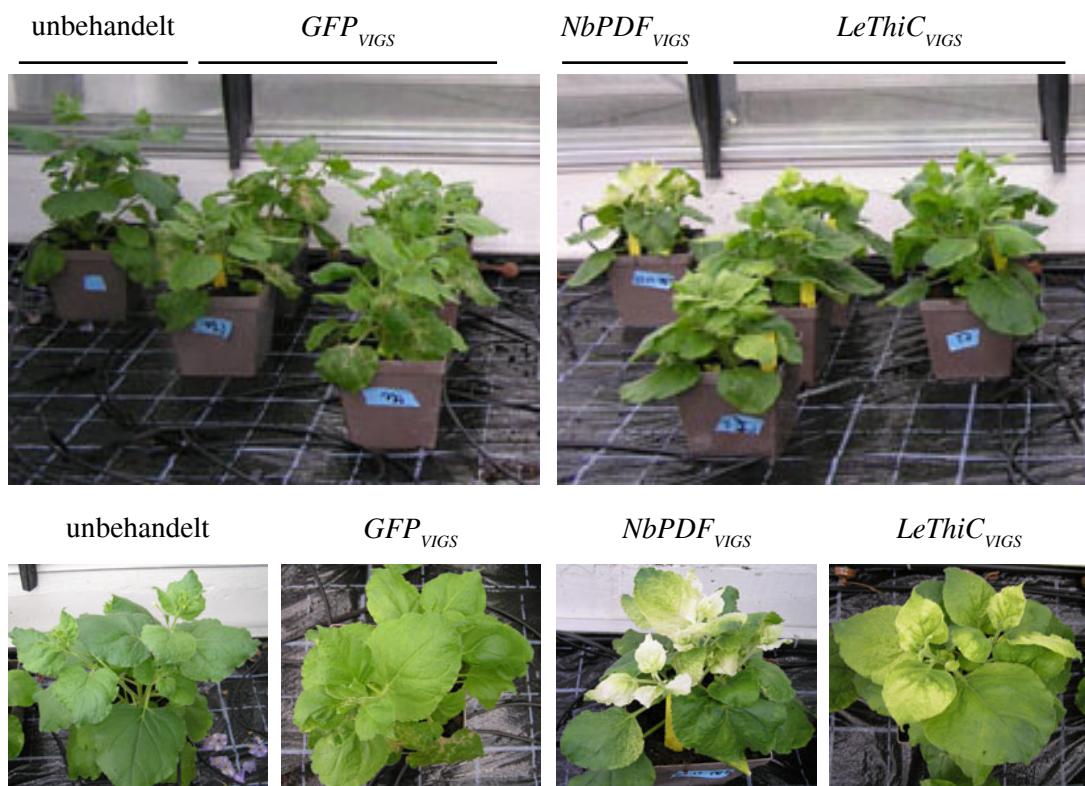


Abbildung 39: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von *LeThiC*-Homologen in *N. benthamiana*.

Der *Agrobacterium*-Stamm GV3101(TRV1) wurde mit den Stämmen GV3101(pYL279aGFP_{VIGS}), GV3101(pYL279aNbPDS_{VIGS}) bzw. GV3101(pYL279aLeThiC_{VIGS}) im Verhältnis 1:1 gemischt und in *N. benthamiana* infiltriert. Drei Wochen nach Infektion wurden die Pflanzen fotografiert, um Veränderungen des Phänotyps infizierter Pflanzen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen (unbehandelt) zu dokumentieren. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf Pflanzen für GFP_{VIGS} und $ThiC_{VIGS}$, einer Pflanze für PDS_{VIGS} und einer unbehandelten Pflanze wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

Der beobachtete veränderte Phänotyp der Virus infizierten Pflanzen zeigt, dass das „Silencing“ vermutlich erfolgt war. Um die Auswirkung eines fehlenden ThiC-Proteins in den Pflanzen auf die Funktion von AvrBs3 zu bestimmen, wurden *Agrobacterium*-Stämme infiltriert, welche kein Gen, *avrBs3* oder *avrBs3ΔAD* auf der T-DNA enthielten. In Wildtyp-*N. benthamiana*-Pflanzen führte die Expression von *avrBs3*, wie erwartet, zur Induktion der Hypertrophie. AvrBs3ΔAD, in welchem die AD fehlt, induzierte keine Hypertrophie. Die Verwendung des leeren Vektors diente als zusätzliche Negativkontrolle. Die Reaktionen der Pflanzen wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen nach Infektion mit *Agrobacterium* beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass die spezifisch durch AvrBs3 induzierte Hypertrophie in allen Pflanzen vergleichbar war, unabhängig davon, ob kein „Silencing“ oder „Silencing“ mit Fragmenten für *NbPDS* bzw. *LeThiC* erfolgt war. Das Experiment wurde viermal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Silencing von *LeThiC*-Homologen in Paprika

Die oben beschriebenen *Agrobacterium*-Stämme wurden auch verwendet, um „Silencing“-Experimente mit *C. annuum* cv. ECW-10R durchzuführen. Diese Pflanzen enthalten das Resistenzgen *Bs1*, welches die Erkennung des Effektors AvrBs1 vermittelt. AvrBs3 löst in diesen Pflanzen eine Hypertrophie aus. In Paprika ist die *Agrobacterium*-Infektion allerdings weniger effektiv, so dass das „Silencing“ von *NbPDS* zu geringeren Effekten führte als in *N. benthamiana*. Die Blätter blieben relativ grün und sind vor allem nahe den Blattadern ausgeblieben, durch welche sich das Virus bewegt (Daten nicht gezeigt). Da Paprika eine Wirtspflanze für *Xcv* ist, konnte AvrBs3 auf natürliche Weise in die Pflanzenzelle injiziert werden. Eine, zwei und drei Wochen nach erfolgtem „Silencing“ wurden die Pflanzen mit *Xcv*-Stämmen, welche *avrBs1* exprimierten, infiltriert. 1-2 Tage später konnte eine vollständig ausgeprägte, *Bs1* vermittelte HR in allen Pflanzen beobachtet werden. ThiC und PDS scheinen somit keinen Einfluss auf die Ausprägung der *Bs1*-HR zu haben. Der AvrBs3-translozierende *Xcv*-Stamm 82-8 induzierte in allen Pflanzen eine Hypertrophie. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Pflanzen und Paprika-Pflanzen in denen ein „Silencing“ von *ThiC* erfolgen sollte, festgestellt. Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten somit keine offensichtliche biologische Rolle für die AvrBs3-ThiC-Interaktion festgestellt werden.

Ergebnisse

Interessanterweise wurden fünf Wochen nach der *Xcv*-Inokulation signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Pflanzen festgestellt. Die infizierten Blätter der unbehandelten Wildtyp-Pflanzen waren vollkommen braun, trocken, tot und bereits von der Pflanze gefallen. Mit *Xcv* infizierte Blätter an Pflanzen, die *GFP*- bzw. *NbPDS*-„Silencing“-Konstrukte enthielten, zeigten einen vergleichbaren Phänotyp. Die mit *Xcv* infiltrierten Blätter an Pflanzen, welche Viren mit *LeThiC*-Fragment enthielten, waren jedoch noch an der Pflanze, grün bis gelblich und nicht ausgetrocknet (Abbildung 40). Verglichen mit den Kontrollpflanzen war der beobachtete Phänotyp demnach spezifisch für die Pflanzen, in denen *ThiC* stillgelegt werden sollte. Dies deutet an, dass das „Silencing“ tatsächlich in Paprika erfolgte. Interessanterweise wurden solche Unterschiede nicht für Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen beobachtet, welche nach Infektion mit dem TRV mit *Agrobacterium* infiltriert worden waren (siehe oben).

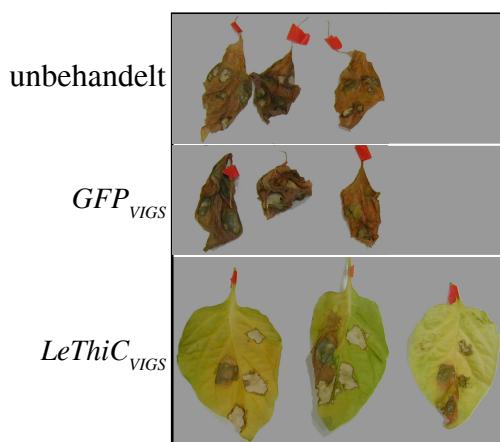


Abbildung 40: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von *LeThiC*-Homologen in *C. annuum* nach Infektion mit *Xcv*.

Für VIGS wurde der *Agrobacterium*-Stamm GV3101(TRV1) mit GV3101(TRV2aGFP_{VIGS}) bzw. GV3101(pYL279aLeThiC_{VIGS}) im Verhältnis 1:1 gemischt und in *C. annuum* cv. ECW-10R-Pflanzen infiltriert. Nach zwei Wochen wurden die *Xcv*-Stämme 82-8, welcher *avrBs3* enthält; *Xcv* 85-10, *Xcv* XAI74(*avrBs3*) und *Xcv* XAI74(*avrBs3*ΔAD), welche *avrBs1* enthalten, mit einer OD₆₀₀ von 0,4 je Stamm infiltriert. Die Blätter der Pflanzen wurden 5 Wochen nach *Xcv*-Infiltration fotografiert.

3.2.3.13. *LeThiC* ist an der Vitamin B1-Synthese in Pflanzen beteiligt

Im Folgenden wurde untersucht, ob das isolierte Gen *LeThiC* tatsächlich ein Enzym der Thiaminsynthese kodiert. Dafür erfolgten physiologische Komplementationstudien, wobei VIGS-Experimente, wie oben erläutert, durchgeführt wurden. Vier *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mittels *Agrobacterium* mit TRV infiziert, welche ein Fragment des *LeThiC*-Gens enthielten. Zwei dieser Pflanzen wurden jeden zweiten Tag mit einer Thiaminlösung gegossen, wohingegen die anderen zwei Pflanzen mit Pufferlösung behandelt wurden (Kontroll-Pflanzen). Wie in den „Silencing“-Experimenten zuvor beobachtet, blichen die Blätter dieser Kontroll-Pflanzen aus (Abbildung 41). Die Pflanzen

jedoch, welchen Vitamin B1 zugegeben wurde, zeigten gesunde, grüne Laubblätter wie unbehandelte Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 41). Die Vitamin B1-Behandlung hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp der Pflanzen, welche Viren mit Fragmenten für *NbPDS* bzw. *GFP* enthielten (Abbildung 41). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass LeThiC tatsächlich eine Rolle in der Vitamin B1-Synthese der Pflanze spielt.

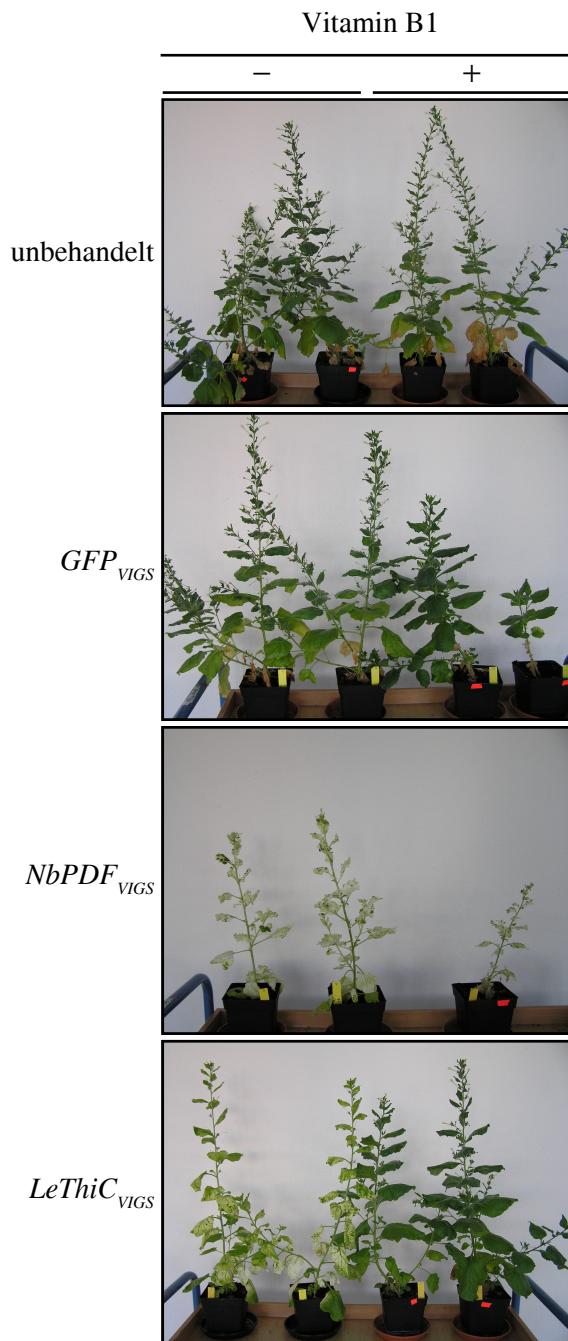


Abbildung 41: LeThiC ist an der Vitamin B1-Synthese beteiligt.

Die *Agrobacterium*-Stämme GV3101 (TRV2GFP_{VIGS}), GV3101(TRV2NbPDS_{VIGS}) und GV3101(TRV2LeThiC_{VIGS}) wurden mit GV3101 (TRV1) im Verhältnis 1:1 gemischt und mit einer relativen OD₆₀₀ von 0,3 in je vier 3 Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Zur Kontrolle wurden vier unbehandelte Pflanzen gleichen Alters mitgeführt. Je Ansatz wurden zwei Pflanzen jeden zweiten Tag mit 50 ml Natriumphosphat-Pufferlösung (-) gegossen und zwei Pflanzen mit 50 ml einer 20 mM Thiamin-Lösung (+). Die Pflanzen wurden 14 Wochen nach Beginn des Experiments fotografiert.

3.2.3.14. Verändert AvrBs3 den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzenzellen?

Die physiologischen Komplementationsanalysen legten nahe, dass LeThiC ein Thiamin-Biosynthese-Enzym ist. Nun konnte ein experimenteller Ansatz entwickelt werden, um die Frage zu klären, ob AvrBs3 einen Einfluss auf LeThiC hat und dadurch den Vitamin B1-Haushalt der Pflanze verändert. Mindestens zwei Möglichkeiten sind vorstellbar: (i) AvrBs3 interagiert mit LeThiC, um das Enzym zu aktivieren, oder (ii) die AvrBs3-Interaktion mit LeThiC führt zur Hemmung der Enzymaktivität und dadurch zur Inhibierung der Vitamin B1-Synthese.

Um diese Hypothesen zu prüfen, wurde der Vitamin B1-Gehalt von Pflanzenzellen, welche AvrBs3 enthalten mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) in Zusammenarbeit mit Dr. R. Kramell (IPB Halle) bestimmt.

Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Tomate, Paprika und Tabak

Vitamin B1 liegt in Pflanzenzellen als freies Thiamin (TF) sowie als Thiaminmonophosphat (TMP) und Thiamindiphosphat (TDP) vor. Um diese Verbindungen, welche in sehr geringen Mengen in der Zelle vorliegen, detektieren zu können, wurde Thiamin sowie dessen Derivate mittels $K_3[Fe(CN)]_6$ zu dem fluoreszierendem Produkt Thiochrom umgesetzt (Abschnitt 2.12, Abbildung 15).

Zunächst wurde das Trennverhalten der reinen Einzelverbindungen untersucht. Bei Verwendung eines Phosphat-Methanol-Gradienten (pH7,4) eluierte TF nach 3,5-3,7 min; TMP nach 4,9-6,2 min und TDP nach 6,1-8,8 min.

Nachfolgend wurde untersucht, ob Thiamin und dessen phosphorylierte Derivate auch in Tabak, Tomate und Paprika nachgewiesen werden können. Dafür wurde Blattmaterial von vier Wochen alten Pflanzen geerntet und die Thiamin-Verbindungen extrahiert. Proteine wurden entfernt und Thiamin-Verbindungen zu Thiochrom-Produkten umgesetzt. Mittels HPLC konnten sowohl TF als auch TMP und TDP in Pflanzenextrakten von Tomate, Paprika und Tabak nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Untersuchung des Einflusses von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt von Pflanzen

Um zu klären, ob AvrBs3 den Vitamin B1-Gehalt beeinflusst, wurden Tomaten-Pflanzen mittels Vakuum mit *Agrobacterium* GV3101(*avrBs3*) infiltriert. In Kontroll-Ansätzen erfolgte die Infiltration mit Infiltrationsmedium, *Agrobacterium* GV3101(pBI1.4), GV3101(*avrBs3ΔSphI*) und GV3101(*uidA*). AvrBs3ΔSphI enthält keine „Repeats“ und interagiert in Hefe nicht mit LeThiC (Abschnitt 3.1.2.5.5., Abbildung 29). 18 Stunden nach Infiltration wurde Pflanzenmaterial für die HPLC-Analyse geerntet. Verglichen mit den Standard-Verbindungen konnten TF, TMP und TDP in allen Pflanzen nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Menge aller drei Verbindungen in der *avrBs3*-exprimierenden Pflanze im Vergleich zu den Kontrollpflanzen reduziert (Abbildung 42A). Ein vergleichbares Experiment wurde auch mit Paprikapflanzen durchgeführt. Hierbei wurden Pflanzen mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(pBI4.1) bzw. GV3101(*avrBs3*) mittels Vakuum infiltriert. Die Extrakte der *avrBs3* exprimierenden Pflanze wiesen auch in diesem Experiment weniger Thiamin-Verbindungen auf als Extrakte der Pflanze ohne Effektoren-Expression (Abbildung 42B).

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass AvrBs3 eine Abnahme der Thiaminkonzentration bewirkt. Dies impliziert eine hemmende Wirkung für AvrBs3 auf das Thiaminbiosynthese-Enzym C.

In nachfolgenden Experimenten wurde jedoch auch festgestellt, dass der Thiamin-Gehalt in verschiedenen Pflanzen gleicher Art und gleichen Alters schwanken kann. Um eine statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können, wurden daher beide zu vergleichenden *Agrobacterium*-Stämme nebeneinander in ein Blatt infiltriert. Da für die HPLC-Analysen größere Mengen an Pflanzenmaterial notwendig sind, wurde dafür mit *N. benthamiana*-Pflanzen gearbeitet, welche sich großflächig durch einmaliges Aufsetzen einer nadellosen Spritze infiltrieren lassen. Die *Agrobacterium*-Stämme GV3101(pBI1.4) und GV3101(*avrBs3*) wurden in sechs Blätter einer Tabakpflanze nebeneinander infiltriert. Nach 18 Stunden wurde das Blattmaterial geerntet und Pflanzenextrakte hergestellt. Mit den Pflanzenextrakten wurden anschließend jeweils drei unabhängige Reaktionen zur Herstellung der Thiochrom-Verbindungen durchgeführt und diese auf die HPLC-Säule gegeben. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. In beiden Experimenten wurde in Extrakten von *avrBs3*-exprimierem Gewebe geringere Mengen an TF, TMP und TDP gemessen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Werte beider Experimente herangezogen und statistische Tests durchgeführt. Diese ergaben, dass sich die Mengen an

TF, TMP und TDP in Blattbereichen, welche *avrBs3* exprimierten signifikant von den gemessenen Thiamin-Mengen in AvrBs3 freien Pflanzenteilen unterscheiden (Anhang 3). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass AvrBs3 das Thiaminbiosynthese-Enzym C aus *N. benthamiana* hemmt (Abbildung 42C).

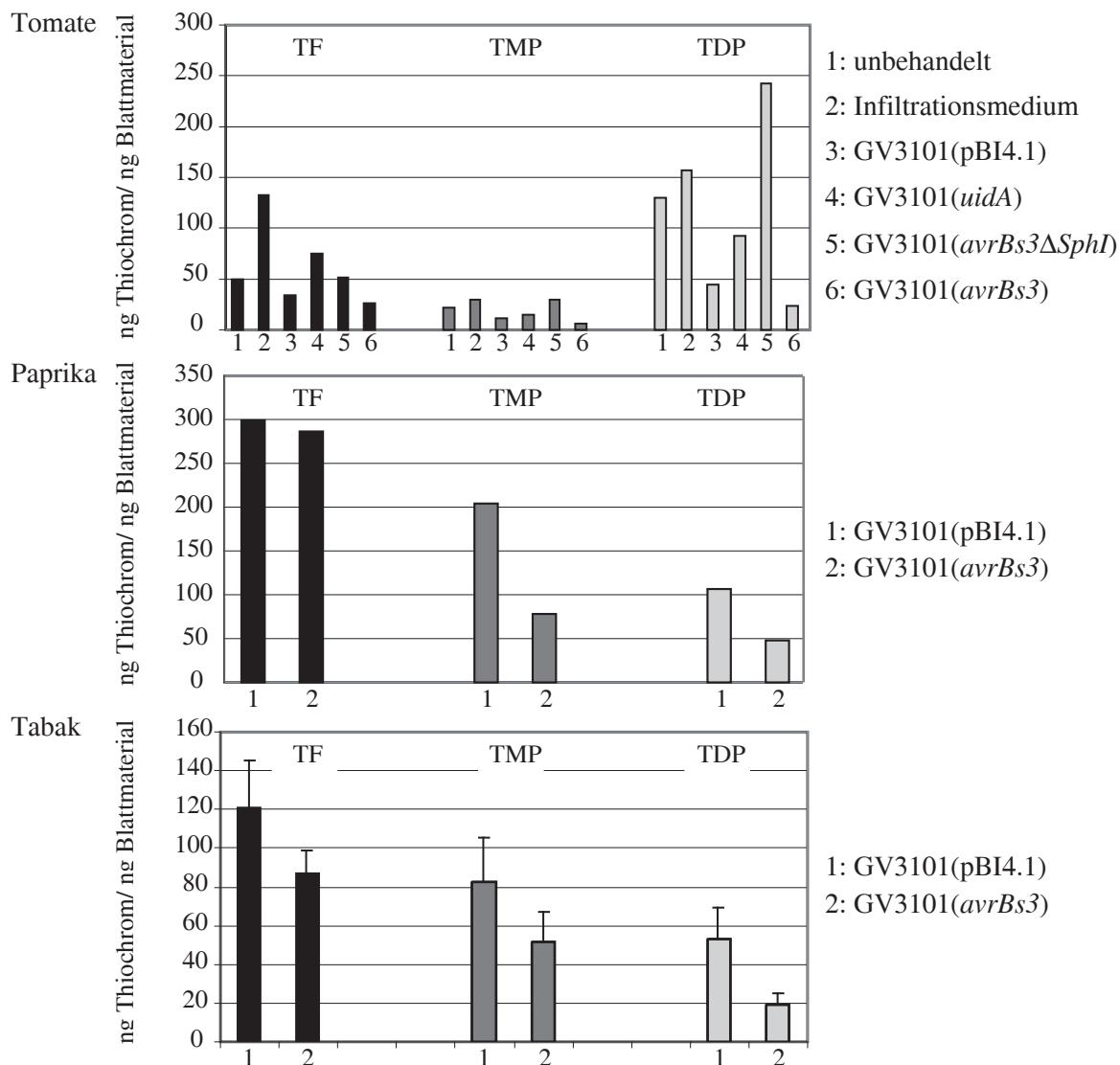


Abbildung 42: Einfluss von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzen.

4 Wochen alte *L. esculentum*- bzw. *C. annuum*-Pflanzen wurden mittels Vakuum mit *Agrobacterium*-Stämmen, wie angegeben, mit einer OD₆₀₀ von 0,6 infiltriert. Blätter von 6 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mittels Spritze mit den angegebenen *Agrobacterium*-Stämmen infiltriert. 18 Stunden nach Infiltration wurde Blattmaterial geerntet, Thiamin (TF), Thiaminmonophosphat (TMP) und Thiamindiphosphat (TDP) extrahiert, zu Thiochrom-Verbindungen umgesetzt und mittels HPLC aufgetrennt. Bei Verwendung von Tomaten- und Paprikapflanzen repräsentiert ein Balken eine Pflanze. In *N. benthamiana*-Pflanzen wurden die angegebenen *Agrobacterium*-Stämme in sechs Blätter jeweils nebeneinander infiltriert. Die Balken entsprechen den Mittelwerten der gemessenen Konzentrationen an TF, TMP und TDP von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistischen Tests sind in Anhang 3 aufgeführt.

3.3. Ankunft des Effektors am Zielort: Suche nach kernlokalisierten AvrBs3-Interaktoren

3.3.1. Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3-LZ als Köder

Der Bestimmungsort von AvrBs3 ist der pflanzliche Zellkern, in welchem AvrBs3 die Expression bestimmter Pflanzengene induziert (221; S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Da AvrBs3 keine offensichtliche DNA-Bindedomäne enthält, wurde bisher angenommen, dass AvrBs3 mit Hilfe von Pflanzenproteinen innerhalb eines Proteinkomplexes die pflanzliche Genexpression moduliert. Wie oben beschrieben, wurde mit BD-AvrBs3Δ2 als Köder in Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen eine große Anzahl falsch positiver, bisher jedoch kein Pflanzenprotein identifiziert, welches im Kern lokalisiert. Die Untersuchungen zur Dimerisierung von AvrBs3 zeigten, dass das putative Leucin-Zipper-Motiv im C-Terminus des Effektors nicht an der Homodimerisierung beteiligt ist. In Pflanzen sind Transkriptionsregulatoren bekannt, die ein solches Leucin-Zipper-Motiv enthalten. Interessanterweise wird die Aktivität solcher bZIP-Proteine oft über deren Heterodimerisierung reguliert. Es wäre also denkbar, dass AvrBs3 über die putativen Leucin-Zipper-„Repeats“ mit pflanzlichen bZIP-Proteinen interagiert, um deren Aktivität zu beeinflussen. Für eine neue Hefe-Di-Hybrid-Sichtung wurde daher mit AvrBs3-LZ ein Köder-Konstrukt erstellt, welches die imperfekten Leucin-Zipper-„Repeats“ sowie die NLS-Region enthält, nicht aber die AD (Basenpaare 2425 bis 3397). Westernblotanalysen nach Transformation des Plasmides pGBT7avrBs3-LZ in die Hefestämme Y187 und AH109 bestätigten die Synthese des Köderproteins in beiden Hefestämmen (Abbildung 43).

Um zu prüfen, ob das Köderprotein BD-AvrBs3-LZ selbst die Reportergene *HIS3* und *ADE2* in Hefe bereits aktiviert, wurden die Transformanten des Stammes AH109 auf Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin ausgestrichen. Da die Hefezellen auf diesem Medium nicht wachsen konnten (Abbildung 43), zeigt BD-AvrBs3-LZ keine Autoaktivität und ist somit als Köder geeignet.

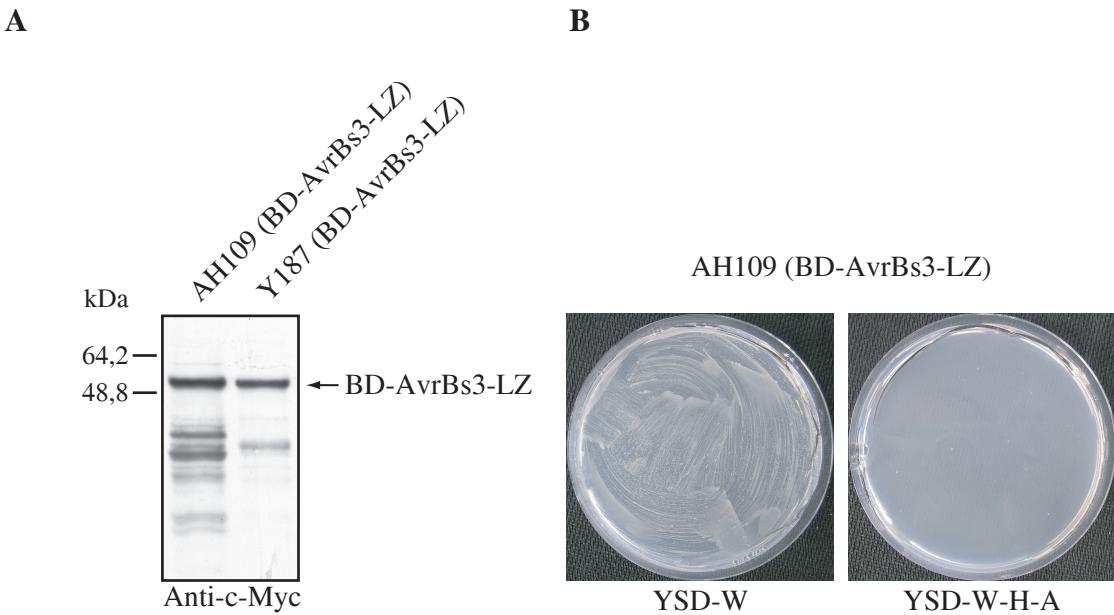


Abbildung 43: Überprüfung der Synthese und Transkriptionsaktivität des Köderproteins BD-AvrBs3-LZ in Hefe.

Die Hefestämme AH109 und Y187 wurden mit dem Köderplasmid pGBKT7avrBs3-LZ transformiert. Gesamtproteinextrakt der Transformanten wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot unter Verwendung eines Anti-c-Myc-Antikörpers analysiert (A). Der Hefestamm AH109(*avrBs3-LZ*), welcher die Reportergene *HIS3* und *ADE2* enthält, wurde auf Medium ohne Tryptophan (YSD-W) und auf Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin (YSD-W-H-A) ausplattiert. Die Auxotrophie des Stammes für Histidin und Adenin zeigt, dass BD-AvrBs3-LZ die Reportergene nicht aktiviert. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erhalten wurden.

Die bereits verwendete, mit zufällig generierten Oligonukleotiden erstellte cDNA-Bank von *L. esculentum* MM wurde mit BD-AvrBs3-LZ gesichtet. Bei einer Paarungseffizienz von 6,4% wurden $1,05 \times 10^6$ diploide Hefezellen gesichtet. 130 Hefekolonien wuchsen auf Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin und wurden nochmals auf Selektivmedium ausgestrichen. Sieben Klone aktivierten erneut die Reportergene und wurden als B6, C8, D7, F8, G3, G4 und H5 bezeichnet.

Anschließend wurde getestet, welche der drei Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* in den diploiden Hefezellen aktiviert werden. Die Induktion des *MEL1*-Reportergens wurde nicht untersucht, da dieses bereits durch das Köderprotein BD-AvrBs3-LZ aktiviert wird (Abbildung 44). Für die Untersuchung der neuen Interaktoren wurden die diploiden Zellen auf Medium ohne Adenin, Medium ohne Histidin sowie Medium, welches Adenin, Histidin und X- β -Gal enthielt, ausgestrichen. In allen sieben Hefeklonen wurden sowohl das *ADE2*-Gen als auch das *HIS3*-Gen und das *lacZ*-Gen aktiviert (Abbildung 44).

		BD-AvrBs3-LZ						
		+						
Untersuchtes Reportergen	-	AD-B6	AD-C8	AD-D7	AD-F8	AD-G3	AD-G4	AD-H5
	+							
<i>ADE2</i>								
<i>HIS3</i>								
<i>lacZ</i>								
<i>MEL1</i>		n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.

Abbildung 44: Untersuchung der Induktion der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* durch die Köder-Beute-Interaktionen.

Der Hefestamm AH109(pGBKT7avrBs3-LZ) sowie die isolierten diploiden Hefeklone wurden auf Selektionsmedium ohne Adenin und Medium ohne Histidin ausgestrichen, um die Induktion der Reportergene *ADE2* bzw. *HIS3* zu untersuchen. Die Hefezellen wurden außerdem auf Medium mit Adenin und Histidin ausgestrichen, um mittels Überschichtungsansatzes mit X- α -Gal auf Induktion des *MEL1*-Gens zu testen. Da das Köderprotein AvrBs3-LZ das *MEL1*-Reportergen autoaktivierte, wurden die identifizierten Hefeklone nicht auf Induktion des *MEL1*-Reporters untersucht (n.u.).

3.3.2. Untersuchung der AvrBs3-LZ-Interaktoren in Hefe

Zunächst wurde überprüft, ob die identifizierten Interaktoren reproduzierbar und spezifisch mit dem verwendeten Köderprotein in Hefe interagieren. Dafür wurden die Beuteplasmide isoliert, in frische Zellen des Stammes AH109 transformiert und mit dem Stamm Y187, welcher das Köderprotein BD-AvrBs3-LZ enthielt, gepaart. Die diploiden Transformanten wurden auf Selektivmedium ausgestrichen, um auf Aktivierung der Reportergene zu testen. Es zeigte sich, dass sechs der sieben untersuchten cDNA-Fragmente für Proteine kodieren, die reproduzierbar mit AvrBs3-LZ interagieren (Abbildung 45), wohingegen die Interaktion von B6 mit AvrBs3-LZ nicht reproduziert werden konnte.

Um die Spezifität der Interaktionen zu überprüfen, wurden die AH109-Stämme, welche die Beuteplasmide enthielten, auch mit dem *BD-laminC* exprimierenden Hefestamm Y187 gepaart. Nach Ausstreichen der diploiden Zellen auf Medium ohne Adenin und Histidin wuchsen nur Hefezellen, welche BD-LaminC und AD-F8 enthielten (Abbildung 45). Dies weist auf eine unspezifische Interaktion von F8 mit AvrBs3-LZ hin.

Insgesamt interagieren demnach fünf der sieben identifizierten Proteine (C8, D7, G3, G4, H5) reproduzierbar und spezifisch mit BD-AvrBs3-LZ in Hefe.

Nachfolgend wurde geprüft, ob die identifizierten Proteine auch mit AvrBs3Δ2 in Hefe interagieren. Dafür wurden die AH109-Stämme, welche die Beuteplasmide enthielten, mit dem Y187-Stamm gepaart, welcher *BD-avrBs3Δ2* exprimierte. Überraschenderweise wuchsen die resultierenden diploiden Zellen jedoch nicht auf Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin (Abbildung 45). Dieses Ergebnis zeigt, dass die identifizierten Beute-Proteine nicht mit dem Fusionsprotein BD-AvrBs3Δ2 in Hefe interagieren, obwohl dieses die Leucin-Zipper-„Repeats“ enthält.

3.3.3. Sequenzanalyse der identifizierten cDNA-Fragmente aus Tomate

In einem nächsten Schritt wurden die fünf isolierten cDNA-Fragmente, welche für spezifische AvrBs3-LZ-Interaktoren kodieren, sequenziert. Durch Sequenzvergleiche mit Einträgen der NCBI- und TIGR-Datenbank wurden drei Interaktorklassen ermittelt. Die G3-cDNA zeigte eine 76%ige Identität zu dem Enzym RubisCO. Dieses Protein wird häufig als Interaktor während Hefe-Di-Hybrid-Ansätzen isoliert und bindet vermutlich unspezifisch an AvrBs3-LZ. C8 und D7 sowie G4 und H5 wiesen jeweils identische Nukleotidsequenzen auf. Dabei zeigen C8 und D7 eine Identität von 84% zu einer reduzierenden Koenzym-F₄₂₀-Hydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (Aip7). G4 und H5 weisen eine 64%ige Identität zu dem Transkriptionsfaktor MERISTEM LAYER L1 aus *Arabidopsis thaliana* (ATML1, Aip8) auf. Die isolierte Aip8-cDNA enthält neben einer Homeoboxdomäne auch Leucin-Zipper-„Repeats“. Aip8 kodiert somit für einen sehr interessanten AvrBs3-Interaktor, welches in einem DNA-Protein-Komplex zur Induktion von Pflanzengenen führen könnte.

Die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Anja Raschke im Rahmen ihres Forschungspraktikums begonnen. Weiterführende Analysen, welche Aufschluss geben sollten, ob Aip7 und Aip8 tatsächlich für die Funktion von AvrBs3 bedeutsam sind, erfolgten in der Diplomarbeit von A. Raschke.

Ergebnisse

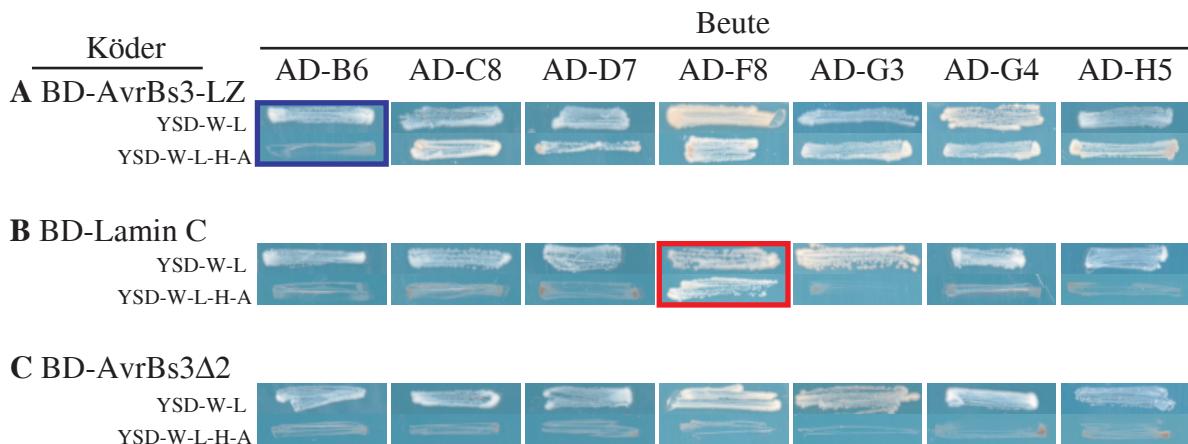


Abbildung 45: Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Spezifität der Interaktionen der identifizierten Proteine mit AvrBs3-LZ, Lamin C und AvrBs3Δ2 in Hefe.

Die aus Hefe isolierten Beuteplasmide pGADT7-Rec2B6, pGADT7-Rec2C8, pGADT7-Rec2D7, pGADT7-Rec2F8, pGADT7-Rec2G3, pGADT7-Rec2G4 und pGADT7-Rec2H5 wurden in den Stamm AH109 transformiert und mit den Hefestämmen (A) Y187(pGBKT7avrBs3-LZ), (B) Y187(pGBKT7lamC) und (C) Y187(pGBKT7avrBs3Δ2) gepaart. Die diploiden Zellen wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan (YSD-W-L) sowie auf Medium, welchem zusätzlich Adenin und Histidin fehlte (YSD-W-L-H-A) ausgestrichen. Die Hefen wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der Hefen ist indikativ für eine Interaktion der Köder- und Beuteproteine. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf unabhängigen Transformanten reproduziert. Hefetransformanten, welche nicht reproduzierbar interagierende (AD-B6, blau umrahmt) oder unspezifisch interagierende (AD-F8, rot umrahmt) Fusionsproteine enthalten sind hervorgehoben.

3.4. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus *Xcv*

3.4.1. Einführung und Vorarbeiten

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass AvrBs3 eine Hypertrophie des Mesophylls von suszeptiblen Pflanzen bewirkt, welche makroskopisch als Pustelbildung an der unteren Epidermis infizierter Blätter sichtbar ist (221). Dabei handelt es sich um eine Vergrößerung einzelner Zellen, eine Zellvermehrung erfolgt jedoch nicht. Auch die obere Epidermis ist aufgewölbt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob weitere sichtbare Pflanzenreaktionen durch AvrBs3 ausgelöst werden. Vergleichend erfolgte die Analyse der Effektorproteine AvrBs4 und AvrBs1 aus *Xcv*. AvrBs4, welches in Tomate, vermittelt durch das Resistenzgen *Bs4*, erkannt wird, ist ein Mitglied der AvrBs3-Familie und weist eine Identität von 97% zu AvrBs3 auf (45). Die Hauptunterschiede der Proteine liegen in der Anordnung der repetitiven Sequenzen, welche die Erkennungsspezifität in resistenten Pflanzen bestimmen (145). Außerdem sind im C-Terminus von AvrBs4 vier Aminosäuren im Vergleich zu AvrBs3 deletiert (45). Der Austausch der C-Termini von AvrBs3 und AvrBs4 bewirkt jedoch keine veränderte Erkennung der Effektoren (23). Obwohl beide Effektorproteine sehr ähnlich sind, induziert AvrBs4 keine makroskopisch sichtbare Hypertrophie in nicht-resistenten Pflanzen. Das *avrBs1*-Gen, dessen Produkt eine HR in resistenten Paprikapflanzen, die das *Bs1*-Gen tragen, auslöst, liegt auf dem 183 kb großen Plasmid pXcv183 des *Xcv*-Stammes 85-10 (321, 329). AvrBs1 zeigt geringe Ähnlichkeit zu dem Effektor AvrA aus *P. syringae* (244, 286).

Um mögliche Virulenzaktivitäten der Effektorproteine zu untersuchen, erfolgte eine transiente Expression von *avrBs1*, *avrBs3* und *avrBs4* unter Kontrolle des 35S-Promotors mittels *Agrobacterium* Stamm GV3101 in *Nicotiana benthamiana*. Als Kontrolle wurde *N. benthamiana* parallel auch mit Agrobakterien, die anstelle eines Effektorgens das *uidA*-Gen, welches für die β-Glucuronidase (GUS) kodiert, auf der T-DNA enthalten, infiziert.

3.4.2. AvrBs1 und AvrBs3 lösen Chlorosen in der Pflanze aus

avrBs1, *avrBs3*, *avrBs4* und *uidA* wurden in Blättern von *N. benthamiana*-Pflanzen exprimiert. Fünf Tage nach Inokulation der Agrobakterien wurde eine Aufwölbung der oberen Epidermis von Blattbereichen, welche AvrBs1 und AvrBs3 enthielten, beobachtet. AvrBs4 und GUS lösten hingegen keine Aufwölbung des Blattgewebes aus (Daten nicht gezeigt).

An der Unterseite des Blattbereiches, welcher mit *avrBs3* übertragenden Agrobakterien infiziert war, wurde eine Pustelbildung beobachtet. AvrBs1, AvrBs4 und GUS lösten keine Pusteln aus (Daten nicht gezeigt).

Gleichzeitig wurde beobachtet, dass AvrBs4 eine geringe Aufhellung des Blattgewebes verursachte, wohingegen AvrBs3 und AvrBs1 chlorotische Reaktionen induzierten. AvrBs1 löste außerdem Nekrosen aus. Bei Expression von *uidA* wurden weder Chlorosen noch Nekrosen beobachtet. Die festgestellten Reaktionen wurden somit spezifisch durch die analysierten Effektoren und nicht durch den *Agrobacterium*-Stamm ausgelöst (Abbildung 46).

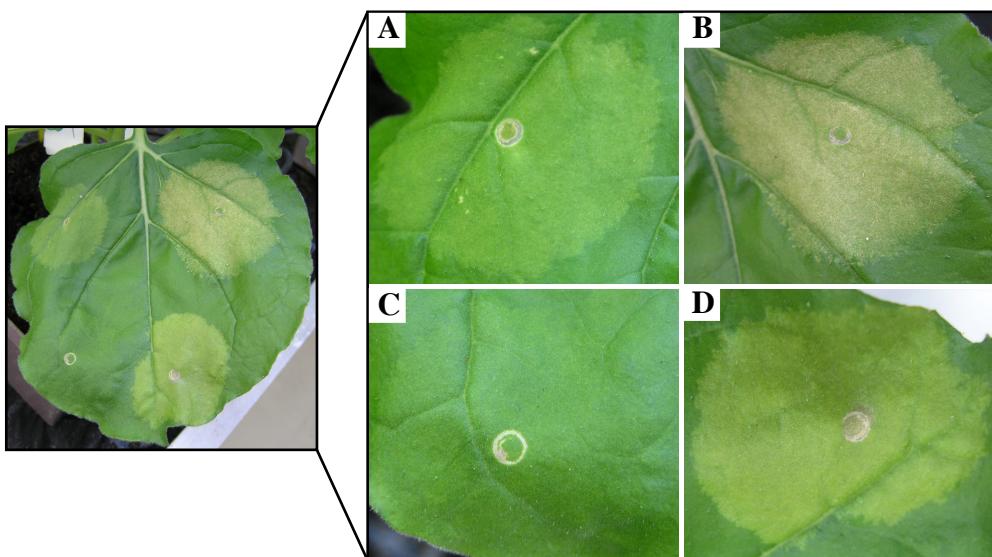


Abbildung 46: AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 lösen makroskopisch sichtbare Reaktionen in *N. benthamiana* aus.

Die *Agrobacterium*-Stämme (A) GV3101(*avrBs4*), (B) GV3101(*avrBs1*), (C) GV3101(*uidA*) und (D) GV3101(*avrBs3*) wurden in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert. Sieben Tage nach Infiltration wurden die Reaktionen auf der Blattoberseite fotografiert.

3.4.3. AvrBs1 verursacht eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen wie AvrBs3

Im Folgenden wurde mikroskopisch untersucht, ob AvrBs1 ähnliche Effekte auf Zellen des pflanzlichen Mesophyllgewebes hat wie AvrBs3. Dafür wurden *avrBs1*, *avrBs3*, *avrBs4* und *uidA* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Drei, vier und fünf Tage nach Infiltration erfolgten licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen in Kooperation mit Simone Jahn und Gerd Hause (Biozentrum der Universität Halle). Die Analysen zeigten, dass das Mesophyllgewebe, welches *uidA* exprimiert, dem Gewebe nicht-infiltrierter Blattbereiche gleicht. Alle analysierten Palisadenzellen enthielten lückenlos nebeneinander liegende Chloroplasten im Zytoplasmaraum. Die Interzellularräume im Mesophyllgewebe waren relativ groß (Abbildung 47A und B). Hingegen zeigte Gewebe, in welchem *avrBs3* exprimiert wurde, ähnlich den Vorarbeiten (221), stark vergrößerte Mesophyllzellen und dadurch stark verringerte Interzellularräume (Abbildung 47C). Speziell die Palisadenzellen waren im Vergleich zur Kontrolle verlängert und verbreitert.

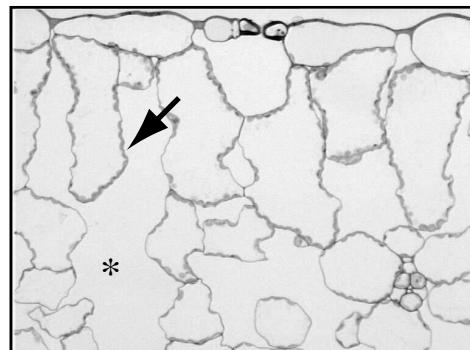
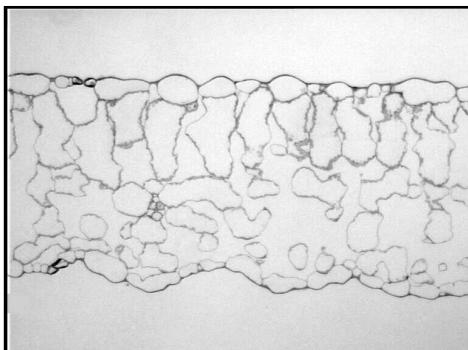
AvrBs1 bewirkte eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen wie AvrBs3 (Abbildung 47D). Die Zellen waren jedoch kaum verlängert, aber stark verbreitert, so dass der Interzellularraum zwischen den Palisadenzellen ebenfalls reduziert war.

Interessanterweise zeigten die mikroskopischen Analysen von Gewebeteilen, in denen das AvrBs3-homologe AvrBs4-Protein synthetisiert wurde, nur eine sehr geringfügige Vergrößerungen der Mesophyllzellen (Abbildung 47E).

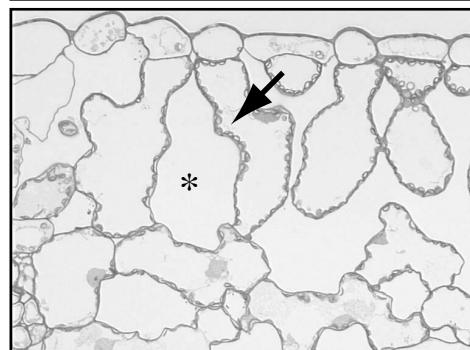
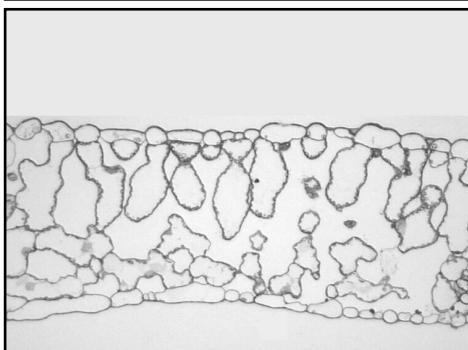
Es lässt sich zusammenfassen, dass AvrBs4, welches zu 97% identisch mit AvrBs3 ist, nur sehr geringe Zellvergrößerungen induziert. AvrBs1 hingegen, welches keinerlei Ähnlichkeit zu AvrBs3 aufweist, hat einen vergleichbaren Effekt auf die Wirtszelle wie AvrBs3. Dies zeigt, dass strukturell verschiedene Effektoren ähnliche Virulenzreaktionen in der Pflanze auslösen können. Es ist jedoch erwähnenswert, dass beide Reaktionen nicht identisch sind: Zellen, welche *avrBs3* exprimieren, sind doppelt so lang wie *avrBs1*-exprimierende Zellen (Abbildung 47, vergleiche C und D).

Ergebnisse

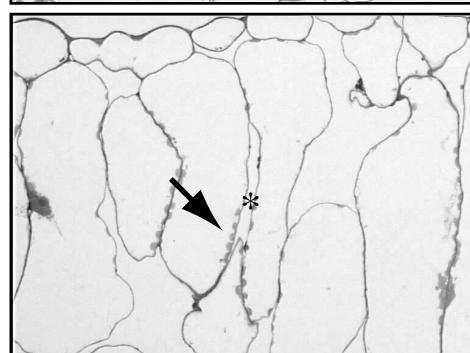
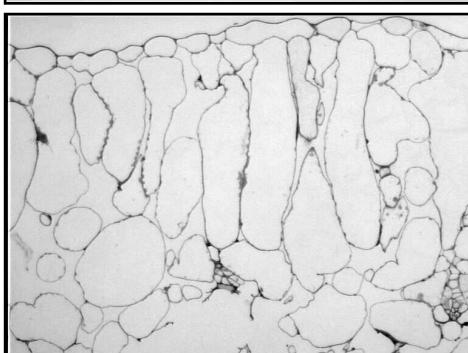
A: unbehandelt



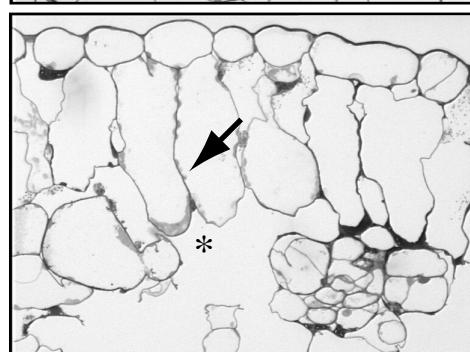
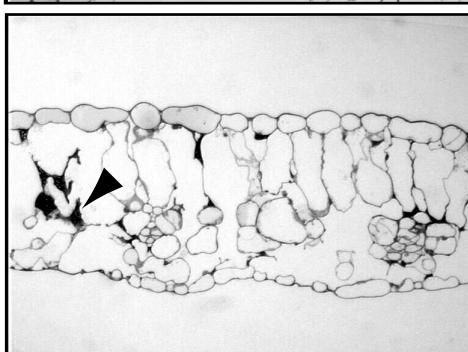
B: *uidA*



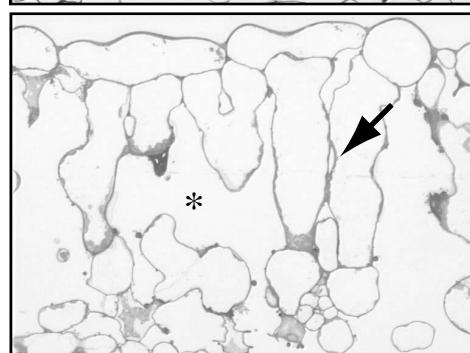
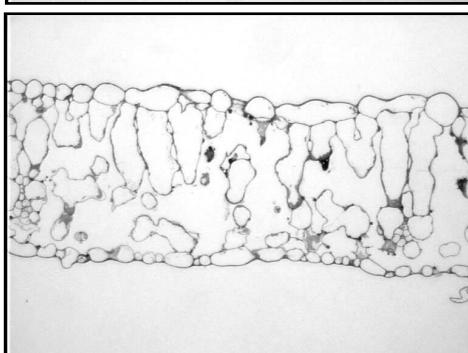
C: *avrBs3*



D: *avrBs1*



E: *avrBs4*



200 µm

50 µm

Abbildung 47: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen eine starke Veränderung der Morphologie von Mesophyllzellen.

N. benthamiana-Blätter wurden (A) nicht behandelt bzw. mit den *Agrobacterium*-Stämmen (B) GV3101(*uidA*), (C) GV3101(*avrBs3*), (D) GV3101(*avrBs1*) und (E) GV3101(*avrBs4*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde fünf Tage nach Infiltration lichtmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind zwei verschiedene Vergrößerungen. Die Balken beziehen sich auf A-E. E: Epidermis, P: Palisadengewebe, S: Schwammparenchym, L: Leitgewebe. Zellbereiche mit sichtbaren Chloroplasten sind mit einem schwarzen Pfeil, Interzellularräume mit schwarzem Stern und tote Zellen mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

3.4.4. Das Zellwachstum ist mit einer Vergrößerung der Vakuole verbunden

Wie in Abbildung 44 zu sehen, scheint die Vergrößerung der Mesophyllzellen nicht mit einer Vermehrung des Zytoplasmas, sondern mit einer Vergrößerung der Zentralvakuole verbunden zu sein. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurden bei mikroskopischen Untersuchungen von Mesophyllzellen von *N. benthamiana*, welche *avrBs1* oder *avrBs3* exprimieren, im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe oder *uidA* bzw. *avrBs4* exprimierenden Zellen Membranstrukturen innerhalb der Zentralvakuole beobachtet (Abbildung 48). Diese sind ein Indiz für eine erfolgende Vakuolisierung.

Zusätzlich wurde auch eine erhöhte Anzahl von Golgivesikeln beobachtet, welche vermutlich Bestandteile für die Zellwandsynthese liefern (Daten nicht gezeigt).

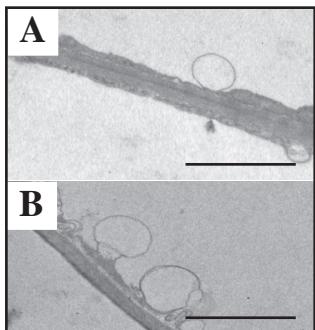


Abbildung 48: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen ein Wachstum der Zentralvakuole in der Pflanzenzelle.

N. benthamiana wurde mit den *Agrobacterium*-Stämmen (A) GV3101(*avrBs3*) und (B) GV3101(*avrBs1*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde 5 Tage nach Infektion geerntet und mittels Elektronenmikroskop analysiert. Die Membranstrukturen sind in der Vakuole sichtbar. Die Balken entsprechen 2 µm.

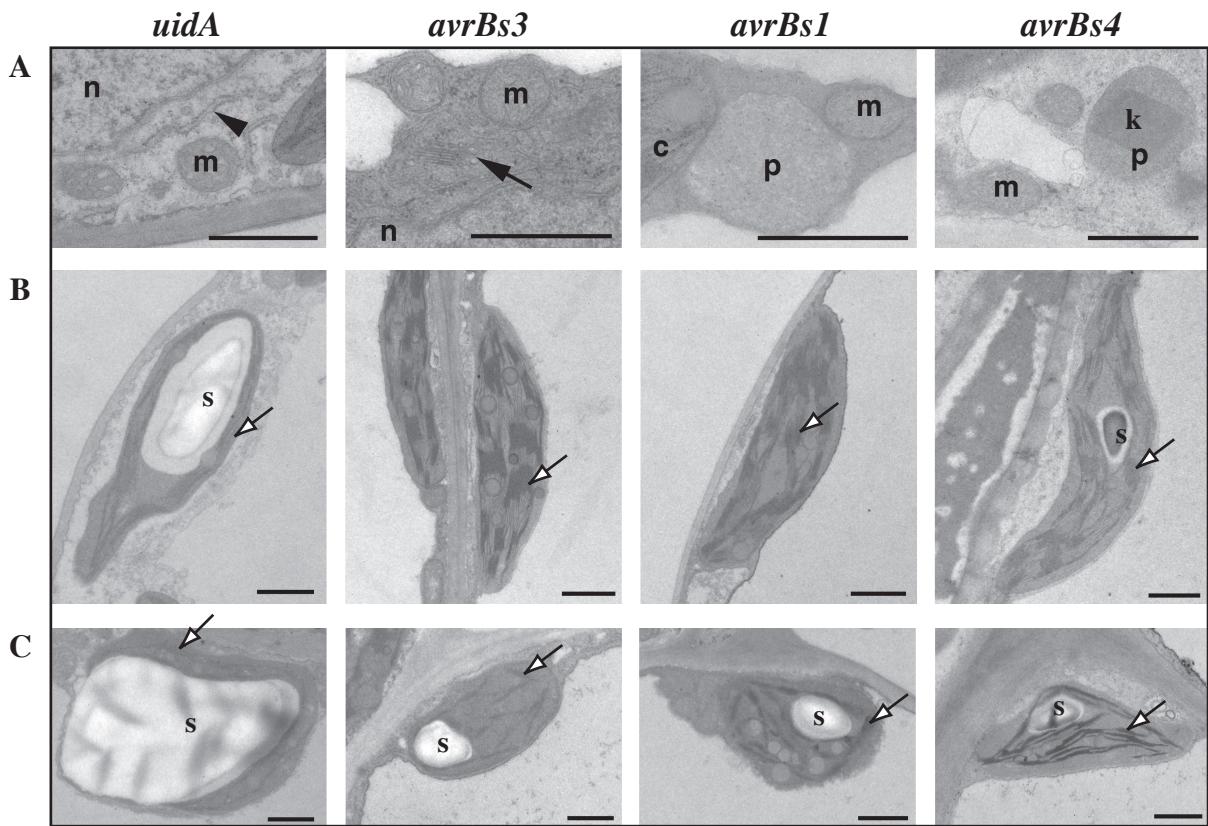


Abbildung 49: Einfluss von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Organellen von *N. benthamiana*-Zellen.

N. benthamiana wurde mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(*uidA*), GV3101(*avrBs3*), GV3101(*avrBs1*) und GV3101(*avrBs4*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde 5 Tage nach Infektion geerntet und elektronenmikroskopisch untersucht. (A) Ultrastruktur von Mitochondrien (m), Nukleii (n), Chloroplasten (c), Endoplasmatischem Retikulum (Pfeilkopf), Golgi-Apparat (schwarzer Pfeil) und Peroxisomen (p) in Mesophyllzellen, welche *uidA*, *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4* exprimieren. k: Kristall. (B) Chloroplasten von Mesophyllzellen, welche *uidA*, *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4* exprimieren. (C) Chloroplasten von Epidermiszellen, welche *uidA*, *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4* exprimieren. Weißer Pfeil kennzeichnet Thylakoidstapel. S: Stärkekorn. Die Balken entsprechen 1 µm.

3.4.5. Untersuchung des Einflusses von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Ultrastruktur der Organellen

Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben keine Veränderungen der Ultrastruktur von Chloroplasten, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endoplasmatischem Retikulum und Peroxisomen nach Expression von *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4* in den Pflanzenzellen im Vergleich zur Ultrastruktur dieser Organellen in *uidA* exprimierendem Gewebe, die auf Abbauprozesse hindeuten (Abbildung 49A). Die Ultrastruktur der untersuchten Organellen liefert demnach keine Hinweise auf einen Funktionsverlust der Organellen. In den

Chloroplasten *uidA* exprimierender Zellen sind weniger Thylakoidstapel sichtbar (Abbildung 49B). Dies könnte auf den erhöhten Stärkegehalt und die dadurch weniger benötigte Photosyntheseaktivität zurückzuführen sein. Chloroplasten in *avrBs3* oder *avrBs1* exprimierenden Zellen enthielten im Vergleich zu *uidA* oder *avrBs4* exprimierenden Zellen nur wenig oder keine Stärke (Abbildung 49B). Vermutlich wurde in den Zellen, welche *avrBs3* bzw. *avrBs1* exprimierten, in einem hohen Maße Energie für das Zellwachstum benötigt, so dass kaum Stärke gebildet und gespeichert werden konnte. Alle untersuchten Epidermiszellen enthielten Stärkekörper in den Chloroplasten, unabhängig davon, ob *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4* exprimiert wurde (Abbildung 49C). Übereinstimmend damit weisen Epidermiszellen keine Vergrößerung auf.

Während der elektronenmikroskopischen Studien wurden weder degenerierte noch teilungsaktive Plastiden beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 keine Veränderung der Chloroplastenzahl bewirken.

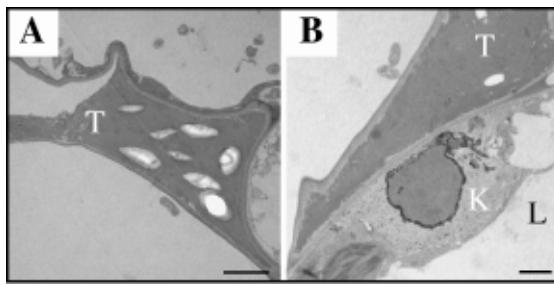


Abbildung 50: AvrBs1 induziert das Absterben von Mesophyllzellen in *N. benthamiana*.

N. benthamiana wurde mit dem Agrobacterium-Stamm GV3101(*avrBs1*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde 5 Tage nach Infektion geerntet und mittels Elektronenmikroskop untersucht. (A) Abgestorbene Zelle ohne Vakuole, mit Stärkekörnern. (B) Kalloseauflagerung (K) grenzt lebende Zelle (L) von toter Zelle (T) ab. Die Balken entsprechen 2 µm.

3.4.6. AvrBs1 induziert nekrotische Reaktionen im Pflanzengewebe

In den mikroskopischen Studien wurden in *avrBs1* exprimierendem Gewebe im Vergleich zu unbehandeltem oder *uidA* exprimierendem Gewebe reproduzierbar tote Zellen detektiert (Abbildung 47D und 50). Dieses Resultat stimmt mit den makroskopischen Beobachtungen überein, dass AvrBs1 nekrotische Reaktionen in pflanzlichem Gewebe hervorruft (Abbildung 46). Weiterhin wurde beobachtet, dass sich die intakten Zellen durch Kalloseauflagerung von den abgestorbenen Zellen abgrenzen (Abbildung 50B).

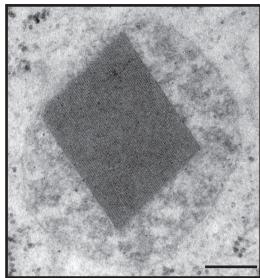


Abbildung 51: Die Expression von *avrBs4* in *N. benthamiana* verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in Peroxisomen von Mesophyllzellen.

N. benthamiana wurde mit dem *Agrobacterium*-Stamm GV3101(*avrBs4*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde 5 Tage nach Infektion geerntet und mittels Elektronenmikroskop untersucht. Die Abbildung zeigt ein Peroxisom mit Katalasekristall. Der Balken entspricht 2 µm.

3.4.7. AvrBs4 verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in den Peroxisomen

Die vergleichenden mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass interessanterweise alle Peroxisomen *avrBs4* exprimierender Zellen auffällige Kristallstrukturen aufwiesen (Abbildung 49A und 51). Diese Kristalle weisen auf eine hohe Konzentration des Katalaseproteins hin (106). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von *avrBs4* zu einer erhöhten Katalaseproduktion in den Mesophyllzellen führt.

3.4.8. AvrBs3 verursacht eine sichtbar erhöhte Transkriptionsaktivität in den Zellkernen

In den mikroskopischen Untersuchungen wurden auch die Zellkerne der transformierten Pflanzenzellen näher analysiert. Neben ultrastrukturellen Untersuchungen erfolgten morphometrische Analysen zur Größe der Zellkerne und Nukleoli. Hierzu wurde der Flächeninhalt von Kernen von Mesophyllzellen und der darin enthaltenen Nukleoli vermessen. Um die Vermessung peripherer Schnitte zu vermeiden, wurden nur Zellkerne analysiert, in denen ein Nukleolus im Schnitt sichtbar war.

Zellen, welche *uidA*, *avrBs1* oder *avrBs4* exprimierten, wiesen Nuklei vergleichbarer Größe auf wie Zellen unbehandelter Pflanzenteile (ca. 60-110 µm²). Die Durchschnittsgröße der Zellkerne in *avrBs3* exprimierenden Zellen war dagegen mit 160 µm² größer (Abbildung 52A und B). Besonders die Nukleoli der *avrBs3* exprimierenden Zellen waren mit 17 µm² signifikant größer als die 4 bis 9 µm² großen Nukleoli in un behandelten bzw. *uidA*, *avrBs4* und *avrBs1* exprimierenden Zellen (Abbildung 52A und C). Auffällig war, dass in 52% der untersuchten Zellkerne *avrBs3* exprimierender Zellen ein zentraler, hellerer Bereich in den Nukleoli sichtbar war. In Zellen, welche *avrBs1* oder *avrBs4* exprimierten, enthielten hingegen nur 6 bzw. 8,5% der Nukleoli einen solchen

Bereich, ähnlich wie in Zellen von unbehandeltem Gewebe (4,2%, Abbildung 52A und D). Bei diesen Bereichen handelt es sich um so genannte nukleoläre Vakuolen (120). Nukleoläre Vakuolen stellen jedoch keine von einem Tonoplasten umhüllte Vakuole dar, sondern sind ein strukturelles Indiz für eine starke Transkription der rRNA-Gene und somit ein Hinweis auf eine erhöhte Translationsaktivität in den Zellen (308). Die Ergebnisse deuten somit auf eine erhöhte Translation in AvrBs3 synthetisierender Zellen hin (308). Überraschenderweise wurden auch in 29% der Nukleoli *uidA* exprimierender Zellen nukleoläre Vakuolen detektiert (Abbildung 52). Dies legt den Schluss nahe, dass die Expression von *uidA* ebenfalls eine erhöhte Translationsaktivität bewirkt.

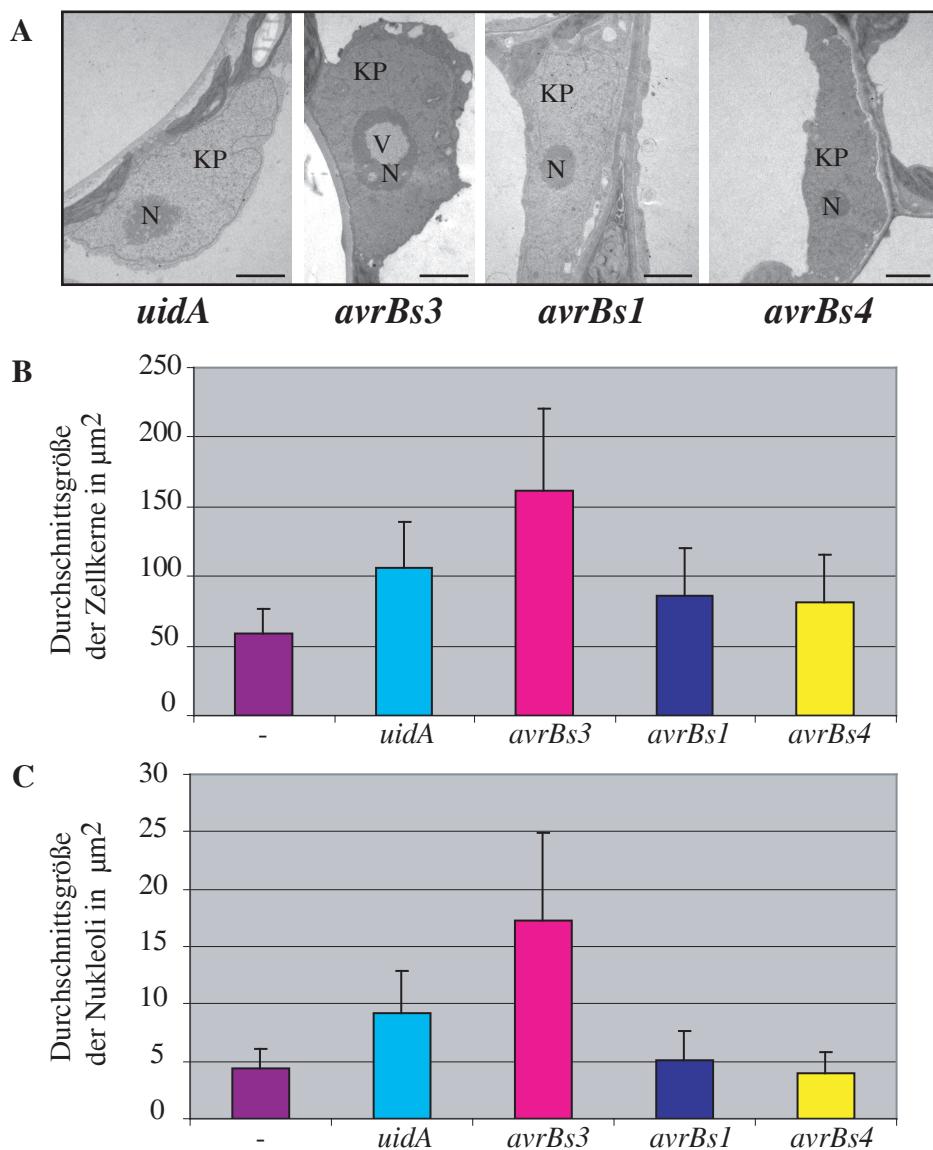


Abbildung 52: AvrBs3 verursacht eine erhöhte Aktivität in Zellkernen von Pflanzenzellen.

N. benthamiana wurde nicht bzw. mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(*uidA*), GV3101(*avrBs3*), GV3101(*avrBs1*) und GV3101(*avrBs4*) infiltriert. Das Blattmaterial wurde 5 Tage nach Infektion geerntet und je 69 Zellkerne lichtmikroskopisch untersucht und vermessen (**A**). KP: Kernplasma, N: Nukleolus, V: nukleolare Vakuole. Die Balken entsprechen 2 µm. Die Diagramme zeigen die durchschnittliche Größe der Zellkerne (**B**) und die durchschnittliche Größe der Nukleoli (**C**) in µm². Dargestellt sind Mittelwerte nach statistischem T-Test mit je 69 Messwerten. Die Standardabweichungen sind angegeben. Die durchgeführten statistischen Tests sind im Anhang aufgeführt.

3.4.9. AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR unterdrücken

Die durch AvrBs1 induzierte Zellvergrößerung sollte im Folgenden im natürlichen System überprüft werden. Dafür wurde der, das *avrBs1*-Gen tragende, jedoch langsam wachsende *Xcv*-Stamm I74A (ein Derivat von 85-10) in Paprikapflanzen infiltriert. In früheren Arbeiten wurden bereits Transkonjuganten dieses Stammes verwendet, um die durch AvrBs3 induzierte Hypertrophie auf Paprikablättern deutlicher zu visualisieren (221). Dabei wurde gezeigt, dass *Xcv* I74A(*avrBs3*) eine deutliche Pustelbildung in *C. annuum* cv. ECW verursacht, wohingegen *Xcv* I74A(*avrBs3ΔAD*) keine Pusteln induzierte (221). In dieser Arbeit wurden die gleichen Stämme in die *C. annuum*-Kulturvarietäten ECW, ECW-30R (*Bs3*) und ECW-10R (*Bs1*) infiltriert. Dabei zeigte sich, dass der *Xcv*-Stamm I74A(*avrBs3ΔAD*) einige Pusteln an der Oberfläche suszeptibler Paprikapflanzen der Kulturvarietät ECW auslöst (Abbildung 53). Diese könnten durch AvrBs1 verursacht worden sein. Überraschenderweise waren in ECW-30R-Pflanzen jedoch keine Pusteln sichtbar.

In *C. annuum* cv. ECW-10R sollten die verwendeten Stämme aufgrund der Expression und Translokation von AvrBs1 eine HR auslösen. Interessanterweise war die HR jedoch stark reduziert, wenn gleichzeitig AvrBs3 in die Pflanze transloziert wurde. Wie erwartet löste der *avrBs3* exprimierende Stamm in ECW eine Hypertrophie und in ECW-30R eine AvrBs3-spezifische HR aus. AvrBs3ΔAD induzierte erwartungsgemäß weder eine Hypertrophie noch eine HR. Diese Resultate deuten darauf hin, dass AvrBs3 in Abhängigkeit von der AD die durch AvrBs1 verursachte Abwehrreaktion der Pflanze supprimiert. Dieser Effekt wurde nur bei Infiltration des langsam wachsenden Stammes I74A mit geringer Dichte beobachtet. Die Zelltod supprimierende Aktivität könnte somit, neben der Induktion der Hypertrophie, eine weitere Virulenzaktivität des Effektors AvrBs3 sein.

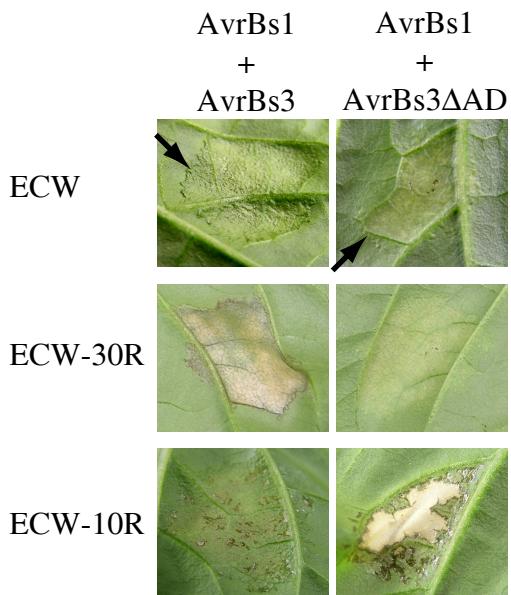


Abbildung 53: AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR in *C. annuum* cv. ECW-10R unterdrücken.

Xcv I74A-Stämme (Derivate von Xcv 85-10), welche AvrBs1, AvrBs3 bzw. AvrBs3ΔAD, wie angegeben, translozieren, wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 in *C. annuum* cv. ECW, ECW-30R und ECW-10R in-filtriert. Die Reaktionen wurden fünf Tage nach Infiltration fotografiert. Pusteln sind durch schwarze Pfeile markiert.

3.4.10. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren einen erhöhten Ionenaustritt aus *N. benthamiana*-Zellen

Um weitere durch Effektoren hervorgerufene, physiologische Veränderungen in Pflanzen zu untersuchen, wurde der Ionenaustritt aus Zellen infizierter *N. benthamiana*-Zellen bestimmt (siehe 2.9.). Dafür wurden *uidA*, *avrBs1*, *avrBs3* bzw. *avrBs4* mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert und zwei, vier bzw. sieben Tage nach Infiltration Blattscheiben geerntet. Verglichen mit nicht infiltriertem Blattmaterial konnte bei Expression von *uidA* vier Tage nach Infektion mit *Agrobacterium* kein signifikant veränderter Ionenaustritt gemessen werden. AvrBs3 und AvrBs1 induzierten hingegen einen signifikant erhöhten Ionenaustritt, welcher sieben Tage nach Infiltration nicht weiter erhöht war (Abbildung 54). Interessanterweise verursachte das AvrBs3-homologe Protein AvrBs4 keinen verstärkten Ionenaustritt (Abbildung 54).

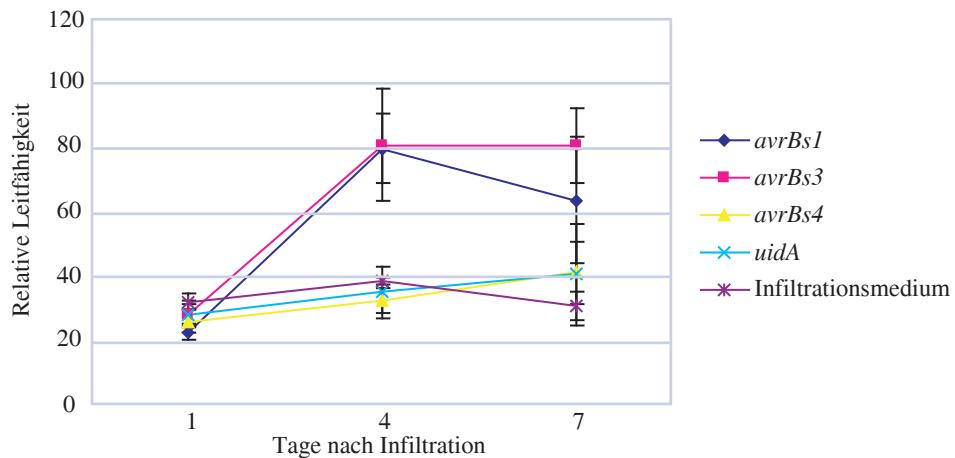


Abbildung 54: Messung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen nach Expression von *uidA*, *avrBs1*, *avrBs3* oder *avrBs4*.

Blätter von *N. benthamiana* wurde mit Infiltrationsmedium bzw. mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(*uidA*), GV3101(*avrBs4*), GV3101(*avrBs3*) und GV3101(*avrBs1*) infiltriert. Blattscheiben wurden 1, 4 und 7 Tage nach Infektion von fünf unabhängigen Pflanzen geerntet und die relative Leitfähigkeit als Maß für den Ionenaustritt bestimmt. Meßpunkte stellen Mittelwerte von fünf Messungen dar, die Standardabweichung ist angegeben. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei vergleichbare Resultate erzielt wurden.

4. Diskussion und Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit liefern neue Erkenntnisse über Virulenzfunktionen von T3-Effektoren sowie neue Einblicke in die molekulare Wirkungsweise des T3-Effektorproteins AvrBs3 aus *Xcv*. Sekretion und Translokation von AvrBs3 werden vermutlich durch die Bindung des T3-Chaperons HpaB begünstigt. Im pflanzlichen Zytosapton bindet AvrBs3 an Importin α , wodurch der Kernimport vermittelt werden kann. Weiterhin zeigten die Studien, dass AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese in der Pflanze hemmen kann, vermutlich durch direkte Interaktion mit dem Thiaminbiosynthese-Enzym C. Interessant sind auch die Ergebnisse, die zeigen, dass das als Transkriptionsregulator diskutierte AvrBs3-Protein Homodimere bildet, da viele Transkriptionsregulatoren als Dimere agieren. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden im Detail diskutiert.

4.1. Der Weg des Typ-III-Effektors AvrBs3: von der Sekretion aus dem Bakterium bis zur Wirkung als Transkriptionsfaktor in der Pflanze

4.1.1. HpaB beeinflusst die Sekretion von AvrBs3 durch Interaktion mit dem N-Terminus des Effektors in *Xcv*

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das *Xcv*-Protein HpaB an die N-terminalen Aminosäurereste 1-50 von AvrBs3 bindet, nicht aber an AvrBs3 Δ 2, in welchem die Reste 2-152 fehlen. Da HpaB ein kleines, saures, Leucin reiches Protein ist und damit typische Eigenschaften eines T3-Chaperons besitzt, wird postuliert, dass es die Sekretion des T3-Effektors AvrBs3 begünstigt (56, 98). Für HpaB wurde nicht nur die Bindung an AvrBs3, sondern auch eine Interaktion mit anderen, nicht homologen Effektoren aus *Xcv* nachgewiesen (D. Büttner, C. Lorenz, (57)). Daher liegt der Schluss nahe, dass es sich um ein T3-Chaperon der Klasse IB handelt (265). Somit ist HpaB das erste Klasse IB-Chaperon aus phytopathogenen Bakterien, da IB-Chaperone bisher nur aus den Tierpathogenen *Shigella flexneri* und *Salmonella enterica* isoliert wurden (89, 90, 202, 262).

Es wurde gezeigt, dass die Bindung von T3-Chaperonen an den N-Terminus von T3-Effektoren deren Sekretion durch das T3SS begünstigen (141). Tatsächlich werden die Derivate AvrBs3Δ1 (Aminosäurereste 3-27 fehlen) und AvrBs3Δ2 (Aminosäurereste 2-152 fehlen) nicht von *Xcv* sekretiert (325). Dies legt die Vermutung nahe, dass Sekretionssignal und HpaB-Bindungsstelle in AvrBs3 kolokalisieren.

Es werden verschiedene Möglichkeiten angenommen, wie ein T3-Chaperon zur Sekretion eines T3SS-Substrates beitragen kann (98). Für das T3-Chaperon IpgC aus *Shigella* wurde z.B. gezeigt, dass es eine Assemblierung seiner Substrate IpaB und IpaC verhindert und zu deren Stabilisierung beiträgt (227). Sekretionsanalysen mit *hpaB*-Deletionsmutanten lassen jedoch vermuten, dass HpaB keinen Einfluss auf die Stabilität von AvrBs3 hat (D. Büttner; 56). Ob HpaB eine Assemblierung des Effektors vor dessen Sekretion verhindert, könnte z.B. anhand der beobachteten Dimerisierung von AvrBs3 untersucht werden. Dabei sollte *hpaB* gleichzeitig mit *avrBs3* und *avrBs3ΔNLS-GFP* mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert werden. Verhindert HpaB die Assemblierung der AvrBs3-Derivate, so sollte kein Koimport von AvrBs3ΔNLS-GFP durch AvrBs3 beobachtet werden.

Andere Studien wiesen wiederum darauf hin, dass T3-Chaperone ihre Substrate in einem teilweise entfalteten Zustand halten, um deren Passage durch das T3SS zu gewährleisten (98). So zeigten Kristallisierungsstudien mit Chaperon-Effektor-Komplexen aus *Salmonella typhimurium*, dass SicP durch Bindung an den N-Terminus von SptP ca. 100 Aminosäuren des Effektors in einem ungefalteten Zustand hält (316). Um zu klären, ob HpaB tatsächlich die Faltung der Effektor-N-Termini verhindert, müsste HpaB in weiterführenden Studien zusammen mit AvrBs3 oder einem der interagierenden T3-Effektoren aus *Xcv* kristallisiert werden.

T3-Chaperone wurden auch als Regulatoren für eine Sekretions-Hierarchie diskutiert (98). So erlauben die 15 N-terminalen Aminosäurereste von YopE, z.B. nur in multiplen Effektor-Deletionsmutanten eine starke Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₅-Cya. Wurden dagegen die N-terminalen 130 Aminosäurereste von YopE, welche die Chaperonbindestelle enthalten, an die Cya fusioniert, so erfolgte auch in Wildtyp-Stämmen eine starke Sekretion des Fusionsproteins (49). Diese Daten deuten an, dass das Chaperon SycE durch Bindung an YopE eine bevorzugte Sekretion des Effektorproteins vermittelt. Domänenauftausch-Experimente mit AvrBs3 und dem Translokonprotein HrpF zeigten, dass der HrpF-N-Terminus eine Sekretion des entsprechenden AvrBs3Δ2-Fusionsproteins aus *hpaB*-Deletionsmutanten ermöglicht (D. Büttner; 56). Dies deutet an, dass der AvrBs3-

N-Terminus eine HpaB-Abhängigkeit der Sekretion vermittelt. Es ist denkbar, dass auch die Bindung von HpaB an die N-terminalen Bereiche von AvrBs3, ähnlich wie SycE, zu einem bestimmten Zeitpunkt eine bevorzugte Sekretion des Effektors bewirkt, wohingegen Translokonproteine kaum oder gar nicht sekretiert werden.

Neuere Studien mit tierpathogenen Bakterien weisen nun darauf hin, dass T3-Chaperone einen Kontakt zwischen ihren Substraten und dem T3S-Apparat herstellen (9, 115, 330). Die ATPase InvC, z.B., aus *Salmonella enterica* interagiert mit T3SS-Substraten und bewirkt deren Freisetzung aus dem Effektor-Chaperon-Komplex (9). Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass HpaB mit der mit dem T3S-Apparat assoziierten ATPase HrcN aus *Xcv* interagiert (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Die Bindung von HpaB an die 50 N-terminalen Aminosäurereste von AvrBs3 und die Interaktion von HpaB mit HrcN könnte somit den Kontakt zwischen Effektor und Sekretionsapparat herstellen.

Es wurde gezeigt, dass HpaB mit AvrBs3₁₋₅₀, nicht aber mit AvrBs3Δ2 (Aminosäurereste 2-152 fehlen) interagiert. Tatsächlich wurden die T3S-Signale in den meisten Effektoren im N-Terminus der Effektorproteine lokalisiert, wobei jedoch keine Konsensussequenz identifiziert werden konnte (118, 134, 210, 211, 240, 269, 294). Übereinstimmend damit wurden die Bindestellen fast aller untersuchten T3-Chaperon-Moleküle im N-Terminus ihrer Substrate lokalisiert (141). Chaperone von Substraten des Flagellarsystems bilden eine Ausnahme, da diese an die C-Termini ihrer Bindungspartner binden (19). Analysen von AvrBs2 aus *Xcv* zeigten, z.B., dass die Aminosäurereste 1-28 und 1-58 für die Sekretion und Translokation des Effektors benötigt werden (240). Für YopE und YopH wurden die Sekretionssignale in den N-terminalen 15 bzw. 17 Aminosäureresten gefunden (296, 313). Vergleichende Sequenzanalysen mit mehreren Effektoren von *Xcv* ergaben jedoch ein konserviertes, mögliches Sekretions- bzw. Translokationssignal für AvrBs3 innerhalb der Aminosäuren 129-143 (94). Diese Daten lassen vermuten, dass es möglicherweise zwei Sekretionssignale in AvrBs3 gibt, eines in den ersten N-terminalen Aminosäuren 1-27 und ein weiteres innerhalb der Aminosäuren 129-143. Die Deletion des ersten Signals scheint jedoch bereits effektiv die Sekretion von AvrBs3 zu verhindern (325). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine Deletion der Aminosäuren 129-143 ebenfalls zum Verlust der Sekretion des Effektors führt.

Es ist bisher auch nicht auszuschließen, dass die Aminosäurereste 1-15 von AvrBs3, ähnlich wie in YopE, für die T3S genügen. Um dies zu überprüfen, müsste ein weiteres Deletionsderivat von AvrBs3 (AvrBs3Δ1-15) erstellt und mittels Sekretionsanalysen

untersucht werden. Für das Chaperon SycE wurde gezeigt, dass es an die Aminosäurerreste 15-50 in YopE bindet. Interessanterweise zeigten die Arbeiten an SycE und YopE, dass die Reste 50-77 in YopE dessen Sekretion behindern, und dieser Effekt durch SycE-Bindung überwunden wird (62, 105, 296, 351). Ob die Aminosäurerreste 15-50 in AvrBs3 für die HpaB-Bindung ausreichen, wurde bisher noch nicht untersucht. Da die N-Termini der Translokonproteine zur Erstellung der HrpF- und XopA-AvrBs3-Fusionsproteine an AvrBs3 Δ 2 (Aminosäurereste 2-152 deletiert) fusioniert wurden, konnte ein negativer Einfluss der Aminosäurerreste 50-77 bisher nicht untersucht werden. In wieweit die Aminosäurerreste 51-152 von HpaB gebunden werden können, ist ebenfalls nicht geklärt. Es kann bisher demnach auch nicht ausgeschlossen werden, dass HpaB auch an die Aminosäurereste 51-100 bindet, wie die Kristall-Untersuchungen der SptP-SicP-Komplexe andeuten (315). Die Erstellung weiterer Deletionsderivate von AvrBs3 und anschließende Interaktionsstudien mit HpaB sowie Sekretionsanalysen könnten Aufschluss geben, ob zusätzliche Bereiche von AvrBs3 die HpaB-abhängige Sekretion verstärken bzw. eine Rolle für die HpaB-Bindung spielen.

4.1.2. AvrBs3 formt Homodimere durch Interaktion der zentralen „Repeats“ im Zytoplasma der Pflanzenzelle

Nachdem AvrBs3 mit Hilfe von HpaB durch das T3SS aus *Xcv* sekretiert und in die Wirtszelle transloziert wurde, befinden sich die Effektormoleküle zunächst im Zytoplasma der Pflanzenzelle. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AvrBs3-Moleküle in Hefe und *in vitro* miteinander interagieren. Die Interaktion *in vitro* mittels GST-„pull-down“-Experimenten legt den Schluss nahe, dass für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion keine zusätzlichen eukaryotischen Proteine nötig sind. Die Untersuchungen von AvrBs3 mittels „Blue native“-Gelelektrophorese wiesen darauf hin, dass AvrBs3 Homodimere bildet. Es wurde weiterhin gezeigt, dass AvrBs3 in der Pflanzenzelle dimerisiert. AvrBs3 ist nach unserem Wissen das erste Beispiel eines T3-Effektorproteins eines phytopathogenen Bakteriums, welches dimere Komplexe formt. Bisher wurde die Fähigkeit zur Dimerisierung nur für Effektoren aus Tierpathogenen beschrieben (260). Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass AvrBs3 als Transkriptionsregulator in der pflanzlichen Zelle agiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese, da für einige eukaryotische Transkriptionsregulatoren gezeigt wurde, dass sie Dimere bilden. Aufgrund

konservierter DNA-Binde-Domänen wurden diese in Familien eingruppiert. Beispiele sind die Familien der bZIP-Faktoren, welche basische Leucin-Zipper-Motive enthalten sowie MYB- und MADS-Box-Proteine, welche nach den zuerst isolierten Proteinen mit dem entsprechenden Motiv benannt wurden (199, 229, 279, 301). Obwohl AvrBs3 keine offensichtliche DNA-Bindedomäne enthält, hat es mehrere Eigenschaften mit den genannten Transkriptionsfaktoren gemeinsam. AvrBs3 lokalisiert im Zellkern und enthält eine AD, welche für die Induktion von Pflanzengenen essentiell ist (221, 324). AvrBs3 enthält außerdem imperfekte Leucin-Zipper (LZ)-„Repeats“, 111). Letztere vermitteln in bZIP-Faktoren deren Homo- und Heterodimerisierung. Die hier erfolgten Hefe-Di-Hybrid-Studien zeigten jedoch, dass AvrBs3-Deletionsderivate ohne LZ (AvrBs3 Δ C) miteinander interagieren können, wohingegen AvrBs3 Δ rep-312, welches das LZ-Motiv enthält, keine Dimere in Hefe bilden kann. Demnach sind die LZ-ähnlichen „Repeats“ im C-Terminus von AvrBs3 vermutlich nicht an der AvrBs3-AvrBs3-Interaktion beteiligt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Leucin-Zipper-„Repeats“ eine Heterodimerisierung mit pflanzlichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. bZIP-Faktoren ermöglichen. Die in einem solchen bZIP-Protein enthaltene DNA-Bindedomäne könnte dann die Bindung an Promotoren, der durch AvrBs3 induzierten Gene vermitteln. Interessanterweise wurde in Arbeiten mit AvrBs3-homologen Proteinen gezeigt, dass das LZ-Motiv für die Erkennungsspezifität der Effektoren wichtig sein kann (156, 175). AvrBs3 und das sehr homologe Protein AvrBs4, zeigen unterschiedliche Erkennungsspezifitäten, weisen aber im Bereich des LZ-Motivs keine Sequenzunterschiede auf (23, 45, 47). Domänaustauschexperimente zwischen AvrBs3 und Hax2 zeigten wiederum, dass der AvrBs3-LZ-Bereich für die *Bs3* vermittelte Erkennung wichtig sein könnte (175). Die Daten deuten demnach darauf hin, dass die LZ-„Repeats“ vermutlich nur für die Avirulenzaktivität von AvrBs4 unbedeutend sind. Übereinstimmend damit wird auch das AvrBs4-Derivat AvrBs4 Δ 227, welchem 12 „Repeats“ und der gesamte C-Terminus fehlen, von Bs4 erkannt (23). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit ein pflanzlicher AvrBs3-Interaktor mit LZ-Motiv identifiziert, welcher weiter unten diskutiert wird.

Hefe-Di-Hybrid-Studien ergaben, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion durch die zentrale „Repeat“-Region vermittelt wird, welche auch die Erkennungsspezifität von AvrBs3 bestimmt (145). Um zu untersuchen, welche „Repeats“ für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion verantwortlich sind, wurden verschiedene AvrBs3-Deletionsderivate getestet. Dabei stellte sich heraus, dass 14,5 „Repeats“ ausreichen, um eine Interaktion ähnlich des Wildtyp-Proteins zu vermitteln, wohingegen die Deletion von 10 bis 12 „Repeats“ eine verminderte

Proteininteraktion bewirken. Obwohl die zentralen „Repeats“ nicht völlig identisch sind, waren die getesteten Interaktionen vergleichbar, unabhängig davon, welcher Bereich der „Repeat“-Region deletiert wurde. Diese Ergebnisse deuten auf einen additiven Effekt der einzelnen „Repeats“ für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion hin. Die Cysteinreste, welche in allen „Repeats“ enthalten sind, vermitteln jedoch keine Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken, wie Untersuchungen mit aufgereinigtem AvrBs3-Protein zeigten. Tatsächlich ist allen „Repeats“ auch ein hoher Anteil an Leucin-Resten gemeinsam, was eine Rolle der Sequenzwiederholungen für Protein-Protein-Wechselwirkungen impliziert (111, 188).

Transkomplementationsansätze in *C. annuum* cv. ECW-30R (*Bs3*) und Kolokalisierungsstudien in *N. benthamiana* ergaben, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion sowohl in resistenten als auch in nicht-resistenten Pflanzen erfolgt. Dies lässt vermuten, dass die Dimerisierung von AvrBs3 während kompatibler und inkompatibler Pathogen-Wirt-Interaktionen erfolgt und demzufolge für Avirulenz- und Virulenzfunktion von AvrBs3 eine Rolle spielt. Da die „Repeat“-Region nicht nur die Dimerisierung, sondern auch die Erkennungsspezifität von AvrBs3 vermittelt, ist es schwierig, die Frage nach der biologischen Relevanz der Dimerisierung zu klären. Es wird vermutet, dass die Dimerisierung von AvrBs3 nach der Translokation von AvrBs3-Monomeren erfolgt, da angenommen wird, dass die Substrate des T3SS teilweise ungefaltet durch den T3-Pilus ins Wirtszellzytoplasma transportiert werden (98). Ein AvrBs3-Dimer würde vermutlich zu groß sein, um den T3-Pilus passieren zu können. Wie im Abschnitt 4.1.1. diskutiert, könnte das T3-Chaperon HpaB AvrBs3 in einem teilweise entfalteten Zustand halten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *Agrobacterium* vermittelte Koexpression zweier *avrBs3*-Deletionsderivate, welche in Paprika keine *Bs3*-spezifische HR auslösen (*avrBs3ΔAD* und *avrBs3Δrep-16*) zur Induktion einer HR führt. Überraschenderweise resultierte die Koinfiltration von zwei *Xcv*-Stämmen, wobei jeder Stamm eines der *avrBs3*-Derivate exprimierte, nicht in einer solchen Transkomplementation. Dies könnte an der niedrigen Menge an AvrBs3-Protein liegen, welches von *Xcv* sekretiert wird, verglichen mit der erhöhten Proteinmenge, die aus der *Agrobacterium* vermittelten Expression unter der Kontrolle des 35S-Promotors resultiert. Weiterhin muss beachtet werden, dass die AvrBs3-Deletionsderivate nicht nur Heterodimere, sondern auch Homodimere bilden, jedoch nur die heterodimeren Komplexe aktiv sind und eine HR auslösen können. Da während der *Agrobacterium* vermittelten Expression aufgrund des starken 35S-Promotors eine höhere Anzahl Monomere zur Verfügung steht, steigt in diesem experimentellen

Ansatz auch die Anzahl an Heterodimeren. Die *Agrobacterium* vermittelte Koexpression von *avrBs3ΔAAD* und *avrBs3Δrep-16* in *N. benthamiana* oder suszeptiblen Paprikapflanzen führte jedoch nicht zur Induktion einer Hypertrophie (Daten nicht gezeigt), welche normalerweise durch AvrBs3 ausgelöst wird (221). Eine mögliche Erklärung ist, dass für die Induktion einer Hypertrophie mehr AvrBs3-Moleküle nötig sind als für die Auslösung einer HR. Denkbar ist auch, dass die Homodimerisierung effektiver als die Heterodimerisierung der AvrBs3-Derivate erfolgt, so dass die Transkomplementation erschwert wird. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass *Xanthomonas*-Stämme mehrere Homologe mit unterschiedlicher Spezifität in die gleiche Pflanzenzelle translozieren, ohne dass deren Aktivität sichtbar beeinträchtigt ist. Dazu zählen z.B. der *Xcv*-Stamm 82-8, welcher AvrBs3 und AvrBs4 sekretiert, sowie *Xoo*-Stämme, die mehr als zehn *avrBs3*-Homologe exprimieren (197, 365, 367). Des Weiteren ist es auch denkbar, dass andere, gleichzeitig aus *Xanthomonas* sekretierte Proteine, pflanzliche Proteine oder eine bevorzugte Kinetik zur favorisierten Bildung von Homodimeren führen. Das Ausbleiben einer Hypertrophie bei Expression zweier mutanter *avrBs3*-Derivate lässt aber auch den Schluss zu, dass nur Wildtyp-AvrBs3-Homodimere die vollständige Virulenzaktivität besitzen.

Die Kolokalisierungsexperimente zeigten weiterhin, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion im Zytoplasma der Pflanzenzelle und somit vor dem Kernimport des Effektors erfolgt.

Zusammenfassend ergeben die *in planta*-Studien folgende Schlussfolgerung: Ein AvrBs3-Molekül mit funktionaler AAD und eine Wildtyp-„Repeat“-Region innerhalb eines AvrBs3-Dimers sind notwendig und ausreichend, um eine HR in resistenten Pflanzen zu induzieren. Wie frühere und hier erfolgte Arbeiten zeigten, binden Importin α -Moleküle an die AvrBs3 NLS (324; diese Arbeit). Die hier erfolgende Importin α -NLS-Interaktion benötigt keine Assemblierung der NLS zu einer dimeren Form, da auch AvrBs3 Δ SpHI in den Zellkern lokalisiert, obwohl diesem AvrBs3-Derivat gesamte „Repeat“-Region fehlt. Andere Proteine, wie z.B. die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 aus Hefe, müssen dagegen dimerisieren, um funktionale NLS auszubilden (224). Dabei erfolgt die Dimerisierung über SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen zwischen zwei STAT-Molekülen und Importin α bindet über seinen C-Terminus an Tyrosin-phosphorylierte STAT-Dimere und nicht über die Armadillo-„Repeats“ wie bei AvrBs3 (27, 71, 104, 303).

Insgesamt geben die hier erhaltenen Ergebnisse einen weiteren Einblick in die Wirkungsweise des Effektorproteins AvrBs3: AvrBs3 wird als Dimer in den Zellkern transportiert, in welchem es dann die Induktion pflanzlicher Zielgene bewirkt. Die

Fähigkeit, Dimere zu bilden unterstützt die Hypothese, dass AvrBs3 als Transkriptionsregulator in der Pflanzenzelle fungiert. Da die Dimerisierung durch das Leucin reiche Rückgrat der „Repeat“-Region vermittelt wird, ist es wahrscheinlich, dass auch andere AvrBs3-Familien-Mitglieder als Homodimere agieren. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob AvrBs3 im Zellkern tatsächlich als Homodimer agiert oder mit pflanzlichen Transkriptionsfaktoren heterodimerisiert. FRET-Analysen von Zellkernen unter Verwendung fluoreszierender AvrBs3-Fusionsproteine könnten darüber Aufschluss geben, wie stabil der dimere AvrBs3-Komplex im Zellkern vorliegt. Bei einer möglichen Heterodimerisierung könnte das postulierte LZ-Motiv eine Rolle spielen. Diese Frage wurde in Abschnitt 3.1.2.3.15. bearbeitet und wird weiter unten diskutiert.

4.1.3. CaIMP α 1 interagiert mit dem NLS-Bereich des Effektorproteins AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle

Unter Verwendung unterschiedlicher Techniken wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Importin α -Protein CaIMP α 1 aus Paprika in der Pflanze mit AvrBs3 interagiert. Die Komplexe aus CaIMP α 1 und AvrBs3 wurden direkt in lebenden pflanzlichen Zellen visualisiert, wodurch gezeigt wurde, dass die in Hefe und *in vitro* beobachtete Interaktion (324) tatsächlich in der natürlichen Umgebung der Proteine erfolgt. Mit den durchgeführten Koimmunopräzipitations-, BiFC- und FRET-Analysen wurden dabei relativ neu entwickelte Techniken angewendet. Diese Arbeiten zeigen auch, dass eine Interaktion eines T3-Effektors, welche durch Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen gefunden wurde, *in planta* bestätigt werden kann. Bisher wurden nur wenige Proteine beschrieben, welche mit T3-Effektoren phytopathogener Bakterien in der Pflanzenzelle interagieren. Beispielsweise wurden mehrere putative Interaktoren von AvrPto in Hefe-Di- und Hefe-Tri-Hybrid-Sichtungen mit Pto identifiziert, welche als Virulenzzielproteine bezeichnet werden könnten. Für keines dieser Proteine wurde bisher jedoch eine Interaktion *in planta* gezeigt (43). Erst kürzlich wurden mittels Hefe-Di-Hybrid-Sichtung Proteine aus *Malus domestica* identifiziert, welche mit dem *Erwinia*-Effektor DspA/E interagieren. Die Interaktionen konnten *in vitro* bestätigt werden, jedoch erfolgten keine Experimente *in planta* (228).

Eine der ersten *in planta*-Studien zeigte, dass AvrRpt2 aus *P. syringae* und das entsprechende R-Protein RPS2 aus *Arabidopsis*-Zellen koimmunopräzipitieren. Dabei

wurden interessanterweise zusätzliche Proteine mit Molekulargewichten von 75 kDa bzw. 100 kDa detektiert, deren Identität jedoch unbekannt ist (203). Bei einem der in diesen Komplexen enthaltenen Proteine könnte es sich um RIN4 handeln, welches in Hefe als Interaktor von AvrB isoliert wurde (216). Später wurde mit Hilfe von Koimmunoprezipitationsansätzen gezeigt, dass RIN4 tatsächlich in der Pflanze mit AvrB sowie mit AvrRpt2 und AvrRpm1 und den korrespondierenden Resistenzproteinen interagiert (20, 215, 216). Ein weiteres Beispiel eines Virulenzzielproteins, dessen Interaktion mit dem Effektorprotein in der Pflanze gezeigt werden konnte, ist PBS1. Die Studien zeigten, dass der *Pseudomonas*-Effektor HopAR1, welcher vermutlich als Cysteinprotease fungiert, mit der Kinase PBS1 aus *Arabidopsis* interagiert, wodurch diese abgebaut wird (306). Der Abbau von PBS1 führt zur Aktivierung des Resistenzproteins RPS5 und dadurch zur Induktion der Abwehrreaktionen. Bisher wurde für eine Vielzahl weiterer T3-Effektoren phytopathogener Bakterien eine Aktivität als Cysteinprotease postuliert und gezeigt (für einen Überblick siehe (132, 239). Virulenzziele dieser Effektoren wurden jedoch noch nicht identifiziert.

Die Tatsache, dass die Interaktion zwischen CaIMP α 1 und AvrBs3 Δ 2 mittels KoIP und BiFC-Studien in Pflanzenzellen gezeigt werden konnte, legt den Schluss nahe, dass es sich bei dem in Hefe-Di-Hybrid-Studien identifizierten CaIMP α 1-Protein um einen realen Interaktor des Effektors AvrBs3 handelt.

Um die Interaktion von AvrBs3 und CaIMP α 1 *in planta* zu untersuchen, wurden AvrBs3-Fusionsproteine verwendet. Sowohl die N-terminalen als auch die C-terminalen AvrBs3-Fusionsproteine lokalierten im Nukleus wie das Wildtyp-Protein (325). Dies zeigt, dass die verwendeten Fusionen den Kernimport nicht behindern. Experimente in Hefe und *in vitro* deuteten an, dass die Interaktion des Paprika-Importin α -Proteins mit AvrBs3 über die NLS 2 des Effektors erfolgt (324). Die hier erfolgten Studien zeigten, dass für die CaIMP α 1-AvrBs3 Δ 2-Interaktion in der Pflanzenzelle tatsächlich die AvrBs3-NLS-Region benötigt wird. Erste FRET-Analysen mit AvrBs3 Δ 2 und CaIMP α 1 ergaben Zellkerne mit positiven, aber auch Zellkerne mit negativen FRET-Effizienzen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Interaktion von Importin α -Molekülen mit AvrBs3 Δ 2 transient erfolgt und nach Kernimport aufgehoben wird. So enthalten Zellkerne mit positiven FRET-Signalen vermutlich CaIMP α 1-AvrBs3 Δ 2-Komplexe, wohingegen in Zellkernen ohne messbaren FRET die Proteinkomplexe bereits dissoziert sein könnten. Die bekannten Daten über die Wirkungsweise der Kernimportmaschinerie unterstützen diese Hypothese (122, 194). Danach erfolgt die Interaktion von AvrBs3 und Importin α

vermutlich im Zytoplasma und anschließend wird dieser Komplex vermittelt durch ein gebundenes Importin β -Molekül in den Zellkern transportiert. Dort dissoziiert der Proteinkomplex und die Importin α - und β -Moleküle sowie AvrBs3 werden vermutlich freigesetzt. Die Importin-Moleküle können dann zurück in das Zytoplasma gelangen, um neue Proteine für den Kernimport zu binden und AvrBs3 kann als Transkriptionsaktivator fungieren.

Interessanterweise zeigten kürzlich erschienene Arbeiten, dass Importin α -Proteine eine bedeutende Rolle für die Pflanzenabwehr spielen können. *MOS6*, ein Gen aus *Arabidopsis*, kodiert für Importin $\alpha 3$, dessen Deletion eine verstärkte Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pathogenen bewirkt (264). Da die *Bs3* vermittelte Erkennung und die Geninduktion von der Kernlokalisierung von AvrBs3 abhängen, würde eine Deletion von *Caimp $\alpha 1$* jedoch sowohl die Avirulenz- als auch die Virulenzaktivität beeinträchtigen. Die vorangegangenen Hefestudien zeigten aber, dass verschiedene Importin α -Homologe an die AvrBs3-NLS binden können und vermutlich den Transport des Effektors in den Zellkern vermitteln (324). Die gleichzeitige Deletion oder das „Silencing“ aller Paprikahomologe würde vermutlich pleiotrope Effekte haben und Pathogen unabhängige Prozesse in der Pflanze beeinträchtigen und somit starke negative Einflüsse auf das Wachstum der Pflanze haben.

Da *Caimp $\alpha 1$* in einer cDNA-Bank aus *C. annuum* cv. ECW-123-Pflanzen, welche das Resistenzgen *Bs3* enthalten, gefunden wurde, könnte es sich bei *Caimp $\alpha 1$* um *Bs3* handeln (112). Bisher wurden einige Fälle einer direkten Avr-R-Interaktion beschrieben. Beispielsweise interagiert AvrPto aus *P. syringae* mit Pto aus Tomate; AvrPita aus *Magnaporthe grisea* interagiert *in vitro* direkt mit dem Reis-R-Protein Pi-ta und PopP2 aus *R. solanacearum* interagiert mit dem korrespondierenden R-Protein RRS1-R aus *Arabidopsis* (81, 162, 302, 327). *Caimp $\alpha 1$* kann jedoch nicht für das R-Protein *Bs3* kodieren, da AvrBs3 sowohl in suszeptiblen als auch in resistenten Paprikapflanzen im Nukleus lokalisiert ist und die Expression von *Caimp $\alpha 1$* in beiden isogenen Linien (ECW-30R und ECW) nachgewiesen werden kann (A. Raschke, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlichte Daten).

Der „Guard“-Hypothese entsprechend (siehe 1.3.2.), könnte der AvrBs3-Interaktor CaIMP $\alpha 1$ auch ein Virulenzziel von AvrBs3 sein, welches durch Bs3 „bewacht“ wird (337). CaIMP $\alpha 1$ interagiert *in planta* spezifisch mit dem NLS-Bereich von AvrBs3, welche in den Proteinen der AvrBs3-Effektorfamilie konserviert ist. Tatsächlich bildet

auch AvrBs4Δ2 mit CaIMP α 1 Komplexe in lebenden Pflanzenzellen (A. Raschke, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es ist demnach wahrscheinlich, dass auch andere AvrBs3-Homologe mit CaIMP α 1 bzw. mit homologen Importin α -Molekülen verschiedener Pflanzenarten interagieren. In diesem Fall würde Importin α ein Virulenzzielprotein vieler T3-Effektoren darstellen. Tatsächlich wurde mit RIN4 bereits ein pflanzliches Zielprotein beschrieben, welches durch mehrere, nicht homologe Effektoren aus *P. syringae* gebunden wird (182, 216, 306). AvrB und AvrRpm1 phosphorylieren RIN4, wohingegen die Cysteinprotease AvrRpt2 den Abbau von RIN4 bewirkt. Dabei ist jedoch noch nicht geklärt, welche Rolle die Modifikationen von RIN4 für die Virulenzaktivität der Effektoren bzw. die Virulenz des Pathogens spielen. RIN4 wird durch die R-Proteine RPM1 und RPS2 „bewacht“ (20, 215, 216). Diese werden durch die Phosphorylierung bzw. den Abbau von RIN4 aktiviert und leiten die pflanzlichen Abwehrreaktionen ein (20, 182, 215, 216). Auch AvrBs3 ähnliche Effektoren werden durch verschiedene *R*-Gene vermittelt, erkannt. Dabei sind diese *R*-Gene und deren Produkte sehr divers: Xa5, z.B., weist Homologie zur γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA auf (36, 157), Xa27 wird durch AvrXa27 induziert (129) und Bs4 ist ein typisches NB-LRR-Resistenzprotein (298). Doch „bewacht“ tatsächlich jedes dieser unterschiedlichen R-Proteine Importin α ? Importin α ist ein essentielles Protein für die pflanzliche Zelle, da es den Transport verschiedener Pflanzenproteine in den Zellkern gewährleistet. Demnach ist es denkbar, dass Importin α -Proteine sehr gut in der Pflanzenzelle „bewacht“ werden. Die Bs3 vermittelte Erkennung von AvrBs3 erfolgt in Abhängigkeit von der Kernlokalisierung des Effektors (324). Da aber AvrBs3ΔAD, welches die NLS enthält, keine HR in Bs3-Paprikapflanzen induziert, ist die Aktivierung von Bs3 bzw. Bs3 eher von der Aktivität von AvrBs3 als Transkriptionsregulator abhängig und nicht von der Bindung an Importin α . Auch im Fall von AvrXa27 löst nicht die Bindung an ein Importin α -Homolog aus Reis die Abwehrmechanismen aus, sondern vermutlich die Bindung des Effektors an den Promotor des *R*-Gens Xa27 (130). Des Weiteren erkennt Bs4 das homologe AvrBs4-Protein unabhängig von den C-terminalen NLS (23, 298). Dies deutet wiederum darauf hin, dass die Bindung von Importin α nicht für die Gen-für-Gen-Erkennung notwendig ist.

Alle Daten weisen darauf hin, dass Importin α kein klassisches, durch R-Proteine „bewachtes“ Virulenzzielprotein ist. Importin α ist dennoch für die Virulenz- und Avirulenzaktivitäten AvrBs3-ähnlicher Effektoren notwendig, da die Aktivierung der

Genexpression vom Kernimport der Proteine und damit von der Bindung an Importin α -Moleküle abhängig ist. Auch andere T3-Effektoren enthalten NLS, wie z.B. XopD, PopP2, AvrR xv, AvrBsT und AvrXv4 (63, 81, 251, 281). Für PopP2 aus *R. solanacearum* und XopD aus *Xcv* wurde die Kernlokalisierung bereits gezeigt (81, 148). Dies deutet an, dass auch diese Proteine mit Importin α -Molekülen interagieren könnten. Die eigentlichen Virulenzzielproteine von XopD, z.B., sind vermutlich jedoch bisher unbekannte SUMOylierte Pflanzenproteine (148).

In zukünftigen Studien sollten abschließende Koimmunopräzipitationsexperimente zur Untersuchung der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion erfolgen, da in der vorliegenden Arbeit dafür zunächst AvrBs3 Δ 2-HA und YFP_C-HA-AvrBs3 Δ 2 verwendet wurden. Für einen besseren Vergleich sollte ein Experiment mit AvrBs3 Δ 2-HA und AvrBs3 Δ 2 Δ NLS-HA erfolgen. Die FRET-Analysen, welche in dieser Arbeit mit AvrBs3-CFP und CaIMP α 1-YFP begonnen wurden, sollten nachfolgend mit allen möglichen Kombinationen der verschiedenen fluoreszierenden Fusionsproteine durchgeführt werden. Dies erfolgte in der Diplomarbeit von A. Raschke. Dabei wurde eine größere Anzahl an Zellkernen untersucht, um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können. Die statistische Auswertung ergab, dass sich, verglichen mit homodimeren Komplexen von Transkriptionsfaktoren (Positivkontrolle) keine stabilen AvrBs3-Importin α -Komplexe in pflanzlichen Zellkernen befinden (A. Raschke, Diplomarbeit, 2006). Dies spricht für die bereits diskutierte transiente Interaktion der untersuchten Proteine.

Interessanterweise ist CaIMP α 1 der bisher einzige beschriebene Interaktor eines Effektors der AvrBs3-Familie. In dieser Arbeit wurden jedoch auch weitere potentielle AvrBs3-Interaktoren identifiziert, die nachfolgend diskutiert werden.

4.1.4. Hemmt AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese im Zytoplasma?

Während einer Hefe-Di-Hybrid-Sichtung mit AvrBs3 als Köder wurde LeThiC als putativer Interaktor von AvrBs3 identifiziert. Die LeThiC-AvrBs3-Interaktion konnte in Hefe und *in vitro* reproduziert werden und erfolgt spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Familie. Analysen mit verschiedenen Deletionskonstrukten von AvrBs3 zeigten, dass die Interaktion mit LeThiC mit der „Repeat“-Region erfolgt und von der Anzahl der „Repeats“, nicht aber von deren Position oder variablen Aminosäureresten abhängt. *In*

planta durchgeführte Interaktionsstudien konnten die Interaktion bisher jedoch nicht bestätigen: In BiFC-Analysen interagierte weder AvrBs3Δ2, welches relativ schnell in den Zellkern importiert wird, noch AvrBs3Δ2ΔNLS, welches im Zytoplasma verbleibt, mit LeThiC. AvrBs3Δ2 wurde zuvor jedoch erfolgreich für *in planta*-Interaktionsstudien mit CaIMPo1 mittels BiFC verwendet. Auch für das entsprechende LeThiC-Fusionsprotein wurde eine Interaktion unter Verwendung der BiFC-Methode gezeigt (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion zwischen AvrBs3 und LeThiC zu schwach ist, um mit den zur Verfügung stehenden Techniken *in planta* nachgewiesen zu werden. Es ist ebenfalls möglich, dass die fusionierten YFP-Hälften die hier untersuchte Interaktion behindern. Koimmunopräzipitationen der möglichen AvrBs3-LeThiC-Komplexe aus Pflanzenzellextrakten waren bisher nicht möglich, da bereits nach Immunopräzipitationsreaktionen nach Expression von *LeThiC*-Fusionen nicht genügend Protein detektiert werden konnte.

Eine weitere mögliche Erklärung bietet die Lokalisierung von Effektor und Interaktor. Aufgrund seiner Homologie könnte der Interaktor LeThiC eine Rolle in der Vitamin B1-Synthese in der Pflanze spielen, welche früheren Arbeiten zufolge vermutlich in den Chloroplasten erfolgt (28, 170, 278). Tatsächlich deuteten physiologische Komplementationanalysen an, dass LeThiC an der Vitamin B1-Synthese in der Pflanze beteiligt ist. Jedoch wurde LeThiC in der vorliegenden Arbeit im Zytoplasma von Pflanzenzellen lokalisiert. Die zu den früheren Arbeiten an Vitamin B1-Syntheseenzyme widersprüchliche Lokalisierung könnte in der Verwendung N-terminaler Fusionsproteine begründet sein, welche die Erkennung des Signalpeptids für den Chloroplastenimport behindern. C-terminale Fusionen konnten aber weder mittels Fluoreszenzmikroskop noch mittels Westernblot nachgewiesen werden. Die Vorhersagen verschiedener Computerprogramme waren sehr unterschiedlich und erlaubten keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung von LeThiC. Aufgrund dieser Daten kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher gesagt werden, in welchem Kompartiment LeThiC lokalisiert. In weiterführenden Arbeiten könnten andere Epitope an *LeThiC* fusioniert werden oder aber Antikörper gegen LeThiC hergestellt werden, welche dann für die Detektion des Proteins nach Fraktionierung von Pflanzenmaterial und Isolierung von Chloroplasten verwendet werden können. Da AvrBs3 zunächst von *Xcv* ins pflanzliche Zytoplasma injiziert wird, und die Synthese von LeThiC im Zytoplasma der Pflanzenzelle erfolgt, ist jedoch, trotz

unterschiedlicher Lokalisierung von AvrBs3 und LeThiC, nicht auszuschließen, dass beide Proteine transient im Zytoplasma interagieren.

Vitamin B1 dient als Kofaktor von Enzymen des Zitratzyklus. Um die Frage nach einer möglichen biologischen Relevanz der in Hefe gefundenen Interaktion zwischen AvrBs3Δ2 und LeThiC zu klären, wurden „Silencing“-Experimente mittels VIGS in *N. benthamiana* und Paprika durchgeführt. Die makroskopisch sichtbaren Reaktionen der Pflanzen nach anschließender Infektion mit *avrBs3*-exprimierenden Agrobakterien bzw. Xanthomonaden lieferten keine Hinweise dafür, dass LeThiC an der Ausbildung der Hypertrophie beteiligt ist. Um sicherzustellen, dass das VIGS erfolgt war, müsste überprüft werden, ob die Transkriptmenge der homologen *ThiC*-Gene in *N. benthamiana* und Paprika hinreichend reduziert werden konnte. Interessanterweise zeigten jedoch spezifisch die Pflanzen, für welche das *LeThiC*-„Silencing“-Konstrukt verwendet wurde einen deutlich abweichenden Phänotyp im Vergleich zu Pflanzen, in welchen Fragmente des *GFP*- oder *PDS*-Gens verwendet wurden. Dies legt den Schluss nahe, dass das „Silencing“ der *ThiC*-Homologen in beiden Pflanzenarten erfolgreich war. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass wenige, noch vorhandene LeThiC-Moleküle ausreichen, um die AvrBs3-spezifischen Reaktionen auszulösen.

Interessanterweise wurde bei den Analysen zur biologischen Bedeutung der AvrBs3-LeThiC-Interaktion ein verminderter Vitamin B1-Gehalt in Pflanzen, welche *avrBs3* exprimieren, verglichen mit Pflanzen, welche kein Wildtyp-*avrBs3* exprimieren, festgestellt. Dies deutet an, dass AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese hemmt oder zumindest verzögert. Dies erscheint im Vergleich aktueller Arbeiten, welche Hinweise dafür liefern, dass Vitamin B1 eine Rolle während der pflanzlichen Abwehr spielt, vorstellbar. So wurde gezeigt, dass Thiamin in verschiedenen Pflanzenarten Resistenz induziert, unabhängig von der untersuchten Pathogen-Wirt-Interaktion (7). Dabei wurde festgestellt, dass verschiedene *PR*-Gene durch Thiamingabe verstärkt exprimiert wurden. Wang und Kollegen isolierten das Reisgen *OsDR8*, welches für die Resistenz der Pflanzen gegenüber *Xoo* und *Magnaporthe grisea* bedeutend ist (350). Interessanterweise zeigte das Genprodukt Homologie zu einem Enzym der Thiaminsynthese. Transgene Pflanzen, welche eine reduzierte Expression von *OsDR8* und eine reduzierte Resistenz zeigten, enthielten außerdem weniger Thiamin als die Kontrollpflanzen. Wurde Vitamin B1 zugegeben, konnte der beobachtete Resistenzverlust komplementiert werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Akkumulation von Vitamin B1 für die Abwehrreaktionen der Reispflanzen essentiell ist. Diese Daten berücksichtigend, ist es vorstellbar, dass AvrBs3

an LeThiC bindet, dessen enzymatische Aktivität inhibiert und dadurch die Abwehr der Pflanze verzögert.

Um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, mussten die zu vergleichenden *Agrobacterium* vermittelten Expressionen nebeneinander in einem Blatt erfolgen. Dazu wurde das Experiment in *N. benthamiana* durchgeführt, da nur in diesen Pflanzen eine ausreichend große Fläche mit *Agrobacterium* durch einmaliges Aufsetzen der Spritze infiltriert werden konnte. Um die Variabilität der individuellen Pflanzen zu umgehen und mit Tomate arbeiten zu können, aus welcher *LeThiC* isoliert wurde, könnten zukünftig ähnliche Experimente mit Zellkulturen von *L. esculentum* durchgeführt werden. Ein solcher Ansatz ermöglicht die *Agrobacterium* vermittelte Expression des Effektorgens und stellt ausreichend Zellmaterial für die Extraktion der Thiamin-Verbindungen zur Verfügung. Des Weiteren könnten nach Etablierung eines solchen experimentellen Ansatzes, eine Reihe von AvrBs3-Deletionsderivaten getestet werden, um zu prüfen, von welcher Region des Effektors die Hemmung des Vitamin B1-Synthese-Enzyms abhängt.

Weiterhin könnten VIGS-Experimente durchgeführt werden, und die Pflanzen nach erfolgtem „Silencing“ mit unterschiedlichen Pathogenen infiziert werden. Diese Ansätze könnten zeigen, ob das Vorhandensein von LeThiC auch einen Einfluss auf andere Pathogen-Wirt-Interaktionen hat. In den durchgeföhrten Arbeiten wurde nach „Silencing“-Ansätzen mit *LeThiC*-Fragmenten zumindest keine verminderte Resistenz von *Bs1*-Paprikapflanzen gegenüber AvrBs1 translozierenden *Xcv*-Stämmen beobachtet. Es ist denkbar, dass für die *Bs1* vermittelte Erkennung von AvrBs1 Vitamin B1 keine Rolle spielt. Der nach durchgeföhrtem VIGS von *LeThiC* spezifisch veränderte Phänotyp der Paprikablätter deutet an, dass das „Silencing“ erfolgreich war. Möglich ist aber, dass durch das „Silencing“ des Paprika-*ThiC*-Gens die Thiaminmenge nicht ausreichend reduziert war, um einen Einfluss auf die AvrBs1-*Bs1*-Erkennung beobachten zu können. Die Überexpression von LeThiC hatte vermutlich keinen Einfluss auf die durch AvrBs3 ausgelösten Reaktionen, da es sich bei LeThiC nur um ein Enzym zu Beginn einer Biosynthesekaskade handelt. Alle folgenden, an der Thiaminsynthese beteiligten, Enzyme bestimmen die Reaktionsgeschwindigkeit der Biosynthese.

Neben den beschriebenen *in planta*-Studien, könnte ein weiterer, einfacher experimenteller Ansatz in *E. coli* klären, ob LeThiC von AvrBs3 inhibiert wird. Dafür sollte *LeThiC* zunächst in mutanten *E. coli*-Stämmen, in welchen *ThiC* deletiert ist (21), exprimiert werden. Diese Stämme zeigen vermutlich ein stark reduziertes Wachstum. Erfolgt eine Komplementation der *ThiC*-Mutation durch *LeThiC*, so sollten die *LeThiC*-

exprimierenden Zellen ohne Vitamin B1-Zugabe ähnlich wie der Wildtyp-Stamm wachsen. Ist dies der Fall, könnte im selben Stamm auf einem weiteren Plasmid *avrBs3* exprimiert und das Bakterienwachstum beobachtet werden. Ist das Wachstum ohne Vitamin B1-Zugabe in diesem Stamm wieder reduziert, so ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass AvrBs3 tatsächlich das Enzym LeThiC blockiert. Die Tatsache, dass die AvrBs3-LeThiC-Interaktion in GST-„pull-down“-Experimenten nach Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* gezeigt werden konnte, zeigt, dass ein solcher Ansatz in *E. coli* prinzipiell erfolgreich verlaufen könnte. Tatsächlich wurden derartige Komplementationsanalysen bereits für andere pflanzliche Enzyme der Vitamin B1-Synthese erfolgreich angewendet (184).

4.1.5. Interagiert AvrBs3 im Zellkern mit pflanzlichen Proteinen?

Sowohl die in Vorarbeiten identifizierten Interaktoren von AvrBs3 (324; B. Szurek, Doktorarbeit, 2001) als auch das neu gefundene LeThiC-Protein sind zytoplasmatische Proteine. Das Zielkompartiment von AvrBs3 ist jedoch der Zellkern der Pflanzenzelle, in welchem es die Expression verschiedener Gene induziert (221; S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Bisher ist nicht bekannt, ob AvrBs3 selbst oder innerhalb eines Proteinkomplexes an Promotoren bindet. Da in AvrBs3 keine offensichtliche, bekannte DNA-Bindedomäne enthalten ist, wurde spekuliert, dass AvrBs3 mit einem Pflanzenprotein interagiert, welches an DNA binden kann. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein solches DNA-bindendes Protein in einem erneuten Hefe-Di-Hybrid-Ansatz zu identifizieren, wurde das putative LZ-Motiv als Köder verwendet. LZ-enthaltende Transkriptionsfaktoren binden über dieses Motiv als dimere Komplexe an DNA (199, 311). Die Analysen zur AvrBs3-AvrBs3-Interaktion zeigten, dass der putative AvrBs3-LZ nicht an einer Homodimerisierung des Effektors beteiligt ist. Wie in diesem Zusammenhang bereits diskutiert, ist es jedoch denkbar, dass AvrBs3 über das putative LZ-Motiv mit pflanzlichen Transkriptionsregulatoren der bZIP-Familie interagiert.

Unter Verwendung von AvrBs3-LZ als Köder wurden zwei potentielle, spezifische Virulenzzielproteine von AvrBs3 identifiziert. Einer der Interaktoren zeigt Homologie zu einer reduzierenden Koenzym-F₄₂₀-Hydrogenase aus *Arabidopsis* (Aip7). Das andere mit AvrBs3 interagierende Protein zeigt Homologie zu dem Homeoboxprotein MERISTEM LAYER L1 aus *Arabidopsis* (Aip8). Homeoboxproteine sind Transkriptionsregulatoren,

welche demzufolge kernlokalisiert sind. Innerhalb des interagierenden Fragmentes befindet sich auch ein LZ-Motiv. Aip8 stellt somit einen potentiellen Kandidaten eines kernlokalisierten AvrBs3-Virulenzzielproteins dar, mit dessen Hilfe AvrBs3 an Promotoren, z.B. der identifizierten *upa*-Gene binden könnte. Das Homolog AtML1 ist vermutlich an der Differenzierung der Epidermis beteiligt (217). Northernblotanalysen mit *Arabidopsis* zeigten, dass *AtML1* nur in Knospen exprimiert wird (214). Die cDNA-Bank, aus welcher *Aip8* isoliert wurde, wurde aber nur mit RNA aus Laubblättern von Tomate erstellt. Später erfolgte, vergleichende RT-PCR-Studien mit 16 Genen der Homeodomäne-LZ-Familie zeigten jedoch, dass *AtML1* auch in Blättern und Stängeln von 40 Tage alten Pflanzen exprimiert wird (243). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass Aip8 nicht nur in der frühen Embryoentwicklung eine Rolle spielt, sondern auch in bereits ausdifferenzierten Geweben älterer Pflanzen. Welche Funktion Aip8 dabei hat und wie diese von AvrBs3 beeinflusst werden könnte, ist unklar. Denkbar ist, dass AvrBs3 im Komplex mit Aip8 an die Promotorsequenz eines Transkriptionsfaktors bindet, welcher die Hypertrophie induziert. Da Aip8 nur zu 64% identisch mit AtML1 ist, ist es auch möglich, dass beide Proteine unterschiedliche Funktionen haben.

Die vollständigen cDNA-Moleküle beider neu identifizierten spezifischen AvrBs3-Interaktoren wurden bereits isoliert (M. Egler und U. Bonas, unveröffentlichte Daten; A. Raschke, 2006 Diplomarbeit). Aufgrund der Ähnlichkeit von Aip8 zu einem Transkriptionsregulator scheint dieser AvrBs3-Interaktor besonders interessant. Aip8 lokalisiert tatsächlich, wie für Transkriptionsregulatoren erwartet, im Zellkern der Pflanzenzelle (M. Egler und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise interagiert Aip8 nicht nur mit AvrBs3, sondern auch mit HpaA, einem Protein aus *Xcv*, welches ebenfalls in den pflanzlichen Zellkern lokalisiert (O. Kirchner, M. Egler und U. Bonas, 154)). Eine verminderte HR in Paprika ECW-30R-Pflanzen nach „Silencing“ von *Aip8* lässt eine Relevanz der Protein-Interaktion für die *Bs3* vermittelte Erkennung von AvrBs3 vermuten (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit). Bisher konnte eine Interaktion von Aip8 und AvrBs3 weder *in vitro* noch *in planta* gezeigt werden (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit). Da die Interaktionsstudien aufgrund nicht detektierbarer Proteinmengen nicht erfolgen konnten (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit), kann jedoch derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass AvrBs3 und Aip8 tatsächlich in der Pflanze interagieren.

4.2. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus *Xcv*: unterschiedliche Proteine mit ähnlicher Wirkung?

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von *avrBs1*, *avrBs3* und *avrBs4* in *N. benthamiana* zu sichtbaren pflanzlichen Reaktionen führt. Diese potentiellen Virulenzfunktionen der untersuchten Effektoren stellen im Gegensatz zu deren Avirulenzaktivitäten in resistenten Pflanzen Primärfunktionen der Proteine dar. Bisher ist jedoch nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, wie Effektoren zur Virulenz eines Pathogens beitragen. Während die Avirulenzaktivitäten der Effektoren aufgrund der meist induzierten HR leicht zu verfolgen sind, bleiben die Virulenzaktivitäten einzelner Effektoren oft unsichtbar. Dies liegt z.B. an der Vielzahl injizierter Effektoren, welche teilweise redundante Funktionen aufweisen. So transloziert *Xcv*, z.B., mindestens 20 verschiedene Effektorproteine in die Pflanzenzellen (329). Für weiterführende Analysen, z.B. nach Identifizierung von Virulenzzielen, sind jedoch sichtbare oder messbare Virulenzfunktionen notwendig. Veränderungen solcher sichtbaren Reaktionen nach „Silencing“ oder Überexpression eines Virulenzziel-protein kodierenden Gens können z.B. Aufschluss über die biologische Relevanz eines solchen Virulenzzielproteins geben. Die Verwendung der *Agrobacterium* vermittelter Expression erlaubte hier das isolierte Studium spezifisch durch AvrBs1, AvrBs3 oder AvrBs4 ausgelöster Effekte.

4.2.1. AvrBs3 und AvrBs4 können vermutlich der pflanzlichen Abwehr entgegenwirken

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass *Xcv*-Stämme, welche sowohl AvrBs1 als auch AvrBs3 translozieren, keine *Bs1*-spezifische HR in *C. annuum* cv. ECW-10R induzieren. Bei gleichzeitiger Translokation von AvrBs1 und dem nicht funktionalen AvrBs3 Δ AD wurde hingegen eine *Bs1*-spezifische HR ausgelöst. Diese Daten deuten darauf hin, dass AvrBs3, in Abhängigkeit der AD die AvrBs1-Erkennung in Paprika supprimiert. Die Notwendigkeit der AD legt die Vermutung nahe, dass die HR-Unterdrückung Folge der Aktivität von AvrBs3 als Transkriptionsaktivator ist, d.h. die Aktivierung bestimmter Gene durch AvrBs3 führt zur Unterdrückung der AvrBs1-spezifischen HR.

Interessanterweise wurde bereits für eine Anzahl von T3-Effektoren aus dem phytopathogenen Bakterium *P. syringae* eine Aktivität als Zelltodsuppressoren beobachtet (cell death suppressing (CDS) activity; 1, 77, 231). Darunter waren Effektoren, die als Protease, Tyrosinphosphatase oder E3-Ligase fungierten (2, 50, 95, 182). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint auch AvrBs3 aus *Xcv* eine solche CDS-Aktivität zu besitzen. Arbeiten von Keshavarzi und Mitarbeitern deuteten bereits an, dass Effektorproteine aus *Xcv* basale Abwehrmechanismen der Pflanze unterdrücken können, welche durch LPS hervorgerufen wurden (180). In den dabei erfolgten Studien wurde der *Xcv*-Stamm 85-10 verwendet, in welchem weder *avrBs3* noch *avrBs4* enthalten sind. Demnach scheinen in *Xcv* 85-10 andere Effektoren als Abwehrspressoren zu fungieren.

Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnissen zeigten kürzlich Studien von Fujikawa und Mitarbeitern, dass Mitglieder der AvrBs3-Familie die Basalabwehr der Pflanze, welche durch *P. fluorescens* induziert wird, unterdrücken können (110). In der vorliegenden Arbeit wurde die CDS-Aktivität von AvrBs3 unter natürlicheren Bedingungen bei Infiltration mit *Xanthomonas* gezeigt. Die HR-Unterdrückung wurde jedoch nur beobachtet, wenn der langsam wachsende *Xcv*-Stamm I74A verwendet wurde und nicht bei Infiltration mit dem Wildtyp-Stamm 85-10. Vermutlich transloziert *Xcv* 85-10 eine größere Anzahl an AvrBs1-Molekülen, so dass die, durch AvrBs1 induzierte, *Bs1* vermittelte HR zu schnell induziert wird, um effektiv durch AvrBs3 blockiert zu werden. Des Weiteren wurde der Effekt, ähnlich wie in anderen Studien, nur bei Infektion mit geringer Bakteriendichte beobachtet (171, 212). Diese Bedingungen könnten die natürlichen Bedingungen im Feld reflektieren, in welchen die Bakterien in geringer Dichte in die Pflanze gelangen.

Die Tatsache, dass auf Reis pathogene *Xoo*-Stämme eine Vielzahl von *avrBs3*-Homologen im Genom enthalten und viele *Xcv*-Stämme kein oder nur ein AvrBs3-Mitglied enthalten, deutet darauf hin, dass *Xcv* AvrBs3 bzw. AvrBs4 durch horizontalen Gentransfer erworben hat. Diese Hypothese unterstreichend werden beide *avr*-Gene auf Plasmiden kodiert (45, 47). Da *avrBs3* in *Xcv* positiv selektiert wurde, muss das Effektorprotein für das Pathogen von Vorteil sein. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine CDS-Aktivität von AvrBs3 *Xcv* befähigt, auch *Bs1* exprimierende Paprikapflanzen zu besiedeln, indem die Erkennung von AvrBs1 unterdrückt wird.

In aktuellen Studien wurde außerdem gezeigt, dass T3SS abhängig translozierte Proteine aus *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) die Gen-für-Gen-Erkennung AvrBs3-homologer Effektoren aus *Xoo* supprimieren (218). Auch der dabei untersuchte *Xoc*-Stamm exprimiert

mehrere *avrBs3*-homologe Gene (366). Daher ist es vorstellbar, dass in diesem Fall AvrBs3-Familienmitglieder eine Verzögerung der R-Protein vermittelten Zelltodreaktion verursachen. Die CDS-Aktivität von AvrBs3 könnte auch zur Verzögerung der nekrotischen Läsionen führen, welche im Endstadium der bakteriellen Fleckenkrankheit sichtbar werden. Dies wurde z.B. für HopPtoN aus *P. syringae* gezeigt (1, 212). Es wird angenommen, dass der programmierte Zelltod in Pflanzen quantitativ, durch eine bestimmte Signalanzahl, ausgelöst wird (309, 328). Daher ist es wahrscheinlich, dass Effektoren verschiedene positive und negative Regulatoren des PCD beeinflussen, um in der Summe effektiv die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu blockieren (1). Auch die bereits erwähnten Arbeiten von Kesharvazi *et al.* mit *Xcv* 85-10 deuten darauf hin (180). Tatsächlich wurden innerhalb der letzten Jahre, neben AvrBs3, weitere Effektoren von *Xcv* identifiziert, die eine CDS-Aktivität zeigen (L. Esclar, A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die molekularen Mechanismen der Zelltodsuppression sind allerdings noch unklar.

In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant die molekularen Mechanismen der HR-Unterdrückung aufzuklären. HopPtoD2 muss z.B. als Tyrosinphosphatase aktiv sein, um die durch *P. syringae* ausgelöste Pflanzenabwehr unterdrücken zu können (50, 95).

Die gleichzeitige Translokation von AvrBs1- und AvrBs3-Derivaten, denen NLS, LZ oder Teile der „Repeat“-Region fehlen, aus *Xcv*, könnten zunächst Aufschluss geben, welche Proteinbereiche für die HR-Unterdrückung notwendig sind. Da die AD von AvrBs3 für die CDS-Aktivität wichtig zu sein scheint, induziert AvrBs3 vermutlich die Expression verschiedener Pflanzengene, wodurch die AvrBs1-Erkennung blockiert wird. Eines der durch AvrBs3 induzierten Gene („genes upregulated by AvrBs3“, *upa*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor der ERF/AP2 („Ethylene Responsive Element Binding Factors/APETALA2“)-Familie (256). Transkriptionsfaktoren dieser Familie sind häufig an der Aktivierung der *PR*-Genexpression beteiligt. Das identifizierte Upa-Protein (Upa12) enthält jedoch ein EAR („*ERF-associated*“)-Repressormotiv (255), welches möglicherweise die *PR*-Gen-Aktivierung hemmt. Upa12 ist somit ein guter Kandidat, welcher nach Induktion durch AvrBs3, die pflanzliche Abwehr blockieren könnte. Demnach könnte getestet werden, ob Pflanzen, welche *upa12* exprimieren, in der Lage sind, AvrBs1 zu erkennen. Da *Bs1* noch nicht kloniert wurde und die Generierung transgener Paprikapflanzen sehr schwierig ist, muss ein entsprechendes Experiment in Paprika mittels *Agrobacterium* vermittelter Expression von *upa12* erfolgen. Anschließend könnte dann der AvrBs1 translozierende Stamm I74A mit niedriger Dichte infiltriert

werden. Um die Problematik der gleichzeitigen Infektion von Pflanzenteilen mit *Agrobacterium* und *Xanthomonas* zu umgehen, sollte *avrBs1* ebenfalls mittels *Agrobacterium* in der Pflanze exprimiert werden. Die Verwendung eines schwachen Promoters, z.B. des minimalen *Bs4*-Promoters (299), könnte dabei die Synthese einer niedrigeren Anzahl an AvrBs1-Molekülen ermöglichen, da von *Xcv I74A* auch nur wenige Effektormoleküle transloziert werden. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob auch andere Zelltodreaktionen von AvrBs3, bzw. von Upa12, unterdrückt werden. So könnten Ansätze mit *P. fluorescens* gewählt werden, um zu testen, ob AvrBs3 bzw. Upa12 die Basalabwehr der Pflanze unterdrücken, wie es für AvrXa7, AvrXa10 und Apl1 gezeigt wurde (110). Ebenso könnten andere *R*-Gen-spezifische Zelltodreaktionen untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Studien deuten auch für das AvrBs3-homologe Effektorprotein AvrBs4 eine die Abwehr supprimierende Funktion an. So zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass Blatt-Peroxisomen *avrBs4* exprimierender Zellen auffällig große Kristalle enthalten. Diese Kristalle, auch als „crystalline core“ bezeichnet, sind Anhäufungen des Enzyms Katalase (106). Katalase ist ein Enzym, welches das als Zellgift wirkende Wasserstoffperoxid durch Disproportionierung zu Sauerstoff und Wasser beseitigt. Wasserstoffperoxid wird in den Peroxisomen durch verschiedene Oxidationsprozesse sowie durch die Disproportionierung von Sauerstoffradikalen gebildet (79). Pathogenbefall induziert eine verstärkte Produktion von H_2O_2 und ROS, welche Zellschäden verursachen können, da die antioxidativen Enzyme, wie z.B. die Katalase, die erhöhte H_2O_2 -Menge nicht abbauen können (79). Dadurch kann das gebildete H_2O_2 aus den Peroxisomen in das Zytosol gelangen (78). H_2O_2 bewirkt Zelltodreaktionen während der HR, wirkt direkt toxisch auf Pathogene, ist Substrat für strukturelle Schutzbarrieren sowie Signalmolekül für die pflanzliche Abwehr (13, 17, 117, 237, 361). Speziell die systemisch erworbene Resistenz (SAR) aber auch lokale Abwehrreaktionen benötigen H_2O_2 (295). So wurde beispielsweise festgestellt, dass exogen zugegebene Katalase nekrotische Reaktionen bei Pathogenbefall verhindert und die Bildung von ROS während des „oxidative burst“ inhibiert (82, 223, 361). Interessanterweise wurde auch beobachtet, dass Tabakpflanzen mit reduziertem Katalasegehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenbefall zeigen (61, 235). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Signalmoleküle, welche die pflanzliche Abwehr induzieren, wie z.B. SA, die Katalaseaktivität in Tabak hemmen können (70).

Die bekannten Daten über pflanzliche Katalasen berücksichtigend, liegt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung des Katalasegehaltes in Peroxisomen von Pflanzenzellen eine Virulenzfunktion von AvrBs4 darstellt. Die durch AvrBs4 möglicherweise verursachte, vermehrte Produktion von Katalase könnte den genannten Effekten entgegenwirken und so die Abwehrreaktionen der Pflanze unterdrücken. Da die Kristalle nur nach Expression von *avrBs4* beobachtet wurden, handelt es sich um eine spezifisch durch AvrBs4 ausgelöste Katalasebildung und ist nicht auf *Agrobacterium* selbst zurückzuführen. In weiterführenden Experimenten könnte geprüft werden, ob AvrBs4 direkt die Expression des Katalasegens beeinflusst. Mit sensitiven Methoden wie quantitativen RT-PCR sollte die Expression des Katalasegens nach transienter Expression unterschiedlicher Effektorgene verglichen werden. Bei Induktion des Katalasegens durch AvrBs4 wäre auch interessant zu prüfen, ob AvrBs4 direkt an dessen Promotorregion binden kann. Des Weiteren könnte für verschiedene Pathogen-Wirt-Interaktionen getestet werden, ob bei gleichzeitiger Anwesenheit von AvrBs4 spezifische Abwehrreaktionen verzögert oder unterdrückt werden. Dabei sollte nicht nur die HR beobachtet, sondern auch die Katalaseaktivität wie in der Literatur beschrieben, bestimmt werden (84, 217). Interessanterweise wurde in Studien an dem Pilzpathogen *Botrytis cinerea* und dessen Interaktion mit Tomate eine Abnahme der Katalaseaktivität mit Beginn der Krankheitssymptome festgestellt. *Botrytis* ist jedoch anders als *Xcv* ein nekrotropes Pathogen, welches sich von totem Pflanzenmaterial ernährt. Somit ist es durchaus denkbar, dass verschiedene Pathogene unterschiedlich auf die Katalase wirken. In den weiteren Analysen sollte daher die Katalasemenge und deren Aktivität nicht nur nach Expression von *avrBs4* in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium*, sondern auch nach Infektion von Paprika- und Tomatenpflanzen mit AvrBs4-translozierender *Xcv*-Stämmen untersucht werden.

4.2.2. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren eine Hypertrophie der Mesophyllzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde in den mikroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass AvrBs1 eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen verursacht wie AvrBs3, obwohl beide Proteine keinerlei Homologie aufweisen. Das AvrBs3-homologe AvrBs4 hingegen induziert nur sehr geringe, kaum mikroskopisch sichtbare Vergrößerungen der Mesophyllzellen. Dies zeigt, dass die geringen Unterschiede der Aminosäuresequenzen

innerhalb der „Repeat“-Region stark voneinander abweichende Virulenzaktivitäten bedingen. Es zeigt aber auch, dass AvrBs4 einen Effekt, wenn auch einen geringen, auf die infizierten Zellen hat.

Die Vergrößerung von Pflanzenzellen benötigt (i) ein Wachstum der Zellwand, (ii) ein Wachstum der Zentralvakuole, um die Zelle zu stabilisieren sowie (iii) Energie für die genannten Aufbauprozesse. Die mikroskopischen Studien, in welchen die Zellwand und die Chloroplasten angefärbt wurden, nicht jedoch die Zentralvakuole, zeigten, dass *avrBs1* und *avrBs3* eine Vergrößerung der Vakuole und ein Streckenwachstum der Zellwand verursachen. Wird ein Zellstreckungswachstum induziert, so erfolgt zunächst ein Ionenstrom in die Vakuole, welcher einen Wassereinstrom zufolge hat. Dadurch werden der Tonoplast, die Plasmamembran und die Zellwand gedehnt. Interessanterweise wurden neben kleinen Vesikeln, welche wahrscheinlich Stoffe für den Zellwandaufbau enthalten, auch Membranstrukturen innerhalb der Zentralvakuolen beobachtet. Diese könnten möglicherweise nach der Streckung der Zentralvakuole mit dem Tonoplasten fusionieren. Die Chloroplasten von vergrößerten Pflanzenzellen, welche *avrBs1* oder *avrBs3* exprimieren, enthielten keine Stärkekörner. Nicht oder kaum vergrößerte Zellen von unbehandelten Pflanzen, *uidA* bzw. *avrBs4* exprimierenden Blattbereichen oder der Epidermis hingegen enthielten stets Stärkekörner. Dies deutet an, dass die Effektoren AvrBs1 und AvrBs3 auch einen Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben. Möglich ist, dass keine Speicherstärke gebildet wird, da die Kohlenhydrate zur Energiegewinnung für das Zellwachstum verwendet werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass bereits vorhandene Stärkekörner zur Energiegewinnung abgebaut werden.

Epidermiszellen zeigten keine Vergrößerung, obwohl *Agrobacterium* anders als *Xcv* auch dieses Gewebe infiziert. Das könnte dadurch erklärt werden, dass die Epidermiszellen sehr dicht angeordnet sind und von einer stabilen, dicken Kutikula nach außen begrenzt werden. Interzellularräume, in welche sich die Zellen ausdehnen könnten, fehlen.

Interessanterweise induzierte der *Xcv*-Stamm I74A(*avrBs3ΔAD*), welcher AvrBs1 und nicht funktionale AvrBs3ΔAD-Moleküle transloziert, in Paprika ECW einige Pusteln an der Blattoberfläche. Diese Pusteln könnten durch AvrBs1 ausgelöst worden sein. Überraschenderweise wurden in Paprika ECW-30R keine Pusteln beobachtet. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bewirkt AvrBs1 jedoch kaum Verlängerungen der Mesophyllzellen, sondern hauptsächlich deren Verbreiterung. Dies könnte erklären, wieso makroskopisch nicht immer Pusteln zu beobachten sind. Im Gegensatz dazu verursacht

AvrBs3 immer auch makroskopisch sichtbare Pusteln. Damit übereinstimmend waren in den hier erfolgten Analysen AvrBs3-synthetisierende Mesophyllzellen doppelt so lang wie *avrBs1*-exprimierende Mesophyllzellen von *N. benthamiana*.

Da I74A ein Derivat von *Xcv* 85-10 ist, welcher mindestens 20 Effektoren enthält (329), ist nicht auszuschließen, dass nicht AvrBs1, sondern ein anderer, noch nicht identifizierter Effektor für die Induktion der Pusteln verantwortlich ist.

Möglicherweise lösen nicht nur AvrBs1 und AvrBs3 Hypertrophiesymptome aus. Aufgrund der schnellen Etablierung der wässrigen Läsionen und der sich anschließenden Zerstörung des Gewebes bei Infektion durch Wildtyp-*Xcv*-Säume bleibt dies jedoch vermutlich unentdeckt. Die Erstellung multipler Mutanten könnte dabei helfen, weitere Effektoren zu identifizieren, die eine Hypertrophie induzieren können.

Es bleibt zu klären, wie und vor allem warum Effektoren eine Hypertrophie induzieren. Eine Möglichkeit ist, dass die Hypertrophie eine Freisetzung der bakteriellen Zellen an die Oberfläche der infizierten Pflanze ermöglicht. Das Pathogen könnte anschließend in neue, nicht-infizierte Bereiche eindringen. Für Avrb6 aus *X. campestris* pv. *malvacearum* und PthA aus *X. citri*, zwei Mitglieder der AvrBs3-Familie, wurde z.B. gezeigt, dass diese eine Freisetzung des Pathogens an die Pflanzenoberfläche bewirken (368). PthA induziert eine Hyperplasie des Gewebes, d.h., eine Vermehrung der Mesophyllzellen, so dass Tumore entstehen und das Gewebe zerstört wird, was die Freisetzung der Bakterien erklärt (53, 132, 322). Avrb6, jedoch, verursacht keine Hyperplasie, sondern eine Verstärkung der wässrigen Läsionen. Es wurde aber auch gezeigt, dass die *Agrobacterium* vermittelte Expression von *pthA* in *Citrus* nicht nur zu Hyperplasie, sondern auch zu Hypertrophie der Zellen führt (87). Auch für andere Xanthomonaden wurde eine Induktion von Hypertrophiesymptomen in der Pflanze beobachtet (167, 323). Es ist denkbar, dass während der Hypertrophie die Epidermiszellen, welche bedeckt von der Kutikula nicht ausweichen können, durch das Wachstum der Mesophyllzellen ebenfalls zerstört werden. Dies wurde jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Analysen nach Expression von *avrBs3* und *avrBs1* nicht beobachtet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bakterien nach ihrer Vermehrung durch die aus dem Zellwachstum folgende Reduktion des Interzellularraumes durch Stomata an die Blattoberfläche gedrückt werden. Um dies zu überprüfen sollten entsprechende Experimente nach Yang *et al.* (1994) erfolgen. Feldstudien beschrieben tatsächlich eine durch AvrBs3 bedingte bessere Verbreitung von *Xcv* (360).

Interessanterweise wurden auch bei der Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nematoden *Meloidogyne javanica* und Tomate stark vergrößerte Zellen („giant cells“) beobachtet, welche vom Gallengewebe umgeben sind (113). An dem Wachstum dieser so genannten „Riesenzellen“ sind Expansine beteiligt, die eine Auflockerung der Zellwand bewirken (113, 225). Auch bei der Induktion der Hypertrophie durch AvrBs3 spielen vermutlich Expansine eine Rolle. So wurde gezeigt, dass AvrBs3 die Expression von Paprikagenen induziert, deren Produkte Homologie zu α -Expansinen aufweisen (221). Ob auch AvrBs1 diese Gene induziert, könnte in weiterführenden Studien mittels RT-PCR-Ansätze geklärt werden. Die „Riesenzellen“ sind Teil der so genannten „Futterstelle“ („feeding site“), welche durch *M. javanica* induziert wird und den Nematoden mit Nährstoffen versorgt (362). Es ist demnach denkbar, dass auch die durch AvrBs3 und AvrBs1 induzierte Zellvergrößerung eine verbesserte Nährstoffzufuhr für *Xcv* bewirkt. Im Unterschied zu den vergrößerten „Riesenzellen“, welche mehrere Zellkerne enthalten, induzieren die *Xcv*-Effektoren jedoch keine Zellkernteilung in den Mesophyllzellen.

4.2.3. AvrBs3 induziert stärkere Transkriptionsaktivitäten in den Nukleoli als AvrBs4

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ultrastruktur der Peroxisomen, Mitochondrien, des ER und des Golgi-Apparates mikroskopisch untersucht. Dabei wurden keine, durch AvrBs1, AvrBs3 oder AvrBs4 ausgelösten Veränderungen deren Struktur beobachtet. Die untersuchten Organellen scheinen demnach intakt zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Organellen in ihrer Funktion nicht gestört sind.

Auffällig war, dass die Zellkerne, im Besonderen die darin befindlichen Nukleoli, in Zellen, welche *avrBs3* exprimierten, vergrößert waren. Des Weiteren enthielten vor allem die Nukleoli der *avrBs3* exprimierenden Zellen so genannte nukleoläre Vakuolen. In den Nukleoli erfolgt die Synthese der rRNA-Moleküle für den Aufbau von Ribosomen. Eine Vergrößerung der Nukleoli und die Entstehung nukleolärer Vakuolen weisen auf eine erhöhte Transkription der rRNA-Gene hin (120, 168, 308). Dies lässt darauf schließen, dass in der Pflanzenzelle eine erhöhte Anzahl an Ribosomen notwendig ist. Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass in den Zellen eine verstärkte Translation erfolgt. Übereinstimmend damit wurde in früheren Studien gezeigt, dass AvrBs3 im Zellkern lokalisiert und die Transkription pflanzlicher Gene induziert (221, 325; S. Kay und U.

Bonas, unveröffentlichte Daten). Überraschenderweise führte die Expression von *GFPavrBs3* in *N. benthamiana* zu GFP-fluoreszierenden Bereichen in den Nukleoli der Zellkerne (Abschnitt 3.2.1.). Interessanterweise ergaben Proteom-Analysen anderer Arbeitsgruppen sowie Sichtungen mit cDNA-Banken, welche zur Expression von *GFP*-Fusionen führten, eine Reihe unerwarteter im Nukleolus lokalisierter Proteine (308). Darunter waren auch Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang wurde der Nukleolus auch als „Parkplatz“ regulatorischer Proteine diskutiert (308). Diese Daten berücksichtigend, kann spekuliert werden, dass die Vergrößerung der Nukleoli teilweise auch durch eine Anhäufung des Effektorproteins AvrBs3 hervorgerufen wird. Dagegen spricht jedoch, dass die Nukleoli *avrBs4* exprimierender Zellen nicht vergrößert sind, obwohl auch *GFPavrBs4* in den Nukleoli detektiert wurde. Für AvrBs1 wurde weder eine Kernlokalisierung vorhergesagt noch wurden GFP-Fusionsproteine dieses Effektors im Zellkern nachgewiesen (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). AvrBs1 könnte aber auch indirekt Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie der Pflanze nehmen, indem es pflanzliche Transkriptionsregulatoren modifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen lassen jedoch nicht auf eine durch AvrBs1 verursachte, erhöhte Transkriptionsaktivität schließen. Diese Resultate deuten darauf hin, dass AvrBs1 andere molekulare Mechanismen nutzt als AvrBs3, um eine Hypertrophie zu induzieren.

Interessanterweise, wurden in Zellen, die das hoch-homologe *avrBs4* exprimierten, keine vergrößerten Nukleoli und kaum nukleolare Vakuolen beobachtet, obwohl AvrBs4 einige der durch AvrBs3 induzierten Gene ebenfalls aktiviert (221). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass AvrBs4 die Genexpression weniger stark beeinflusst als AvrBs3.

4.2.4. Ein erhöhter Austritt von Ionen aus Wirtszellen erfolgt nicht nur während der HR

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass AvrBs1 und AvrBs3, die beide eine Hypertrophie induzieren, auch eine Erhöhung des Ionenaustritts bewirken, wie er normalerweise bei einer HR in inkompatiblen Interaktionen gemessen wird (233). Im Falle von AvrBs1 wurden tatsächlich mikroskopisch und makroskopisch Zelltodreaktionen in *N. benthamiana* beobachtet. Dies deutet an, dass der Ionenaustritt nach Expression von *avrBs1* durch das Absterben einzelner Mesophyllzellen, ähnlich wie bei einer HR, ausgelöst wird. AvrBs3 löst jedoch einen ähnlich veränderten Ionenaustritt wie AvrBs1

aus, obwohl kaum nekrotische Reaktionen bei Expression von *avrBs3* beobachtet wurden. Eine Erhöhung des Ionenaustritts könnte demnach nicht nur das Resultat der Induktion einer HR in inkompatiblen Interaktionen, sondern auch eine Virulenzaktivität von T3-Effektoren sein, jedoch unabhängig von der Hypertrophie. Damit übereinstimmend wurde gezeigt, dass ein pflanzliches Protein, dessen Synthese von AvrBs3 induziert wird, für die Hypertrophie der Mesophyllzellen verantwortlich ist, aber keinen verstärkten Ionenaustritt bewirkt (S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Vorstellbar ist, dass die von der Pflanze freigesetzten Ionen direkt vom Pathogen für Aufbauprozesse genutzt werden. AvrBs4 induziert keinen verstärkten Ionenaustritt.

Es ist bemerkenswert, dass AvrBs4, welches eine hohe Ähnlichkeit zu AvrBs3 aufweist, weder eine starke Chlorose, noch eine stark ausgeprägte Hypertrophie, noch einen erhöhten Ionenaustritt oder eine mikroskopisch sichtbar erhöhte Translationsaktivität induziert, dafür aber vermutlich eine erhöhte Katalaseproduktion.

Die beobachteten, spezifisch von AvrBs1, AvrBs3 bzw. AvrBs4 induzierten Veränderungen in *N. benthamiana* sind hilfreich für weitere Analysen zur molekularen Funktion der Effektorproteine. Für jeden dieser Effektoren wurden bereits putative Interaktoren mittels Hefe-Di-Hybrid-Ansatz identifiziert (B. Szurek, D. Gürlebeck, J. Piprek, R. Szczesny, T. Lahaye, U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Für AvrBs3 wurde außerdem eine Vielzahl an induzierten Genen isoliert (221; E. Marois, S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Um die Relevanz der Interaktoren und induzierten Gene für die Pathogen-Wirt-Interaktion zu untersuchen, erfolgen vor allem „Silencing“- und Überexpressionsstudien. Bisher wurde dabei analysiert, ob die verminderte oder erhöhte Expression des untersuchten Gens einen Einfluss auf die Genotyp-spezifische HR hat. Für AvrBs3 konnten außerdem Veränderungen der Hypertrophie untersucht werden. In zukünftigen Studien könnte das Methodenspektrum erweitert werden und nun auch mikroskopische Analysen und Messungen des Ionenaustritts erfolgen. Es könnte außerdem überprüft werden, ob Interaktoren von AvrBs4 einen Einfluss auf den Katalasegehalt der Peroxisomen haben.

Die durchgeführten Arbeiten geben weitere Einblicke in die Funktionsweise von AvrBs3 aus *Xcv*. Abbildung 55 zeigt ein abschließendes Modell, in welchem bereits bekannte Daten und neue Resultate zusammengefasst dargestellt sind. In weiterführenden Arbeiten ist es nun interessant, (i) wie AvrBs3 von HpaB dissoziiert und durch den T3-Pilus gelangt,

(ii) ob AvrBs3 tatsächlich durch Bindung an LeThiC dessen Aktivität hemmt, (iii) ob AvrBs3 als Homodimer oder als Heterodimer mit LeML1 im pflanzlichen Zellkern agiert und (iv) welche Rolle weitere AvrBs3-Interaktoren spielen. Letztlich induziert AvrBs3 bestimmte pflanzliche Gene. Eines dieser kürzlich isolierten Gene (*upa20*) ist für die Induktion der Hypertrophie verantwortlich (S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es kann nun mikroskopisch untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen spezifisch durch Upa20 ausgelöst werden. Außerdem ist es interessant zu prüfen, ob *upa20* auch von AvrBs1 und AvrBs4 induziert wird.

Von besonderem Interesse ist vor allem die Identifizierung der AvrBs3-responsiven DNA-Bereiche. Dabei sollte getestet werden, ob AvrBs3 allein oder in einem größeren Proteinkomplex, z.B. an Aip8 (LeML1) gebunden, an die Promotorelemente bindet. Für AvrXa7 aus *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) wurde beispielsweise gezeigt, dass es direkt an DNA binden kann (366). Bisher wurde jedoch kein spezifisches DNA-Motiv identifiziert. Sowohl in Reis als auch in Paprika wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, welche durch AvrBs3-Familienmitglieder (auch als TAL („*transcription activator-like*“ bezeichnet; (364)) induziert werden (221, 364; E. Marois, S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die Isolierung der Promotoren dieser Gene und DNA-Protein-Interaktionsstudien mittels Hefe-Mono-Hybrid-Ansatz und „*electrophoretic mobility shift assay*“ (EMSA) könnten ein spezifische DNA-Sequenz identifizieren, an welche AvrBs3 oder andere TAL-Effektoren binden.

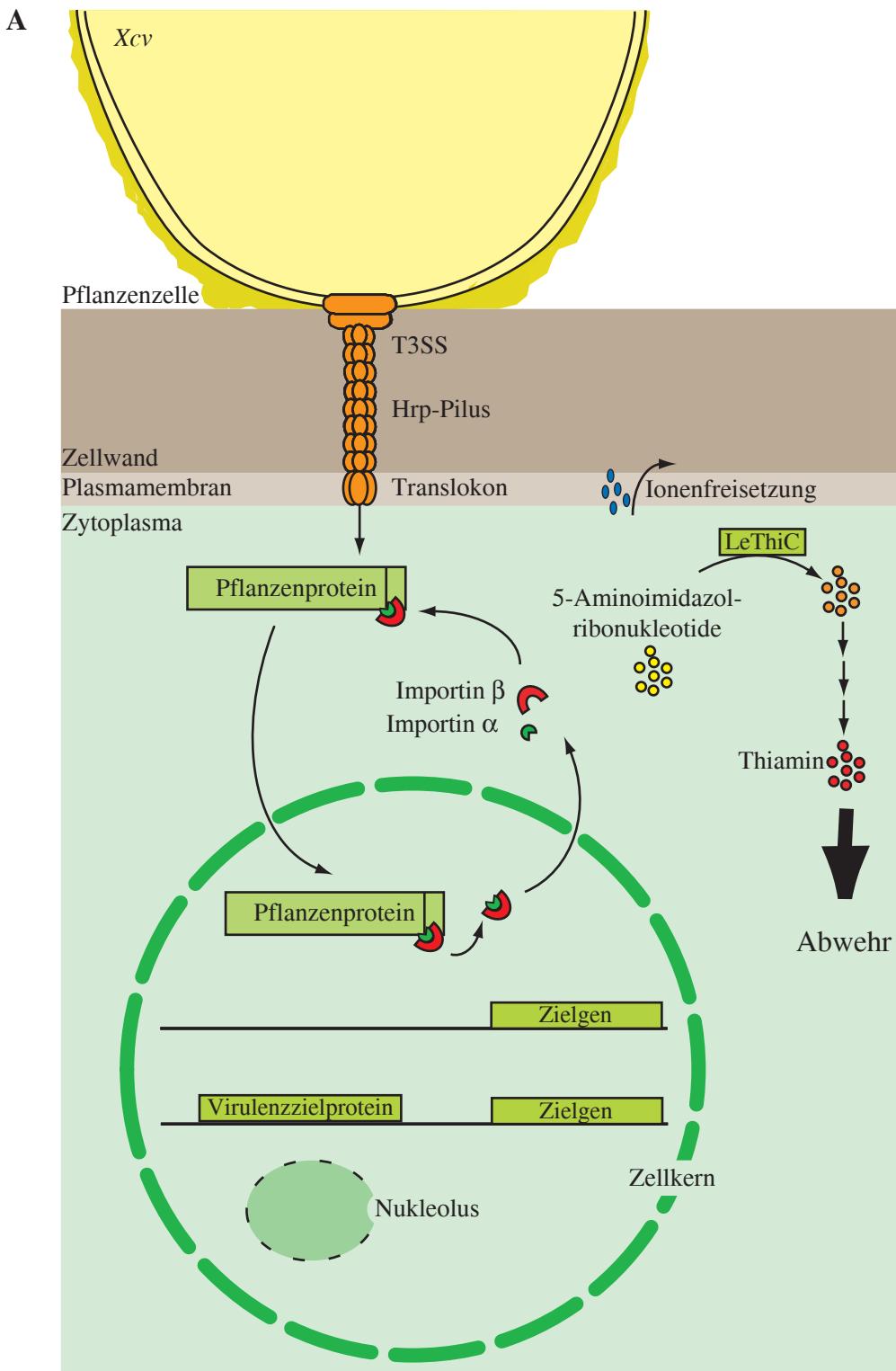
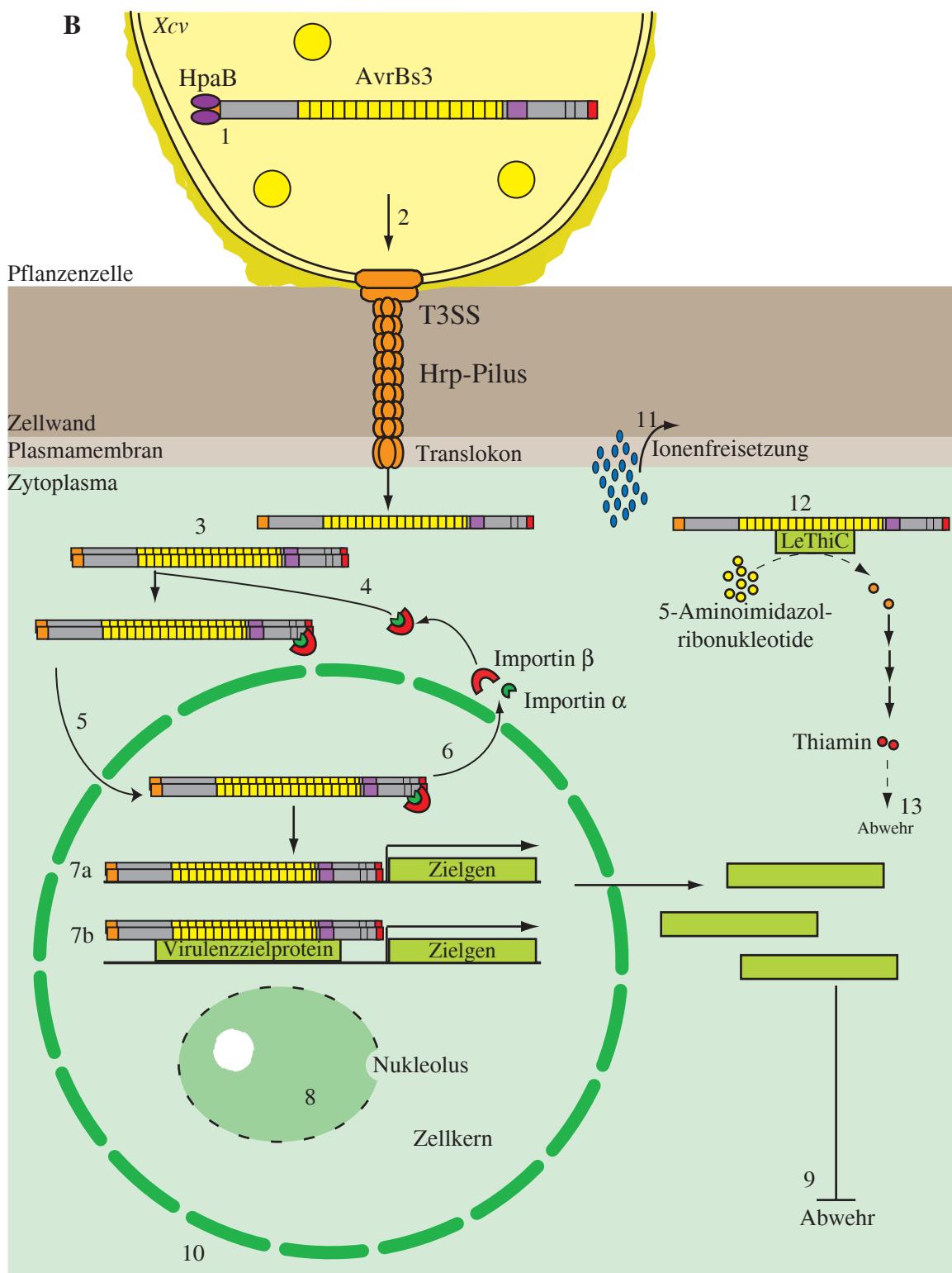


Abbildung 55: Aktuelles Modell zur Wirkungsweise von AvrBs3 aus *Xcv*. (A) zeigt die mögliche Situation nach Befall einer Pflanze mit *Xcv* ohne AvrBs3. (B) zeigt die molekulare Wirkungsweise von AvrBs3 und mögliche, durch AvrBs3 ausgelöste Veränderungen in der Pflanzenzelle: HpaB unterstützt vermutlich die Translokation von AvrBs3 durch Bindung an die N-terminalen 50 Aminosäuren des Effektors im Zytoplasma von *Xcv* (1-2). Im Zytoplasma der Wirtszelle dimerisiert AvrBs3 (3) und Importin α , gebunden an Importin β , bindet an die NLS des Effektors (4), wodurch der Kernimport von AvrBs3 vermittelt wird (5). Im Zellkern dissoziieren Importin α und β und werden in das Zytoplasma entlassen (6).



AvrBs3 agiert als Transkriptionsaktivator (7). Dafür könnte AvrBs3 direkt an Promotoren vor Virulenzzielgenen (7a) oder im Komplex mit einem gebundenen Virulenzzielprotein (z.B. LeML1, 7b) binden. Die resultierende erhöhte Genexpression in den Zellen führt zur verstärkten rRNA-Synthese und dadurch zur Vergrößerung der Nukleoli und zur Entstehung nukleolärer Vakuolen (8). Die Genprodukte könnten eine Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr (9), die Vergrößerung der Pflanzenzelle (10) und den verstärkten Ionenaustritt (11) bewirken. Ein Teil der AvrBs3-Moleküle könnte vor dem Kernimport mit LeThiC interagieren (12) und dadurch die Vitamin B1-Synthese inhibieren. Dies könnte zusätzlich zu einer verminderten Abwehr der Pflanze führen (13).

5. Literatur

1. **Abramovitch, R., and G. Martin.** 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:356-364.
2. **Abramovitch, R. B., R. Janjusevic, C. E. Stebbins, and G. B. Martin.** 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:2851-6.
3. **Abramovitch, R. B., Y. J. Kim, S. Chen, M. B. Dickman, and G. B. Martin.** 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* **22**:60-9.
4. **Abramovitch, R. B., and G. B. Martin.** 2005. AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**:1-8.
5. **Adam, S. A., and L. Gerace.** 1991. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* **66**:837-47.
6. **Agrios, G. N.** 1997. *Plant Pathology*, 4th edition ed. Academic Press, San Diego.
7. **Ahn, I. P., S. Kim, and Y. H. Lee.** 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.* **138**:1505-15.
8. **Aizawa, S. I.** 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:157-64.
9. **Akeda, Y., and J. E. Galan.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911-5.
10. **Alfano, J. R., A. O. Charkowski, W. L. Deng, J. L. Badel, T. Petnicki-Ocwieja, K. van Dijk, and A. Collmer.** 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4856-4851.
11. **Alfano, J. R., and A. Collmer.** 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**:1683-1698.
12. **Alfano, J. R., and A. Collmer.** 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**:385-414.
13. **Alvarez, M. E., R. I. Pennell, P. J. Meijer, A. Ishikawa, R. A. Dixon, and C. Lamb.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**:773-84.
14. **Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind.** 1999. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12839-12843.
15. **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1997. An mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**:1140-1143.
16. **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol. Microbiol.* **31**:1139-1148.
17. **Apostol, I., P. F. Heinstein, and P. S. Low.** 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells : Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* **90**:109-116.
18. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
19. **Auvray, F., J. Thomas, G. M. Fraser, and C. Hughes.** 2001. Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* **308**:221-9.
20. **Axtell, M. J., and B. J. Staskawicz.** 2003. Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**:369-377.

21. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006 0008.
22. **Baird, G. S., D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11241-6.
23. **Ballvora, A., M. Pierre, G. Van den Ackerveken, S. Schornack, O. Rossier, M. Ganal, T. Lahaye, and U. Bonas.** 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.
24. **Barny, M. A., M. H. Guinebretière, B. Marçais, E. Coissac, J. P. Paulin, and J. Laurent.** 1990. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol. Microbiol.* **4**:777-786.
25. **Barras, F., F. van Gijsegem, and A. K. Chatterjee.** 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:201-234.
26. **Baulcombe, D. C.** 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:109-113.
27. **Becker, S., B. Groner, and C. W. Muller.** 1998. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* **394**:145-51.
28. **Belanger, F. C., T. Leustek, B. Chu, and A. L. Kriz.** 1995. Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Mol. Biol.* **29**:809-21.
29. **Belkhadir, Y., Z. Nimchuk, D. A. Hubert, D. Mackey, and J. L. Dangl.** 2004. *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* **16**:2822-35.
30. **Bendahmane, A., K. Kanyuka, and D. C. Baulcombe.** 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**:781-791.
31. **Bender, C. L., F. Alarcon-Chaidez, and D. C. Gross.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **63**:266-92.
32. **Bent, A. F., R. W. Innes, J. R. Ecker, and B. J. Staskawicz.** 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:372-378.
33. **Bernhard, F., D. L. Coplin, and K. Geider.** 1993. A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. *Mol. Gen. Genet.* **239**:158-68.
34. **Bertheau, Y., E. Madgidi-Hervan, A. Kotoujansky, C. Nguyen-The, T. Andro, and A. Coleno.** 1984. Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or in titration curves. *Anal. Biochem.* **139**:383-9.
35. **Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* **9**:971-80.
36. **Blair, M. W., A. J. Garris, A. S. Iyer, B. Chapman, S. Kresovich, and S. R. McCouch.** 2003. High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **107**:62-73.
37. **B Blobel, G.** 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1496-500.
38. **Blocker, A., K. Komoriya, and S.-I. Aizawa.** 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:3027-3030.
39. **Blum H., Beier H., and Gross HJ.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**:93-99.
40. **Bogdanove, A. J., D. W. Bauer, and S. V. Beer.** 1998. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *J. Bacteriol.* **180**:2244-2247.

41. **Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem.** 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681-683.
42. **Bogdanove, A. J., J. F. Kim, Z. Wei, P. Kolchinsky, A. O. Charkowski, A. K. Conlin, A. Collmer, and S. V. Beer.** 1998. Homology and functional similarity of an *hrp*-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1325-30.
43. **Bogdanove, A. J., and G. B. Martin.** 2000. AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:8836-8840.
44. **Bonas, U.** 1994. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria, p. 79-98, *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals - Molecular and Cellular Mechanisms*, vol. 192. Springer-Verlag, Berlin.
45. **Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo.** 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.* **238**:261-269.
46. **Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 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**:81-88.
47. **Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz.** 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **218**:127-136.
48. **Boutell, C., and R. D. Everett.** 2003. The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53. *J. Biol. Chem.* **278**:36596-602.
49. **Boyd, A. P., I. Lamberton, and G. R. Cornelis.** 2000. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J. Bacteriol.* **182**:4811-21.
50. **Bretz, J. R., N. M. Mock, J. C. Charity, S. Zeyad, C. J. Baker, and S. W. Hutcheson.** 2003. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol. Microbiol.* **49**:389-400.
51. **Brown, I., J. Mansfield, and U. Bonas.** 1995. *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papillae deposition in pepper mesophyll cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:825-836.
52. **Brown, I. R., J. W. Mansfield, S. Taira, E. Roine, and M. Romantschuk.** 2001. Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:394-404.
53. **Brunings, A. M., and D. W. Gabriel.** 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* **4**:141-157.
54. **Budde, I. P., and M. S. Ullrich.** 2000. Interactions of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with host and nonhost plants in relation to temperature and phytotoxin synthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:951-61.
55. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:193-200.
56. **Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noël, and U. Bonas.** 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**:755-68.
57. **Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber, and U. Bonas.** 2006. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **59**:513-27.
58. **Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas.** 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **184**:2389-2398.

59. **Canteros, B. J.** 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. University of Florida.
60. **Casper-Lindley, C., D. Dahlbeck, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz.** 2002. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:8336-8341.
61. **Chamnongpol, S., H. Willekens, W. Moeder, C. Langebartels, H. Sandermann, Jr., M. Van Montagu, D. Inzé, and W. Van Camp.** 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:5818-23.
62. **Cheng, L. W., D. M. Anderson, and O. Schneewind.** 1997. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. **24**:757-765.
63. **Ciesiolska, L. D., T. Hwin, J. D. Gearlds, G. V. Minsavage, R. Saenz, M. Bravo, V. Handley, S. M. Conover, H. Zhang, J. Caporgno, N. B. Phengrasamy, A. O. Toms, R. E. Stall, and M. C. Whalen.** 1999. Regulation of expression of avirulence gene *avrRv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBst*. Mol. Plant-Microbe Interact. **12**:35-44.
64. **Coaker, G., A. Falick, and B. Staskawicz.** 2005. Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. Science **308**:548-50.
65. **Cohn, J., G. Sessa, and G. B. Martin.** 2001. Innate immunity in plants. Curr. Opin. Immunol. **13**:55-62.
66. **Collier-Hyams, L. S., H. Zeng, J. Sun, A. D. Tomlinson, Z. Q. Bao, H. Chen, J. L. Madara, K. Orth, and A. S. Neish.** 2002. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. J. Immunol. **169**:2846-50.
67. **Collmer, A., M. Lindeberg, T. Petnicki-Ocwieja, D. J. Schneider, and J. R. Alfano.** 2002. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. Trends Microbiol. **10**:462-9.
68. **Condemeine, G., A. Castillo, F. Passeri, and C. Enard.** 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant-Microbe Interact. **12**:45-52.
69. **Connell-Crowley, L., M. J. Solomon, N. Wei, and J. W. Harper.** 1993. Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A *in vitro*. Mol. Biol. Cell **4**:79-92.
70. **Conrath, U., Z. Chen, J. R. Ricigliano, and D. F. Klessig.** 1995. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:7143-7.
71. **Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, and J. Kuriyan.** 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. Cell **94**:193-204.
72. **Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. **54**:735-774.
73. **Cunnac, S., A. Occhialini, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin.** 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Mol. Microbiol. **53**:115-28.
74. da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai,

75. **F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima.** 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-63.
76. **Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding.** 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* **3**:3323-3328.
77. **Day, B., D. Dahlbeck, and B. J. Staskawicz.** 2006. NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
78. **DebRoy, S., R. Thilmony, Y.-B. Kwack, K. Nomura, and S. Y. He.** 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:9927-9932.
79. **del Rio, L. A., F. J. Corpas, L. M. Sandalio, J. M. Palma, M. Gomez, and J. B. Barroso.** 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp. Bot.* **53**:1255-72.
80. **del Rio, L. A., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma, and J. B. Barroso.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* **141**:330-5.
81. **Denny, T. P.** 1995. Involvement of bacterial polysaccharide in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:173-197.
82. **Deslandes, L., J. Olivier, N. Peeters, D. X. Feng, M. Khounloham, C. Boucher, I. Somssich, S. Genin, and Y. Marco.** 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8024-8029.
83. **Dharmapuri, S., and R. V. Sonti.** 1999. A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**:53-59.
84. **Dhindsa, R. S., P. Plumb-Dhindsa, and T. A. Thorpe.** 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp. Bot.* **32**:91-101.
85. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:414-424.
86. **Dow, J. M., A. E. Osbourn, T. J. Wilson, and M. J. Daniels.** 1995. A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:768-777.
87. **Duan, Y. P., A. Castaneda, G. Zhao, G. Erdos, and D. W. Gabriel.** 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**:556-560.
88. **Duarte, X., C. T. Anderson, M. Grimson, R. D. Barabote, R. E. Strauss, L. S. Gollahon, and M. J. San Francisco.** 2000. *Erwinia chrysanthemi* strains cause death of human gastrointestinal cells in culture and express an intimin-like protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**:81-6.
89. **Ehrbar, K., A. Friebel, S. I. Miller, and W. D. Hardt.** 2003. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1. *J. Bacteriol.* **185**:6950-67.
90. **Ehrbar, K., S. Hapfelmeier, B. Stecher, and W. D. Hardt.** 2004. InvB is required for type III-dependent secretion of SopA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **186**:1215-9.
91. **Ellis, J., and P. Dodds.** 2003. Plant pathology: monitoring a pathogen-targeted host protein. *Curr. Biol.* **13**:R400-R402.
92. **Ellis, R. J., and S. M. van der Vies.** 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:321-47.

93. **El-Maarouf, H., M. A. Barny, J. P. Rona, and F. Bouteau.** 2001. Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett.* **497**:82-84.
94. **Escolar, L., G. van den Ackerveken, O. Rossier, S. Pieplow, and U. Bonas.** 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* **2**:287-296.
95. **Espinosa, A., M. Guo, V. C. Tam, Z. Q. Fu, and J. R. Alfano.** 2003. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* **49**:377-87.
96. **Estojak, J., R. Brent, and E. A. Golemis.** 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Molecular Cellular Biology* **15**:5820-9.
97. **Fehr, D., C. Casanova, A. Liverman, H. Blazkova, K. Orth, D. Dobbelaere, J. Frey, and S. E. Burr.** 2006. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology* **152**:2809-18.
98. **Feldman, M. F., and G. R. Cornelis.** 2003. The multitalented type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**:151-8.
99. **Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas.** 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:390-396.
100. **Fenselau, S., and U. Bonas.** 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:845-854.
101. **Feys, B. F., C. E. Benedetti, C. N. Penfold, and J. G. Turner.** 1994. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**:751-759.
102. **Flor, H. H.** 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Gen.* **8**:29-54.
103. **Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
104. **Fontes, M. R., T. Teh, and B. Kobe.** 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* **297**:1183-94.
105. **Forsberg, A., and H. Wolf-Watz.** 1990. Genetic analysis of the *yopE* region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, *yerA*, regulating *yopE* expression. *J. Bacteriol.* **172**:1547-1555.
106. **Frederick, S. E., and E. H. Newcomb.** 1969. Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *J. Cell. Biol.* **43**:343-53.
107. **Freialdenhoven, A., C. Peterhansel, J. Kurth, F. Kreuzaler, and P. Schulze-Lefert.** 1996. Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **8**:5-14.
108. **Freialdenhoven, A., B. Scherag, K. Hollricher, D. B. Collinge, H. Thordal-Christensen, and P. Schulze-Lefert.** 1994. *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla₁₂*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* **6**:983-994.
109. **Frydman, J.** 2001. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:603-47.
110. **Fujikawa, T., H. Ishihara, J. E. Leach, and S. Tsuyumu.** 2006. Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:342-9.
111. **Gabriel, D. W.** 1999. The *Xanthomonas* *avr/pth* gene family, p. 39-55. In G. Stacey and N. T. Keen (ed.), *Plant-Microbe Interactions*, vol. 4. APS Press, St. Paul, Minnesota.
112. **Gabriel, D. W., and B. G. Rolfe.** 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**:365-391.

113. **Gal, T. Z., E. R. Aussenberg, S. Burdman, Y. Kapulnik, and H. Koltai.** 2006. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta* **224**:155-62.
114. **Gaudriault, S., L. Malandrin, J. P. Paulin, and M. A. Barny.** 1997. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol. Microbiol.* **26**:1057-69.
115. **Gauthier, A., and B. B. Finlay.** 2003. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:6747-55.
116. **Gauthier, A., N. A. Thomas, and B. B. Finlay.** 2003. Bacterial injection machines. *J. Biol. Chem.* **278**:25273-6.
117. **Gechev, T. S., and J. Hille.** 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **168**:17-20.
118. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **68**:771-795.
119. **Gietz, R. D., and R. A. Woods.** 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87-96.
120. **Gonzalez-Camacho, F., and F. J. Medina.** 2006. The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. *Histochem. Cell. Biol.* **125**:139-53.
121. **Gopalan, S., D. W. Bauer, J. R. Alafano, A. O. Loniello, S. Y. He, and A. Collmer.** 1996. Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell* **8**:1095-1105.
122. **Görlich, D.** 1998. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* **17**:2721-2727.
123. **Görlich, D., S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann, and S. Prehn.** 1995. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**:383-92.
124. **Görlich, D., S. Prehn, R. A. Laskey, and E. Hartmann.** 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**:767-778.
125. **Görlich, D., F. Vogel, A. D. Mills, E. Hartmann, and R. A. Laskey.** 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**:246-248.
126. **Greenberg, J. T.** 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **48**:525-545.
127. **Greenberg, J. T., A. Guo, D. F. Klessig, and F. M. Ausubel.** 1994. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**:551-563.
128. **Greenberg, J. T., and N. Yao.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**:201-211.
129. **Gu, K., D. Tian, F. Yang, L. Wu, C. Sreekala, D. Wang, G. L. Wang, and Z. Yin.** 2004. High-resolution genetic mapping of *Xa27(t)*, a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* **108**:800-7.
130. **Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, F. F. White, and Z. Yin.** 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**:1122-5.
131. **Gürlebeck, D., B. Szurek, and U. Bonas.** 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* **42**:175-87.
132. **Gürlebeck, D., F. Thieme, and U. Bonas.** 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol.* **163**:233-55.
133. **Guttman, D. S., and J. T. Greenberg.** 2001. Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:145–155.

134. **Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg.** 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**:1722-6.
135. **Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent.** 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791-803.
136. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
137. **Hammond-Kosack, K. E., and J. D. G. Jones.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**:1773-1791.
138. **Hauck, P., R. Thilmann, and S. Y. He.** 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:1431173100.
139. **He, P., L. Shan, N. C. Lin, G. B. Martin, B. Kemmerling, T. Nürnberg, and J. Sheen.** 2006. Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**:563-75.
140. **He, S. Y.** 1998. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:363-392.
141. **He, S. Y., K. Nomura, and T. S. Whittam.** 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:181-206.
142. **Heath, M. C.** 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**:321-334.
143. **Heath, M. C.** 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:315-9.
144. **Hendrick, C. A., and L. Sequeira.** 1984. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:94-101.
145. **Herbers, K., J. Conrads-Strauch, and U. Bonas.** 1992. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* **356**:172-174.
146. **Hochstrasser, M.** 2000. Biochemistry: All in the ubiquitin family. *Science* **289**:563-4.
147. **Hochstrasser, M.** 2000. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat. Cell. Biol.* **2**:E153-7.
148. **Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett.** 2003. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. *Mol. Microbiol.* **50**:377-389.
149. **Hu, C. D., Y. Chinenvov, and T. K. Kerppola.** 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**:789-98.
150. **Hu, W., J. Yuan, Q. L. Jin, P. Hart, and S. Y. He.** 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:234-241.
151. **Huang, J., Q. Huang, X. Zhou, M. M. Shen, A. Yen, S. X. Yu, G. Dong, K. Qu, P. Huang, E. M. Anderson, S. Daniel-Issakani, R. M. Buller, D. G. Payan, and H. H. Lu.** 2004. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **279**:54110-6.
152. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
153. **Huguet, E., and U. Bonas.** 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:488-498.
154. **Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas.** 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.
155. **Imamoto, N., T. Tachibana, M. Matsubae, and Y. Yoneda.** 1995. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. *J. Biol. Chem.* **270**:8559-65.

156. **Ishihara, H., G. Ponciano, J. E. Leach, and S. Tsuyumu.** 2004. Functional analysis of the 3' end of *avrBs3/pthA* genes from two *Xanthomonas* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **63**:329-338.
157. **Iyer, A. S., and S. R. McCouch.** 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:1348-54.
158. **Jackson, R. W., E. Athanassopoulos, G. Tsiamis, J. W. Mansfield, A. Sesma, D. L. Arnold, M. J. Gibbon, J. Murillo, J. D. Taylor, and A. Vivian.** 1999. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10875-10880.
159. **James, P., J. Halladay, and E. A. Craig.** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-36.
160. **Jamir, Y., M. Guo, H. S. Oh, T. Petnicki-Ocwieja, S. Chen, X. Tang, M. B. Dickman, A. Collmer, and J. R. Alfano.** 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* **37**:554-65.
161. **Janjusevic, R., R. B. Abramovitch, G. B. Martin, and C. E. Stebbins.** 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* **311**:222-6.
162. **Jia, Y., S. A. McAdams, G. T. Bryan, H. P. Hershey, and B. Valent.** 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**:4004-4014.
163. **Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones, and S. Y. He.** 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **40**:1129-39.
164. **Jones, A. M., and J. L. Dangl.** 1996. Logjam at the Styx : programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* **1**:114-119.
165. **Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad.** 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:755-62.
166. **Jones, J. B., R. E. Stall, and H. Bouzar.** 1998. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:41-58.
167. **Jones, S. B., and W. F. Fett.** 1987. Bacterial pustule disease of soybean: Microscopy of pustule development in a susceptible cultivar. *Phytopathol.* **77**:266-274.
168. **Jordan, E. G.** 1984. Nucleolar nomenclature. *J Cell. Sci.* **67**:217-20.
169. **Joshi, C. P.** 1987. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* **15**:6643-53.
170. **Julliard, J. H., and R. Douce.** 1991. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2042-5.
171. **Kang, L., X. Tang, and K. S. Mysore.** 2004. *Pseudomonas* Type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:1328-36.
172. **Kao, C. C., E. Barlow, and L. Sequeira.** 1992. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* **174**:1068-1071.
173. **Karimi, M., D. Inzé, and A. Depicker.** 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**:193-5.
174. **Karpova, T. S., C. T. Baumann, L. He, X. Wu, A. Grammer, P. Lipsky, G. L. Hager, and J. G. McNally.** 2003. Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc.* **209**:56-70.
175. **Kay, S., J. Boch, and U. Bonas.** 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:838-848.
176. **Kearney, B., and B. J. Staskawicz.** 1990. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene, *avrBs2*. *Nature* **346**:385-386.

177. **Keen, N. T.** 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. **24**:447-463.
178. **Keen, N. T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz, and W. Belser.** 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **159**:825-31.
179. **Kenny, B., C. Chervaux, and I. B. Holland.** 1994. Evidence that residues -15 to -46 of the haemolysin secretion signal are involved in early steps in secretion, leading to recognition of the translocator. Mol. Microbiol. **11**:99-109.
180. **Keshavarzi, M., S. Soylu, I. Brown, U. Bonas, M. Nicole, J. Rossiter, and J. Mansfield.** 2004. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Plant-Microbe Interact. **17**:805-15.
181. **Kim, B. S., and R. W. Hartmann.** 1985. Inheritance of a gene (*Bs*₃) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis. **69**:233-235.
182. **Kim, H. S., D. Desveaux, A. U. Singer, P. Patel, J. Sondek, and J. L. Dangl.** 2005. The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**:6496-501.
183. **Kim, J. F., J. H. Ham, D. W. Bauer, A. Collmer, and S. V. Beer.** 1998. The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. Mol. Plant-Microbe Interact. **11**:563-7.
184. **Kim, Y. S., K. Nosaka, D. M. Downs, J. M. Kwak, D. Park, I. K. Chung, and H. G. Nam.** 1998. A *Brassica* cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. Plant Mol. Biol. **37**:955-66.
185. **Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity, p. 149-177. In M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), Phytopathogenic prokaryotes, vol. 2. Academic Press, New York.
186. **Knogge, W.** 1996. Fungal Infection of Plants. Plant Cell **8**:1711-1722.
187. **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. **173**:7142-7150.
188. **Kobe, B., and J. Deisenhofer.** 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. Nature **366**:751-756.
189. **Koebnik, R.** 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. Trends Microbiol. **9**:586-590.
190. **Koebnik, R., A. Krüger, F. Thieme, A. Urban, and U. Bonas.** 2006. Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. J. Bacteriol. **188**:7652-60.
191. **Koehler, C. M., S. Merchant, and G. Schatz.** 1999. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. Trends Biochem. Sci. **24**:428-32.
192. **Köhm, B. A., M. G. Goulden, J. E. Gilbert, T. A. Kavanagh, and D. C. Baulcombe.** 1993. A potato virus X resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. Plant Cell **5**:913-920.
193. **Kombrink, E., and I. E. Somssich.** 1995. Defense responses of plants to pathogens, p. 1-34, Ad. Bot. Res., vol. 21.
194. **Komeili, A., and E. K. O'Shea.** 2001. New perspectives on nuclear transport. Annu. Rev. Genet. **35**:341-64.
195. **Lacomme, C., and S. Santa Cruz.** 1999. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:7956-7961.
196. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
197. **Lahaye, T., and U. Bonas.** 2001. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. Trends Plant Sci. **6**:479-485.

198. **Lamb, C., and R. A. Dixon.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**:251-275.
199. **Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**:1759-64.
200. **Lee, B. M., Y. J. Park, D. S. Park, H. W. Kang, J. G. Kim, E. S. Song, I. C. Park, U. H. Yoon, J. H. Hahn, B. S. Koo, G. B. Lee, H. Kim, H. S. Park, K. O. Yoon, J. H. Kim, C. H. Jung, N. H. Koh, J. S. Seo, and S. J. Go.** 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* **33**:577-86.
201. **Lee, J., B. Klusener, G. Tsiamis, C. Stevens, C. Neyt, A. P. Tampakaki, N. J. Panopoulos, J. Noller, E. W. Weiler, G. R. Cornelis, J. W. Mansfield, and T. Nürnberg.** 2001. *HrpZ_{Psp}* from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore invitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:289-294.
202. **Lee, S. H., and J. E. Galan.** 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **51**:483-95.
203. **Leister, R. T., and F. Katagiri.** 2000. A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J.* **22**:345-54.
204. **Letzelter, M., I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G. R. Cornelis.** 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J.* **25**:3223-33.
205. **Lichtenstein, C. P., and J. Draper.** 1985. Genetic engineering of plants. *DNA Cloning Vol. II. Edited by Glover, D.M. London. IRL Press*:108.
206. **Lindgren, P. B.** 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:129-152.
207. **Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. Panopoulos.** 1986. Gene-cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* **168**:512-522.
208. **Liu, Y., M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar.** 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* **31**:777-786.
209. **Liu, Y., M. Schiff, R. Marathe, and S. P. Dinesh-Kumar.** 2002. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**:415-29.
210. **Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* **39**:520-532.
211. **Lloyd, S. A., M. Sjostrom, S. Andersson, and H. Wolf-Watz.** 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol. Microbiol.* **43**:51-59.
212. **Lopez-Solanilla, E., P. A. Bronstein, A. R. Schneider, and A. Collmer.** 2004. HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol. Microbiol.* **54**:353-65.
213. **Lorang, J. M., H. Shen, D. Kobayashi, D. Cooksey, and N. T. Keen.** 1994. *avrA* and *avrE* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23 play a role in virulence on tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:508-515.
214. **Lu, P., R. Porat, J. A. Nadeau, and S. D. O'Neill.** 1996. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**:2155-68.
215. **Mackey, D., Y. Belkhadir, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and J. L. Dangl.** 2003. *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**:379-489.

216. **Mackey, D., B. F. Holt, A. Wiig, and J. L. Dangl.** 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**:743–754.
217. **Maehly, A. C., and B. Chance.** 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* **1**:357-424.
218. **Makino, S., A. Sugio, F. White, and A. J. Bogdanove.** 2006. Inhibition of resistance gene-mediated defense in rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:240-9.
219. **Marathe, R., and S. P. Dinesh-Kumar.** 2003. Plant defense: one post, multiple guards?! *Mol. Cell* **11**:284-286.
220. **Marie, C., W. J. Broughton, and W. J. Deakin.** 2001. *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:336–342.
221. **Marois, E., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 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.
222. **Martin, S. J., D. R. Green, and T. G. Cotter.** 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **19**:26-30.
223. **Masuta, C., M. Van den Bulcke, G. Bauw, M. Van Montagu, and A. B. Caplan.** 1991. Differential effects of elicitors on the viability of rice suspension cells. *Plant Physiol.* **97**:619-629.
224. **McBride, K. M., G. Banninger, C. McDonald, and N. C. Reich.** 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J.* **21**:1754-63.
225. **McQueen-Mason, S.** 1997. Plant cell walls and the control of growth. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:204-14.
226. **Mehdy, M. C., Y. K. Sharma, K. Sathasivan, and N. W. Bays.** 1996. The role of active oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* **98**:365-374.
227. **Menard, R., P. Sansonetti, C. Parsot, and T. Vasselon.** 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**:515-525.
228. **Meng, X., J. M. Bonasera, J. F. Kim, R. M. Nissinen, and S. V. Beer.** 2006. Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:53-61.
229. **Meshi, T., and M. Iwabuchi.** 1995. Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol.* **36**:1405-20.
230. **Messiaen, J., F. Nerinckx, and P. Van Cutsem.** 1995. Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant Cell Physiol.* **36**:1213-20.
231. **Metz, M., D. Dahlbeck, C. Q. Morales, B. Al Sady, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz.** 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **41**:801-14.
232. **Mindrinos, M., F. Katagiri, G. L. Yu, and F. M. Ausubel.** 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**:1089-1099.
233. **Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:41-47.
234. **Mittal, S., and K. R. Davis.** 1995. Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:165-171.
235. **Mittler, R., E. H. Herr, B. L. Orvar, W. van Camp, H. Willekens, D. Inzé, and B. E. Ellis.** 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14165-70.

236. Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**:882-7.
237. Montillet, J. L., S. Chamnongpol, C. Rusterucci, J. Dat, B. van de Cotte, J. P. Agnel, C. Battesti, D. Inze, F. Van Breusegem, and C. Trianaphylides. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **138**:1516-26.
238. Mucyn, T. S., A. Clemente, V. M. Andriotis, A. L. Balmuth, G. E. Oldroyd, B. J. Staskawicz, and J. P. Rathjen. 2006. The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase *in vivo* to regulate specific plant immunity. *Plant Cell*.
239. Mudgett, M. B. 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**:509-531.
240. Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, O. Rossier, U. Bonas, and B. J. Staskawicz. 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13324-9.
241. Mukherjee, S., G. Keitany, Y. Li, Y. Wang, H. L. Ball, E. J. Goldsmith, and K. Orth. 2006. *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**:1211-4.
242. Mysore, K. S., and C. M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9**:97-104.
243. Nakamura, M., H. Katsumata, M. Abe, N. Yabe, Y. Komeda, K. T. Yamamoto, and T. Takahashi. 2006. Characterization of the class IV homeodomain-Leucine Zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**:1363-75.
244. Napoli, C., and B. Staskawicz. 1987. Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**:572-578.
245. Newman, M. A., J. Conradsstrauch, G. Scofield, M. J. Daniels, and J. M. Dow. 1994. Defense-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:553-563.
246. Newman, M.-A., E. Von Roepenack, M. Daniels, and M. Dow. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* **1**:25-31.
247. Niepold, F., D. Anderson, and D. Mills. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:406-410.
248. Nimchuk, Z., E. Marois, S. Kjemtrup, R. T. Leister, F. Katagiri, and J. L. Dangl. 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**:353-363.
249. Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **185**:7092-102.
250. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **41**:1271-1281.
251. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* **184**:1340-1348.
252. Nürnberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**:249-266.
253. Nürnberger, T., and D. Scheel. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**:372-379.

254. **Ochiai, H., Y. Inoue, M. Takeya, A. Sasaki, and H. Kaku.** 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. Jap. Agricult. Res. Quart. **39**:275-287.
255. **Ohta, M., K. Matsui, K. Hiratsu, H. Shinshi, and M. Ohme-Takagi.** 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. Plant Cell **13**:1959-68.
256. **Okamuro, J. K., B. Caster, R. Villarroel, M. Van Montagu, and K. D. Jofuku.** 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:7076-81.
257. **Orth, K.** 2002. Function of the *Yersinia* effector YopJ. Curr. Opin. Microbiol. **5**:38-43.
258. **Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon.** 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. Science **285**:1920-1923.
259. **Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon.** 2000. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, ubiquitin-like protein protease. Science **290**:1594-1597.
260. **Osiecki, J. C., J. Barker, W. L. Picking, A. B. Serfis, E. Berring, S. Shah, A. Harrington, and W. D. Picking.** 2001. IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. Mol. Microbiol. **42**:469-81.
261. **Page, A. L., and C. Parsot.** 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. Mol. Microbiol. **46**:1-11.
262. **Page, A. L., P. Sansonetti, and C. Parsot.** 2002. Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. Mol. Microbiol. **43**:1533-42.
263. **Pallen, M. J., C. W. Penn, and R. R. Chaudhuri.** 2005. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. Trends Microbiol. **13**:143-9.
264. **Palma, K., Y. Zhang, and X. Li.** 2005. An importin alpha homolog, MOS6, plays an important role in plant innate immunity. Curr. Biol. **15**:1129-35.
265. **Parsot, C., C. Hamiaux, and A. L. Page.** 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. Curr. Opin. Microbiol. **6**:7-14.
266. **Pelham, H. R.** 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. Trends Biochem. Sci. **15**:483-6.
267. **Perino, C., S. Gaudriault, B. Vian, and M. A. Barny.** 1999. Visualization of harpin secretion in planta during infection of apple seedlings by *Erwinia amylovora*. Cell. Microbiol. **1**:131-141.
268. **Peterhänsel, C., A. Freialdenhoven, J. Kurth, R. Kolsch, and P. Schulze-Lefert.** 1997. Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. Plant Cell **9**:1397-1409.
269. **Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer, and J. R. Alfano.** 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:7652-7657.
270. **Pinto, E., M. Pedersen, P. Snoeijs, L. Van Nieuwerburgh, and P. Colepicolo.** 2002. Simultaneous detection of thiamine and its phosphate esters from microalgae by HPLC. Biochem. Biophys. Res. Commun. **291**:344-8.
271. **Proudfoot, N. J., and G. G. Brownlee.** 1976. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature **263**:211-4.
272. **Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B. L. Jiang, S. Zeng, W. Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G. P. Zhao, J. L. Tang, and C. He.** 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Genome Res. **15**:757-67.

273. **Racape, J., L. Belbahri, S. Engelhardt, B. Lacombe, J. Lee, J. Lochman, A. Marais, M. Nicole, T. Nürnberg, F. Parlange, S. Puverel, and H. Keller.** 2005. Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Mol. Microbiol.* **58**:1406-20.
274. **Rao, S. R., and G. A. Ravishankar.** 2000. Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *J. Biotechnol.* **76**:137-46.
275. **Rathjen, J. P., J. H. Chang, B. J. Staskawicz, and R. W. Michelmore.** 1999. Constitutively active *Pto* induces a *Pif*-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*. *EMBO J.* **18**:3232-3240.
276. **Ray, S. K., R. Rajeshwari, Y. Sharma, and R. V. Sonti.** 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**:637-47.
277. **Reuber, T. L., and F. M. Ausubel.** 1996. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the *RPS2* and *RPM1* disease resistance genes. *Plant Cell* **8**:241-249.
278. **Ribeiro, A., U. Praekelt, A. D. Akkermans, P. A. Meacock, A. van Kammen, T. Bisseling, and K. Pawlowski.** 1996. Identification of *agthi1*, whose product is involved in biosynthesis of the thiamine precursor thiazole, in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant J.* **10**:361-8.
279. **Riechmann, J. L., and O. J. Ratcliffe.** 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:423-34.
280. **Ritter, C., and J. L. Dangl.** 1996. Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *Plant Cell* **8**:251-257.
281. **Roden, J., L. Eardley, A. Hotson, Y. Cao, and M. B. Mudgett.** 2004. Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:633-43.
282. **Roden, J. A., B. Belt, J. B. Ross, T. Tachibana, J. Vargas, and M. B. Mudgett.** 2004. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:16624-9.
283. **Roine, E., J. Saarinen, N. Kalkkinen, and M. Romantschuk.** 1997. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.* **417**:168-172.
284. **Roine, E., W. S. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He.** 1997. Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3459-3464.
285. **Rojas, C. M., J. H. Ham, W. L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer.** 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13142-7.
286. **Ronald, P. C., and B. J. Staskawicz.** 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:191-198.
287. **Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* **38**:828-838.
288. **Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9368-9373.
289. **Ruden, D. M., J. Ma, Y. Li, K. Wood, and M. Ptashne.** 1991. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**:250-2.
290. **Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Steiner, and M. Hunt.** 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**:1809-1819.

291. **Salmeron, J. M., G. E. D. Oldroyd, C. M. T. Rommens, S. R. Scofield, H. S. Kim, D. T. Lavelle, D. Dahlbeck, and B. J. Staskawicz.** 1996. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene-cluster. *Cell* **86**:123-133.
292. **Salmond, G. P. C.** 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:181-200.
293. **Schägger, H., and G. von Jagow.** 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**:223-31.
294. **Schechter, L. M., K. A. Roberts, Y. Jamir, J. R. Alfano, and A. Collmer.** 2004. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J. Bacteriol.* **186**:543-555.
295. **Scheel, D.** 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**:305-310.
296. **Schesser, K., E. Frithz-Lindsten, and H. Wolf-Watz.** 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J. Bacteriol.* **178**:7227-7233.
297. **Schoonejans, E., D. Expert, and A. Toussaint.** 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysantemi* lipopolysaccharide-deficient φEC2-resistant mutants. *J. Bacteriol.* **169**:4011-4017.
298. **Schornack, S., A. Ballvora, D. Gürlebeck, J. Peart, D. Baulcombe, M. Ganal, B. Baker, U. Bonas, and T. Lahaye.** 2004. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J.* **37**:46-60.
299. **Schornack, S., K. Peter, U. Bonas, and T. Lahaye.** 2005. Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4*- but not in pepper *Bs3*-mediated perception. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:1215-25.
300. **Schulte, R., and U. Bonas.** 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* **174**:815-823.
301. **Schwechheimer, C., and M. Bevan.** 1998. The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends Plant Sci.* **3**:378-383.
302. **Scofield, S. R., C. M. Tobias, J. P. Rathjen, J. H. Chang, D. T. Lavelle, R. W. Michelmore, and B. J. Staskawicz.** 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**:2063-2065.
303. **Sekimoto, T., N. Imamoto, K. Nakajima, T. Hirano, and Y. Yoneda.** 1997. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J.* **16**:7067-77.
304. **Sessa, G., and G. B. Martin.** 2000. Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: a paradigm of innate immunity in plants. *Microbes Infect.* **2**:1591-7.
305. **Shan, L., V. K. Thara, G. B. Martin, J.-M. Zhou, and X. Tang.** 2000. The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* **12**:2323-2337.
306. **Shao, F., C. Golstein, J. Ade, M. Stoutemyer, J. E. Dixon, and R. W. Innes.** 2003. Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**:1230-3.
307. **Shapiro, A. D., and C. Zhang.** 2001. The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**:1089-101.
308. **Shaw, P., and J. Doonan.** 2005. The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle* **4**:102-5.
309. **Shirasu, K., and P. Schulze-Lefert.** 2000. Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **44**:371-385.
310. **Simpson, A. J., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bove, M. R. Briones, M. R. Bueno, A. A. Camargo, L. E. Camargo, D. M. Carraro, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. Costa, C. M.**

- Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A. P. Facincani, A. J. Ferreira, V. C. Ferreira, J. A. Ferro, J. S. Fraga, S. C. Franca, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Furlan, M. Garnier, G. H. Goldman, M. H. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Krieger, E. E. Kuramae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. Madeira, H. M. Madeira, and C. L. Marino.** 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**:151-7.
311. **Singh, K. B.** 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**:1111-20.
312. **Somssich, I. E., and K. Hahlbrock.** 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* **3**:86-90.
313. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11998-12002.
314. **Spurr, A. R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct. Res.* **26**:31-43.
315. **Stebbins, C. E., and J. E. Galán.** 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**:77-81.
316. **Stebbins, C. E., and J. E. Galán.** 2001. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**:701-705.
317. **Steinberger, E. M., and S. V. Beer.** 1988. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:135-144.
318. **Sticher, L., B. Mauch-Mani, and J. P. Métraux.** 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:235-270.
319. **Studier, F. W., and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-30.
320. **Subtil, A., C. Parsot, and A. Dautry-Varsat.** 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* **39**:792-800.
321. **Swanson, J., B. Kearny, D. Dahlbeck, and B. J. Staskawicz.** 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:5-9.
322. **Swarup, S., R. De Feyter, R. H. Bransky, and D. W. Gabriel.** 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathol.* **81**:802-809.
323. **Swings, J. G., and E. L. Civerolo.** 1993. *Xanthomonas*, vol. 1. Chapman & Hall, London.
324. **Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken.** 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* **26**:523-534.
325. **Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas.** 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* **46**:13–23.
326. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadouoglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* **6**:805-16.
327. **Tang, X., R. D. Frederick, J. Zhou, D. A. Halterman, Y. Jia, and G. B. Martin.** 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**:2060-2063.
328. **Tao, Y., Z. Xie, W. Chen, J. Glazebrook, H. S. Chang, B. Han, T. Zhu, G. Zou, and F. Katagiri.** 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**:317-30.
329. **Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Büttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A. C. McHardy, F.**

- Meyer, G. Mittenhuber, D. H. Nies, U. Niesbach-Klösgen, T. Patschkowski, C. Rückert, O. Rupp, S. Schneiker, S. C. Schuster, F. J. Vorhölter, E. Weber, A. Pühler, U. Bonas, D. Bartels, and O. Kaiser. 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**:7254-66.
330. Thomas, J., G. P. Stafford, and C. Hughes. 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3945-50.
331. Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka, and B. B. Finlay. 2005. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **57**:1762-1779.
332. Trombetta, E. S., and A. J. Parodi. 2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:649-76.
333. Trosky, J. E., S. Mukherjee, D. L. Burdette, M. Roberts, L. McCarter, R. M. Siegel, and K. Orth. 2004. Inhibition of MAPK signaling pathways by VopA from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Biol. Chem.* **279**:51953-7.
334. Tsiamis, G., J. W. Mansfield, R. Hockenhull, R. W. Jackson, A. Sesma, E. Athanassopoulos, M. A. Bennett, C. Stevens, A. Vivian, J. D. Taylor, and J. Murillo. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* **19**:3204-3214.
335. Ullrich, M. S., M. Schergaut, J. Boch, and B. Ullrich. 2000. Temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Microbiology* **146** (Pt 10):2457-68.
336. Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**:1307-1316.
337. Van der Biezen, E. A., and J. D. G. Jones. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**:454-456.
338. Van der Hoorn, R. A. L., F. Laurent, R. Roth, and P. J. G. M. De Wit. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of *Avr9/Cf-9*-induced and *Avr4/Cf-4*-induced necrosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:439-446.
339. Van Gijsegem, F., J. Vasse, J. C. Camus, M. Marenda, and C. Boucher. 2000. *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* **36**:249-260.
340. Van Gijsegem, F., J. Vasse, R. De Rycke, P. Castello, and C. Boucher. 2002. Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* **44**:935-46.
341. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**:169-70.
342. Van Loon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**:753-765.
343. Van Sluys, M. A., C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. Camargo, C. F. Menck, A. C. Da Silva, J. A. Ferro, M. C. Oliveira, J. C. Setubal, J. P. Kitajima, and A. J. Simpson. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**:169-89.
344. Vander Horn, P. B., A. D. Backstrom, V. Stewart, and T. P. Begley. 1993. Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**:982-92.
345. Vauterin, L., J. Rademaker, and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathol.* **90**:677-682.
346. Viprey, V., A. Del Greco, W. Golinowski, W. J. Broughton, and X. Perret. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* **28**:1381-1389.

347. **Vivian, A., and D. L. Arnold.** 2000. Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J. Plant Pathol.* **82**:163-178.
348. **Voinnet, O.** 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**:449-59.
349. **Walter, M., C. Chaban, K. Schütze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Näke, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schuhmacher, C. Oecking, K. Harter, and J. Kudla.** 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**:428-438.
350. **Wang, G., X. Ding, M. Yuan, D. Qiu, X. Li, C. Xu, and S. Wang.** 2006. Dual function of rice *OsDR8* gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Mol. Biol.* **60**:437-49.
351. **Wattiau, P., and G. R. Cornelis.** 1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* **8**:123-131.
352. **Wattiau, P., S. Woestyn, and G. R. Cornelis.** 1996. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:255-262.
353. **Weber, E., and R. Koebnik.** 2005. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **187**:6175-86.
354. **Weber, E., and R. Koebnik.** 2006. Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* **188**:1405-1410.
355. **Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik.** 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**:2458-68.
356. **Weis, K., I. W. Mattaj, and A. I. Lamond.** 1995. Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* **268**:1049-53.
357. **Wengelnik, K., and U. Bonas.** 1996. HrpX, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **178**:3462-3469.
358. **Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:704-712.
359. **White, F. F., B. Yang, and L. B. Johnson.** 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:291-298.
360. **Wichmann, G., and J. Bergelson.** 2004. Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* **166**:693-706.
361. **Willekens, H., D. Inzé, M. Van Montagu, and W. van Camp.** 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* **1**:207-228.
362. **Williamson, V. M., and R. S. Hussey.** 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* **8**:1735-45.
363. **Wright, C. A., and G. A. Beattie.** 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3269-3274.
364. **Yang, B., A. Sugio, and F. F. White.** 2006. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:10503-8.
365. **Yang, B., and F. F. White.** 2004. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:1192-200.
366. **Yang, B., W. Zhu, L. B. Johnson, and F. F. White.** 2000. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9807-9812.
367. **Yang, Y., and D. W. Gabriel.** 1995. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:627-631.

368. **Yang, Y. N., R. De Feyter, and D. W. Gabriel.** 1994. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrB6*, respectively. Mol. Plant-Microbe Interact. **7**:345-355.
369. **Young, B. M., and G. M. Young.** 2002. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **184**:1324-34.
370. **Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:6456-61.
371. **Yucel, I., D. Slaymaker, C. Boyd, J. Murillo, R. I. Buzzell, and N. T. Keen.** 1994. Avirulence gene *avrPphC* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 3121: a plasmid-borne homologue of *avrC* closely linked to an *avrD* allele. Mol. Plant-Microbe Interact. **7**:677-9.
372. **Zeidler, D., U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler, and J. Durner.** 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:15811-6.
373. **Zhang, S., and D. Klessig.** 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci. **6**:520-527.
374. **Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. Jones, G. Felix, and T. Boller.** 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. Nature **428**:764-7.

Anhang 1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	Gen	Referenz
pBS356	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2</i>	O. Rossier; 131
pBS356ΔNLS	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2ΔNLS</i>	324
pBS356ΔSphI	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2ΔSphI</i>	O. Rossier; 131
pBSavrBs3 ₁₋₁₅₀	pBluescript II KS	<i>avrBs3₁₋₁₅₀</i>	D. Büttner; 56
pBS356Δrep-9	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-9</i>	diese Arbeit; 131
pBS356Δrep-109	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-109</i>	diese Arbeit; 131
pBS356Δrep-27	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-27</i>	diese Arbeit; 131
pBS356Δrep-29	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-29</i>	diese Arbeit; 131
pBS356Δrep-21	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-21</i>	diese Arbeit; 131
pBS356Δrep-121	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2Δrep-121</i>	diese Arbeit; 131
pBS310	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ3</i>	diese Arbeit; 131
pBS310ΔC	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ3ΔC</i>	diese Arbeit; 131
pBS356ΔC	pBluescript II KS	<i>avrBs3Δ2ΔC</i>	D. Gürlebeck; 131
pBS356N	pBluescript II KS	<i>avrBs3₄₆₀₋₇₆₀</i>	diese Arbeit; 131
	pCR2.1-TOPO		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pTopoC	pCR2.1-TOPO	<i>avrBs3₃₁₀₆₋₃₄₉₆</i>	diese Arbeit; 131
pUS300Δrep-16	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-16</i>	145
pUS300Δrep-9	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-9</i>	145
pUS300Δrep-109	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-109</i>	145
pUS300Δrep-27	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-27</i>	145
pUS300Δrep-29	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-29</i>	45
pUS300Δrep-21	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-21</i>	45
pUS300Δrep-121	pUC119	<i>avrBs3Δ2Δrep-121</i>	145
	pENTR-T		S. Schornack und T. Lahaye; 131
pENTR356N	pENTR-T	<i>avrBs3₄₆₀₋₇₆₀</i>	diese Arbeit; 131
pENTR356NC	pENTR-T	<i>avrBs3_{460-760, 3106-3496}</i>	diese Arbeit; 131
pENTR356	pENTR-T	<i>avrBs3Δ2</i>	diese Arbeit; 131
pENTR356ΔNLS	pENTR-T	<i>avrBs3Δ2ΔNLS</i>	diese Arbeit; 131
pENTR356ΔSphI	pENTR-T	<i>avrBs3Δ2ΔSphI</i>	diese Arbeit; 131
	pENTR/D-TOPO		Invitrogen

pENTRCaimp α 1	pENTR/D-TOPO	<i>Caimpα1</i>	diese Arbeit
pENTRCaimp α 1stop	pENTR/D-TOPO	<i>Caimpα1</i>	diese Arbeit
pENTRLeThiC	pENTR/D-TOPO	<i>LeThiC</i>	diese Arbeit
pENTRLeThiCstop	pENTR/D-TOPO	<i>LeThiC</i>	diese Arbeit
	pEG202		18
	pJG4-5		18
pYB50	pEG202	<i>BD-avrBs3₁₋₁₅₀</i>	diese Arbeit; 56
pYP50	pJG4-5	<i>AD-avrBs3₁₋₁₅₀</i>	diese Arbeit; 56
pYBhp α B	pEG202	<i>BD-hpαB</i>	L. Escolar; 56
pYPhp α B	pJG4-5	<i>AD-hpαB</i>	L. Escolar; 56
pYB356	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2</i>	324
pYB310	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ3</i>	324
pYB312	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-312</i>	324
pYB300	pEG202	<i>BD-avrBs3</i>	324
pYB356ΔNLS	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2ΔNLS</i>	324
pYB356ΔNLS::SV40	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2ΔNLS::SV40</i>	324
pYB256	pEG202	<i>BD-avrBs4ΔN152</i>	Van den Ackerveken; 298
pYB227ΔN	pEG202	<i>BD-avrBs4ΔN152Δ227</i>	D. Gürlebeck, Diplomarbeit, 2001
pYB356ΔSph	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2ΔSpHI</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-16	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-16</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-9	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-9</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-109	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-109</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-27	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-27</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-29	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-29</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-21	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-21</i>	diese Arbeit; 131
pYB356Δrep-121	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2Δrep-121</i>	diese Arbeit; 131
pYB356ΔC	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ2ΔC</i>	diese Arbeit; 131
pYB310ΔC	pEG202	<i>BD-avrBs3Δ3ΔC</i>	diese Arbeit; 131
pYB356N	pEG202	<i>BD-avrBs3₄₆₀₋₇₆₀</i>	diese Arbeit; 131
pYBC	pEG202	<i>BD-avrBs3₃₁₀₆₋₃₄₉₆</i>	diese Arbeit; 131
pYP356ΔSph	pJG4	<i>AD-avrBs3Δ2ΔSpHI</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-16	pJG4	<i>AD-avrBs3Δ2Δrep-16</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-9	pJG4	<i>AD-avrBs3Δ2Δrep-9</i>	diese Arbeit; 131

pYP356Δrep-109	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2Δrep-109</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-27	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2Δrep-27</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-29	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2Δrep-29</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-21	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2Δrep-21</i>	diese Arbeit; 131
pYP356Δrep-121	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2Δrep-121</i>	diese Arbeit; 131
pYP356ΔC	pJG4	<i>ADavrBs3Δ2ΔC</i>	diese Arbeit; 131
pYP310ΔC	pJG4	<i>ADavrBs3Δ3ΔC</i>	diese Arbeit; 131
pYP356N	pJG4	<i>ADavrBs3₄₆₀₋₇₆₀</i>	diese Arbeit; 131
pYPC	pJG4	<i>ADavrBs3₃₁₀₆₋₃₄₉₆</i>	diese Arbeit; 131
	pJCL		C. Lorenz und J. Boch, unveröffentlichte Daten
pJCLCaimpα1stop	pJCL	<i>AD-Caimpα1</i>	diese Arbeit
pJCLLeThiCstop	pJCL	<i>AD-LeThiC</i>	diese Arbeit
	pGBKT7		Clontech, Heidelberg
	pGADT7		Clontech, Heidelberg
	pGADT7-Rec2		Clontech, Heidelberg
	pGBKT7-attR		A. Meyer und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten
	pGAD-attR		A. Meyer und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten
pGBK7avrBs3	pGBK7	<i>BDavrBs3</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ3	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ3</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ3ΔNLS	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2ΔNLS</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2ΔNLS::SV40	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2ΔNLS::SV40</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2ΔC	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2ΔC</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ3ΔC	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ3ΔC</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2ΔSphI	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2ΔSphI</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2Δrep-9	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δrep-9</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2Δrep-109	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δrep-109</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2Δrep-16	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δrep-16</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2Δrep-27	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δrep-27</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3Δ2Δrep-29	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δrep-29</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs4Δ2	pGBK7	<i>BDavrBs4Δ2</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs4Δ2Δ227	pGBK7	<i>BDavrBs3Δ2Δ227</i>	diese Arbeit
pGBK7avrBs3-LZ	pGBK7	<i>BDavrBs3₂₄₂₅₋₃₃₉₇</i>	diese Arbeit

pGADT7avrBs3-LZ	pGADT7	<i>AD-avrBs3</i> ₂₄₂₅₋₃₃₉₇	diese Arbeit
pGADattLeThiCstop	pGAD-attR	<i>AD-LeThiC</i>	diese Arbeit
	pGEX-2TKM		58
	pGEX6p1		Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pGEX300	pGEX-2TKM	<i>Gst-avrBs3</i>	B. Szurek; 131
pGEX6p1356	pGEX6p1	<i>gst-avrBs3Δ2</i>	diese Arbeit; 131
pDS356F	pDSK602	<i>avrBs3Δ2-FLAG</i>	324
pDMhpab	pDSK604	<i>hpaB-c-myc</i>	56
	pDEST15		Invitrogen, Karlsruhe
pDEST15LeThiCstop	pDEST15	<i>GST-LeThiC</i>	diese Arbeit
pBin6Ip19	pBin6I	<i>p19</i>	348
pVS300F	pVB60	<i>avrBs3-FLAG</i>	336
pVSF316	pVB60	<i>avrBs3Δrep-16-FLAG</i>	336
pVSF341	pVB60	<i>avrBs3ΔAD-FLAG</i>	324
pVGUS	pVB60	<i>uidA</i>	336
	pBI1.4t		232
pBI356ΔSphI	pBI1.4t	<i>avrBs3Δ2ΔSphI</i>	diese Arbeit; 131
	pK7FWG2		173
	pK7CWG		173
	pK7WGC		173
	pK7YWG		173
	pK7WGY		173
	pGWB14		Tsuyoshi Nakagawa
	pGWB735.1		S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten
	pSPYNE-35S-GW		S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten
	pSPYCE-35S-GW		S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten
pK7FWG2avrBs3Δ2	pK7FWG2	<i>avrBs3Δ2-GFP</i>	diese Arbeit; 131
pK7CWGavrBs3Δ2	pK7CWG	<i>avrBs3Δ2-CFP</i>	diese Arbeit
pK7WGCavrBs3Δ2	pK7WGC	<i>CFP-avrBs3Δ2</i>	diese Arbeit
pK7YWGavrBs3Δ2	pK7YWG	<i>avrBs3Δ2-YFP</i>	diese Arbeit
pK7WGYavrBs3Δ2	pK7WGY	<i>YFP-avrBs3Δ2</i>	diese Arbeit
pGWB14avrBs3Δ2	pGWB14	<i>avrBsΔ2-HA</i>	diese Arbeit
pGWB735.1avrBs3Δ2	pGWB735.1	<i>YFP_C-avrBs3Δ2</i>	diese Arbeit
pK7FWG2avrBs3Δ2ΔNLS	pK7FWG2	<i>avrBs3Δ2ΔNLS-GFP</i>	diese Arbeit; 131

pGWB14avrBs3Δ2	pGWB14	<i>avrBs3Δ2ΔNLS-HA</i>	diese Arbeit
pGWB735.1avrBs3Δ2ΔNLS	pGWB735.1	<i>YFP_C-avrBs3Δ2ΔNLS</i>	diese Arbeit
pK7FWG2avrBs3Δ2ΔSphI	pK7FWG2	<i>avrBs3Δ2ΔSphI-GFP</i>	diese Arbeit; 131
pK7YWGCaimpα1	pK7YGW	<i>Caimpα1-YFP</i>	diese Arbeit
pGWB11Caimpα1	pGWB11	<i>Caimpα1-FLAG</i>	diese Arbeit
pSPYNE-35S-GWCaimpα1	pSPYNE-35S-GW	<i>Caimpα1-YFP_N</i>	diese Arbeit
pK7CWGLeThiC	pK7CWG	<i>LeThiC-CFP</i>	diese Arbeit
pK7WGCLeThiCstop	pK7WGC	<i>CFP-LeThiC</i>	diese Arbeit
pK7YWGLeThiC	pK7YGW	<i>LeThiC-YFP</i>	diese Arbeit
pK7WGYLeThiCstop	pK7WGY	<i>YFP-LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB735.1LeThiCstop	pGWB735.1	<i>YFP_C-LeThiC</i>	diese Arbeit
pSPYNE-35S-GWLeThiC	pSPYNE-35S-GW	<i>LeThiC-YFP_N</i>	diese Arbeit
pGWB2LeThiCstop	pGWB2	<i>LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB9LeThiCstop	pGWB9	<i>6xHIS-LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB11LeThiC	pGWB11	<i>LeThiC-FLAG</i>	diese Arbeit
pGWB12LeThiCstop	pGWB12	<i>FLAG-LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB14LeThiC	pGWB14	<i>LeThiC-3xHA</i>	diese Arbeit
pGWB15LeThiCstop	pGWB15	<i>3xHA-LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB20LeThiC	pGWB20	<i>LeThiC-10xc-myc</i>	diese Arbeit
pGWB21LeThiCstop	pGWB21	<i>10xc-myc-LeThiC</i>	diese Arbeit
pGWB24LeThiCstop	pGWB24	<i>GST-LeThiC</i>	diese Arbeit

Anhang 2: Vollständige Sequenz von *LeThiC* aus *L. esculentum* MM

Start- und Stopkodon sind rot markiert, die Nukleotidsequenz um das ATG ist unterstrichen. Der für VIGS-Analysen verwendete Genbereich ist grau unterlegt.

ATTCATTGCTTCAGACGTTGATTGGAAGATGGCGTCTGTCCAAACTGCTTGACATCACT
CCTATGCAAGAAAGGGAAACAATAATCCACAAGTAATGTTCCAAGAAGTTCCTTCTTGCCA
GGGTTGATTGACAGGGCAAGTTGCGGTTACAGGGAGAAGGGAAACGGTTCAATTCTT
TTTCAAGCCCAGAGCAACACTTACCTTGATCCTCCAGTACTGATAATAAGAGAAC
AAAGCCAAAGCACACTGTGATCCTAATGCTCCTGATTCCTGCCTTCCACCATTGAA
CAATGCTTCCGAAAAGCTCCAAGGAATAACAGTGAAGTTATGCATGAAGAAACTGGTCATG
TACTCAAAGTCCCATTCGACGTATCCATCTTCCGGGATGAACCACATTGACACTTA
TGATACCAGTGGTCCTCAGGGTTTAACCCGCGCTGGACTCCCAAGCTGCGCACGGAG
TGGATTAACAGGAGGGAGAAGTTAGGAGGACCAAGGTTACTCAAATGTTTATGCTAAGC
AGGGAACTACTGAGGAAATGGTTACTGTGCTCGTGAGAAGATGGATCCGGAATT
TGTGAGGTCAGAAGTTGCTCGGGCCGTGCAATCATCCCTCAAACAAGAAGCACCCTGAG
TTGGAGCCAATGATAGTAGGAAGAAAGTTCTTAGTGAAAGTCAATGCCACATCGGGAACT
CTGCTTGTTAAGCTCGATTGAAGAAGAAGTTCACAGCTCAATGGCAACAAATGTGGGG
TGCAGATACGATTATGGATCTCTACTGGTCGTCACATCCACGAGACTCGTGAGTGGATC
TTGCGTAATTCTGCTGTACCAGTAGTAGGCACTGTGCCAATTACCAAGCACTAGAAAAAGTAA
ACGGGATTGCTGAGAATCTTAGTGGAAGTGTTTAGGGAGACCTTAATTGAACAAAGCTGA
GCAAGGAGTTGATTACTCACAATCCATGCCGGAGTCCTCTCAGGTACATCCCACTGACA
GCAAAACGGATGACCGGAATTGTCTCGTGGAGGCTCAATTCATGCAAAAGTGGTGCTTAG
CTTATCACAAGGAGAATTCGCTTATGAACATTGGATGACATACTGTGACATCTGTAATCA
GTACGATATATCGTTATCAATTGGTGATGGACTGAGACCTGGTTCAATTTATGATGCAAAAT
GACACCGCTCAGTTGCTGAGCTTGACTCAAGGGGAGCGTACTCGCCGAGCTGGAAAAAGGATGTACAGGTTATGAATGAAGGACCTGGACATGTACCAATGCATAAGATCCCGAGAA
CATGCAGAAACAGCTAGAGTGGTATGAAGCACCATTTTACACTCTGGACCATTGACA
ACTGATATAGCTCCGGATTGATCATATCACCTCAGCTATCGGTGAGCCAATATAGGAG
CACTCGGGACTGCACTCTGTGTACGTCACTCCAAAAGAGCATCTGGTCTGCCTAATCG
CGATGACGTGAAAGACAGGTTAATATCATATAAGAATAGCTGCTCATGCAGCTGATCTGCA
AAAGGTCACCCGCTATCTCAAGCCTGGATGATGCACTTAGCAAGGGCAAGATTGAGTTCA
GATGGATGGACCAATTGCTTATCATTGGACCCCGTTACTGCAATGTCCTTCACGACGA
AAACTTACCGCCGTAGGGCTAAAGTGGCAATTCTGCTATGTGCGGGCCTAAAGTT
TGCTCCATGAAAATAACCGAAAGATATAAGAAGTATGCTGAAAATCATGGTTATGGAAATG
CAGAGGAAGCCATTCAGCAGGGATGGATGCTATGAGTGCAGCGTTCAAGCTGAAAAAA
AACCATTAGTGGGGACAAACACCGGTGAGGTTGGCGGTGAGATCTACTTGCCAGGAAATTAC
ATCAACTCTTGAAGAGCCAAAGGAATGTGTAAAGATCGAAAACTGGCTCACAGATTTCTG
AAGTGATCACAACTCCATCGGCCAGTCAAGGGAGGCGGTAGTTAGGAGCCTCATTATCAAGTG
TTAGCTCAAATGCTGACTGATCAGGCTGAGAAA

Anhang 3: Statistische Auswertungen

3.1. Messung des Gehaltes an Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat in *N. benthamiana*-Zellen nach Transformation mit Agrobakterien, welche *avrBs3* [GV3101(avrBs3)] oder kein Gen [GV3101(pV)] auf der T-DNA enthalten

Nichtparametrische Tests

Behandlung = GV3101(pV)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		Thiamin
N		6
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert Standardabweichung	121,0025 24,35920
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,249 ,249 -,187
Kolmogorov-Smirnov-Z		,611
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,850

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = 1 GV3101(pV)

Behandlung = GV3101(pVavrBs3)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		Thiamin
N		6
Parameter der	Mittelwert	87,1123
Normalverteilung(a,b)	Standardabweichung	11,72088
Extremste Differenzen	Absolut	,221
	Positiv	,221
	Negativ	-,169
Kolmogorov-Smirnov-Z		,541
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,932

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = 2 GV3101(pVavrBs3)

T-Test**Gruppenstatistiken**

	Behandlung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Thiamin	GV3101(pV)	6	121,0025	24,35920	9,94460
	GV3101(pVa vrBs3)	6	87,1123	11,72088	4,78503

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Thiamin	Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	3,904	,076	3,071	10	,012	33,89017	11,03592	9,30060	58,47973
				3,071	7,197	,017	33,89017	11,03592	7,93878	59,84156

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Behandlung	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Thiamin	GV3101(pV)	6	9,17	55,00
	GV3101(pVa vrBs3)	6	3,83	23,00
	Gesamt	12		

Statistik für Test(b)

	Thiamin
Mann-Whitney-U	2,000
Wilcoxon-W	23,000
Z	-2,562
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,010
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,009(a)
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,009
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,004
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Behandlung

Nichtparametrische Tests

Behandlung = GV3101(pV)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		TMP
N		6
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert Standardabweichung	82,6000 23,13692
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,252 ,190 -,252
Kolmogorov-Smirnov-Z		,618
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,840

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = GV3101(pV)

Behandlung = GV3101(pVavrBs3)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		TMP
N		6
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	51,7667
	Standardabweichung	15,34157
Extremste Differenzen	Absolut	,165
	Positiv	,165
	Negativ	-,141
Kolmogorov-Smirnov-Z		,405
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,997

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = GV3101(pVavrBs3)

T-Test

Gruppenstatistiken

	Behandlung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
TMP	GV3101(pV)	6	82,6000	23,13692	9,44561
	GV3101(pVavrBs3)	6	51,7667	15,34157	6,26317

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit					95% Konfidenzintervall der Differenz	
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
TMP	Varianzen sind gleich	1,321	,277	2,721	10	,022	30,83333	11,33344	5,58086	56,08580
	Varianzen sind nicht gleich			2,721	8,684	,024	30,83333	11,33344	5,05262	56,61405

Nichtparametrische Tests**Mann-Whitney-Test****Ränge**

	Behandlung	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
TMP	GV3101(pV)	6	8,67	52,00
	GV3101(pV avrBs3)	6	4,33	26,00
	Gesamt	12		

Statistik für Test(b)

	TMP
Mann-Whitney-U	5,000
Wilcoxon-W	26,000
Z	-2,082
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,037
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,041(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Behandlung

Nichtparametrische Tests

Behandlung = GV3101(pV)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		TDP
N		6
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert Standardabweichung	52,9758 16,61058
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,162 ,162 -,152
Kolmogorov-Smirnov-Z		,397
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,997

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = GV3101(pV)

Behandlung = GV3101(pVavrBs3)

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest(c)

		TDP
N		6
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert Standardabweichung	19,2258 5,68032
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,272 ,272 -,172
Kolmogorov-Smirnov-Z		,665
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,768

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

c Behandlung = GV3101(pVavrBs3)

T-Test

Gruppenstatistiken

	Behandlung	N	Mittelwert	Standardab weichung	Standardfehler des Mittelwertes
TDP	GV3101(pV)	6	52,9758	16,61058	6,78124
	GV3101(pV avrBs3)	6	19,2258	5,68032	2,31898

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit					95% Konfidenzintervall der Differenz	
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
TDP	Varianzen sind gleich	4,397	,062	4,709	10	,001	33,75000	7,16679	17,781 40	49,71860
	Varianzen sind nicht gleich			4,709	6,154	,003	33,75000	7,16679	16,319 10	51,18090

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Behandlung	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
TDP	GV3101(pV)	6	9,50	57,00
	GV3101(pV avrBs3)	6	3,50	21,00
	Gesamt	12		

Statistik für Test(b)

	TDP
Mann-Whitney-U	,000
Wilcoxon-W	21,000
Z	-2,882
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,004
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,002(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Behandlung

3.2. Größe der Zellkerne (z), von *N. benthamiana*-Zellen nach Transformation mit Agrobakterien, welche *uidA*, *avrBs3*, *avrBs1*, *avrBs4* oder kein Gen auf der T-DNA enthalten.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		z
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	1354,7101
	Standardabweichung	400,69869
Extremste Differenzen	Absolut	,071
	Positiv	,071
	Negativ	-,039
Kolmogorov-Smirnov-Z		,588
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,880

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = unbehandelt

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		<i>z</i>
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	2458,5362
	Standardabweichung	749,39500
Extremste Differenzen	Absolut	,114
	Positiv	,114
	Negativ	-,060
Kolmogorov-Smirnov-Z		,944
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,335

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = uidA

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		z
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	3718,2319
	Standardabweichung	1358,956
Extremste Differenzen	Absolut	,146
	Positiv	,146
	Negativ	-,091
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,209
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,108

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = avrBs3

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		z
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	1994,8986
	Standardabweichung	771,04067
Extremste Differenzen	Absolut	,140
	Positiv	,140
	Negativ	-,094
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,161
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,135

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = avrBs1

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Z
N		69
Parameter der a,b Normalverteilung	Mittelwert Standardabweichung	1881,9565 780,83361
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,100 ,100 -,058
Kolmogorov-Smirnov-Z		,834
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,490

- a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
- b. Aus den Daten berechnet.
- c. gr = avrBs4

Oneway-Statistik

ONEWAY deskriptive Statistiken

Z	N	Mittelwert	Standardab- weichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
unbehandelt	69	1354,7101	400,69869	48,23845	1258,4518	1450,9685	584,00	2657,00
uidA	69	2458,5362	749,39500	90,21656	2278,5119	2638,5606	942,00	4308,00
avrBs3	69	3718,2319	1358,95595	163,59907	3391,7750	4044,6887	1808,00	7640,00
avrBs1	69	1994,8986	771,04067	92,82239	1809,6744	2180,1227	776,00	4530,00
avrBs4	69	1881,9565	780,83361	94,00132	1694,3798	2069,5332	657,00	3904,00
Gesamt	345	2281,6667	1177,69193	63,40480	2156,9568	2406,3766	584,00	7640,00

Test der Homogenität der Varianzen

Levene-Statistik	df1	df2	Signifikanz
18,152	4	340	,000

ONEWAY ANOVA

	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	2,2E+08	4	55135399	73,063	,000
Innerhalb der Gruppen	2,6E+08	340	754623,68		
Gesamt	4,8E+08	344			

Robuste Testverfahren zur Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte

	Statistik ^a	df1	df2	Sig.
Welch-Test	69,419	4	162,927	,000
Brown-Forsythe	73,063	4	216,240	,000

a. Asymptotisch F-verteilt

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: z

	(I) gr	(J) gr	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	unbehandelt	uidA	-1103,82609	147,89574	,000	-1394,7319	-812,9202
		avrBs3	-2363,52174	147,89574	,000	-2654,4276	-2072,6159
		avrBs1	-640,18841*	147,89574	,000	-931,0943	-349,2826
		avrBs4	-527,24638*	147,89574	,000	-818,1522	-236,3405
	uidA	unbehandelt	1103,82609	147,89574	,000	812,9202	1394,7319
		avrBs3	-1259,69565	147,89574	,000	-1550,6015	-968,7898
		avrBs1	463,63768*	147,89574	,002	172,7318	754,5435
		avrBs4	576,57971*	147,89574	,000	285,6739	867,4856
	avrBs3	unbehandelt	2363,52174	147,89574	,000	2072,6159	2654,4276
		uidA	1259,69565	147,89574	,000	968,7898	1550,6015
		avrBs1	1723,33333	147,89574	,000	1432,4275	2014,2392
		avrBs4	1836,27536	147,89574	,000	1545,3695	2127,1812
	avrBs1	unbehandelt	640,18841*	147,89574	,000	349,2826	931,0943
		uidA	-463,63768*	147,89574	,002	-754,5435	-172,7318
		avrBs3	-1723,33333	147,89574	,000	-2014,2392	-1432,4275
		avrBs4	112,94203	147,89574	,446	-177,9638	403,8479
	avrBs4	unbehandelt	527,24638*	147,89574	,000	236,3405	818,1522
		uidA	-576,57971*	147,89574	,000	-867,4856	-285,6739
		avrBs3	-1836,27536	147,89574	,000	-2127,1812	-1545,3695
		avrBs1	-112,94203	147,89574	,446	-403,8479	177,9638
Bonferroni	unbehandelt	uidA	-1103,82609	147,89574	,000	-1521,7014	-685,9507
		avrBs3	-2363,52174	147,89574	,000	-2781,3971	-1945,6464
		avrBs1	-640,18841*	147,89574	,000	-1058,0638	-222,3130
		avrBs4	-527,24638*	147,89574	,004	-945,1217	-109,3710
	uidA	unbehandelt	1103,82609	147,89574	,000	685,9507	1521,7014
		avrBs3	-1259,69565	147,89574	,000	-1677,5710	-841,8203
		avrBs1	463,63768*	147,89574	,019	45,7623	881,5130
		avrBs4	576,57971*	147,89574	,001	158,7043	994,4551
	avrBs3	unbehandelt	2363,52174	147,89574	,000	1945,6464	2781,3971
		uidA	1259,69565	147,89574	,000	841,8203	1677,5710
		avrBs1	1723,33333	147,89574	,000	1305,4580	2141,2087
		avrBs4	1836,27536	147,89574	,000	1418,4000	2254,1507
	avrBs1	unbehandelt	640,18841*	147,89574	,000	222,3130	1058,0638
		uidA	-463,63768*	147,89574	,019	-881,5130	-45,7623
		avrBs3	-1723,33333	147,89574	,000	-2141,2087	-1305,4580
		avrBs4	112,94203	147,89574	1,000	-304,9333	530,8174
	avrBs4	unbehandelt	527,24638*	147,89574	,004	109,3710	945,1217
		uidA	-576,57971*	147,89574	,001	-994,4551	-158,7043
		avrBs3	-1836,27536	147,89574	,000	-2254,1507	-1418,4000
		avrBs1	-112,94203	147,89574	1,000	-530,8174	304,9333

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

3.3. Größe der Nukleoli (n), von *N. benthamiana*-Zellen nach Transformation mit Agrobakterien, welche *uidA*, *avrBs3*, *avrBs1*, *avrBs4* oder kein Gen auf der T-DNA enthalten.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		n
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	101,1304
	Standardabweichung	38,21107
Extremste Differenzen	Absolut	,065
	Positiv	,065
	Negativ	-,057
Kolmogorov-Smirnov-Z		,536
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,936

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = unbehandelt

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		n
N		69
Parameter der a,b Normalverteilung	Mittelwert	210,7246
	Standardabweichung	85,63378
Extremste Differenzen	Absolut	,056
	Positiv	,056
	Negativ	-,042
Kolmogorov-Smirnov-Z		,469
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,981

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = uidA

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		n
N		69
Parameter der a,b Normalverteilung	Mittelwert	397,8841
	Standardabweichung	177,15285
Extremste Differenzen	Absolut	,082
	Positiv	,082
	Negativ	-,059
Kolmogorov-Smirnov-Z		,685
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,736

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = avrBs3

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		n
N		69
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	117,2319
	Standardabweichung	59,36927
Extremste Differenzen	Absolut	,112
	Positiv	,101
	Negativ	-,112
Kolmogorov-Smirnov-Z		,929
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,354

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. gr = avrBs1

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		n
N		69
Parameter der a,b Normalverteilung	Mittelwert Standardabweichung	91,1304 42,41459
Extremste Differenzen	Absolut Positiv Negativ	,138 ,138 -,104
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,145
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,146

- a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
- b. Aus den Daten berechnet.
- c. gr = avrBs4

Oneway-Test

ONEWAY deskriptive Statistiken

n	N	Mittelwert	Standardab- weichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
unbehandelt	69	101,1304	38,21107	4,60007	91,9511	110,3097	15,00	176,00
uidA	69	210,7246	85,63378	10,30910	190,1532	231,2961	42,00	429,00
avrBs3	69	397,8841	177,15285	21,32670	355,3273	440,4408	107,00	847,00
avrBs1	69	117,2319	59,36927	7,14722	102,9698	131,4939	45,00	407,00
avrBs4	69	91,1304	42,41459	5,10612	80,9413	101,3195	29,00	223,00
Gesamt	345	183,6203	149,38141	8,04242	167,8018	199,4388	15,00	847,00

Test der Homogenität der Varianzen

n			
Levene-Statistik	df1	df2	Signifikanz
49,477	4	340	,000

ONEWAY ANOVA

n	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	4582288	4	1145572,1	125,887	,000
Innerhalb der Gruppen	3094005	340	9100,014		
Gesamt	7676293	344			

Robuste Testverfahren zur Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte

n	Statistik ^a	df1	df2	Sig.
Welch-Test	72,420	4	164,525	,000
Brown-Forsythe	125,887	4	133,253	,000

a. Asymptotisch F-verteilt

Post-Hoc-Tests

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: n

	(I) gr	(J) gr	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	unbehandelt	uidA	-109,59420*	16,24095	,000	-141,5396	-77,6488
		avrBs3	-296,75362*	16,24095	,000	-328,6990	-264,8082
		avrBs1	-16,10145	16,24095	,322	-48,0468	15,8439
		avrBs4	10,00000	16,24095	,538	-21,9454	41,9454
	uidA	unbehandelt	109,59420*	16,24095	,000	77,6488	141,5396
		avrBs3	-187,15942*	16,24095	,000	-219,1048	-155,2140
		avrBs1	93,49275*	16,24095	,000	61,5474	125,4381
		avrBs4	119,59420*	16,24095	,000	87,6488	151,5396
	avrBs3	unbehandelt	296,75362*	16,24095	,000	264,8082	328,6990
		uidA	187,15942*	16,24095	,000	155,2140	219,1048
		avrBs1	280,65217*	16,24095	,000	248,7068	312,5976
		avrBs4	306,75362*	16,24095	,000	274,8082	338,6990
	avrBs1	unbehandelt	16,10145	16,24095	,322	-15,8439	48,0468
		uidA	-93,49275*	16,24095	,000	-125,4381	-61,5474
		avrBs3	-280,65217*	16,24095	,000	-312,5976	-248,7068
		avrBs4	26,10145	16,24095	,109	-5,8439	58,0468
	avrBs4	unbehandelt	-10,00000	16,24095	,538	-41,9454	21,9454
		uidA	-119,59420*	16,24095	,000	-151,5396	-87,6488
		avrBs3	-306,75362*	16,24095	,000	-338,6990	-274,8082
		avrBs1	-26,10145	16,24095	,109	-58,0468	5,8439
Bonferroni	unbehandelt	uidA	-109,59420*	16,24095	,000	-155,4826	-63,7058
		avrBs3	-296,75362*	16,24095	,000	-342,6420	-250,8653
		avrBs1	-16,10145	16,24095	1,000	-61,9898	29,7869
		avrBs4	10,00000	16,24095	1,000	-35,8884	55,8884
	uidA	unbehandelt	109,59420*	16,24095	,000	63,7058	155,4826
		avrBs3	-187,15942*	16,24095	,000	-233,0478	-141,2711
		avrBs1	93,49275*	16,24095	,000	47,6044	139,3811
		avrBs4	119,59420*	16,24095	,000	73,7058	165,4826
	avrBs3	unbehandelt	296,75362*	16,24095	,000	250,8653	342,6420
		uidA	187,15942*	16,24095	,000	141,2711	233,0478
		avrBs1	280,65217*	16,24095	,000	234,7638	326,5405
		avrBs4	306,75362*	16,24095	,000	260,8653	352,6420
	avrBs1	unbehandelt	16,10145	16,24095	1,000	-29,7869	61,9898
		uidA	-93,49275*	16,24095	,000	-139,3811	-47,6044
		avrBs3	-280,65217*	16,24095	,000	-326,5405	-234,7638
		avrBs4	26,10145	16,24095	1,000	-19,7869	71,9898
	avrBs4	unbehandelt	-10,00000	16,24095	1,000	-55,8884	35,8884
		uidA	-119,59420*	16,24095	,000	-165,4826	-73,7058
		avrBs3	-306,75362*	16,24095	,000	-352,6420	-260,8653
		avrBs1	-26,10145	16,24095	1,000	-71,9898	19,7869

*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

Erklärung

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

Halle, den 1.12.2006

Doreen Gürlebeck

Lebenslauf

Name Doreen Gürlebeck
Geburtsdatum 16.02.1977
Geburtsort Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz
Nationalität deutsch
Anschrift Kurt-Eisner-Straße 62, 04275 Leipzig, Deutschland

Ausbildung

Schulbildung: Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium, Chemnitz (1991 – 1995)
Abschluß: Abitur
Hauptfächer: Biologie und Deutsch

Studium: Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (10/1995 – 03/2001)
Diplomarbeit am Institut für Genetik, AG Pflanzengenetik (Prof. U. Bonas)
Thema: Genetische und molekulare Analyse von *avrBs3* und *avrBs4*, zwei Mitgliedern der *avrBs3*-Familie aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
Abschluß: Diplom

Promotion: Promotionsarbeit am Institut für Genetik, AG Pflanzengenetik (Prof. U. Bonas) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (seit 04/2001)
Thema: Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Praktika : CNRS, Gif-sur-Yvette, France
Instituto de Génética Médica, Porto, Portugal
IPK, Gatersleben, Deutschland

Publikationen

Schornack S., Ballvora A., Gürlebeck D., Peart J., Baulcombe D., Baker B., Ganal M., Bonas U., Lahaye T. (2004) The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J.* 37: 46-60

Büttner D., Gürlebeck D., Noël L., 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

Gürlebeck D., Szurek B., Bonas U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* 42: 175-187

Gürlebeck D., Thieme F., Bonas U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol.* 163: 233-255

Gürlebeck D., Hause G., Jahn S., Raschke, A. und Bonas U.: Virulence activities of the type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In preparation

Gürlebeck D., Raschke A. und Bonas U.: The type III effector AvrBs3 interacts with importin α in the plant. In preparation