

**Identifizierung und funktionale Charakterisierung von
Komponenten der *Bs4*-vermittelten Resistenz**

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 Annett Strauß

geb. am 07.03.1978 in Greiz

Gutachterin bzw. Gutachter

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Thomas Debener
3. Dr. habil. Patrick Schweizer

Halle (Saale), 19.05.2010

Zusammenfassung

Das Resistenzprotein Bs4 aus Tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) vermittelt Resistenz gegenüber Stämmen des Phytopathogens *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, die das Avirulenzprotein AvrBs4 in die Pflanzenzellen translozieren. Bs4 gehört zur NBS (*nucleotide binding site*)-LRR (*leucine-rich repeat*)-Klasse pflanzlicher Resistenzproteine. N-terminal weist Bs4 eine Domäne mit Homologie zum *Drosophila* Toll- und Interleukin-1-Rezeptor aus Säugetieren auf (TIR-Domäne). Um die molekularen Mechanismen der Bs4-vermittelten Resistenz aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit Hefe-Dihybrid-Sichtungen zur Identifizierung Bs4-assoziiierter Proteine durchgeführt. Von sieben identifizierten Bs4-Interaktoren wurden drei *in planta* analysiert. Für das Hitzeschockprotein SlcpHsp70 konnte die Assoziation mit Bs4 mittels Koimmunopräzipitation (KoIP) bestätigt werden. Ebenfalls mittels KoIP, aber auch *in planta* mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation konnte eine Interaktion von Bs4 mit der Serin/Threonin-Phosphatase 5 (PP5), die in vorangegangenen Arbeiten als Interaktor Bs4-homologer Resistenzproteine identifiziert wurde, nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Assoziation von PP5 mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 *in planta* gezeigt werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Bs4 *in planta* im Komplex mit PP5 und Hsp90 vorliegt. Eine funktionale Relevanz von PP5 für die Bs4-vermittelte HR war jedoch nicht nachweisbar.

Um mittels Tandemaffinitätsreinigung (*tandem affinity purification*, TAP) Interaktionspartner von Bs4 und AvrBs4 zu isolieren, wurden in vorliegender Arbeit Bs4::TAPa- und AvrBs4::TAPa-transgene Pflanzenlinien generiert. Erste Experimente zur Reinigung von AvrBs4::TAPa wurden durchgeführt.

Des Weiteren wurden cDNA-Fragmente einer Tomaten-Bibliothek unter Kontrolle des 35S-Promotors zusammen mit Bs4 und *avrBs4* in *Nicotiana benthamiana* koexprimiert, um Signalkomponenten der Bs4-vermittelten HR zu identifizieren. Die Koexpression einer Zellulosesynthase (*SlCesA1N*) bzw. eines Hsp70-Gens (*SlHsp70*) resultierte hierbei in einer verstärkten Bs4-HR.

Summary

The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) resistance protein Bs4 mediates resistance towards strains of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which translocates the avirulence protein AvrBs4 into the plant cell. Bs4 belongs to the NBS (*nucleotide binding site*)-LRR (*leucine-rich repeat*)-class of plant resistance proteins. The N-terminus of Bs4 consists of a domain homologous to the *Drosophila* Toll- and Interleukine-1-receptor of mammals (TIR domain). To elucidate the molecular mechanisms of the Bs4 mediated resistance, yeast two-hybrid screens were performed to identify Bs4 associated proteins. Three out of seven identified Bs4 interactors were further analysed *in planta*. The interaction between the isolated heat shock protein SlcpHsp70 with Bs4 was confirmed by coimmunoprecipitation. Also by coimmunoprecipitation and *in planta* by bimolecular fluorescence complementation an interaction between Bs4 and the serin/threonine phosphatase 5 (PP5) which was identified in previous studies as interactor of Bs4 homologous resistance proteins was shown. Furthermore, an association between PP5 and Hsp90 was shown *in planta*. These data indicate that *in planta* Bs4 appears in complex with PP5 and Hsp90. A functional relevance of PP5 for the Bs4-mediated HR could not be shown.

To isolate Bs4 and AvrBs4 interactors by tandem affinity purification (TAP) Bs4::TAPa and AvrBs4::TAPa transgenic plants were generated. First experiments to purify AvrBs4::TAPa were performed.

In addition, cDNA fragments of a tomato library under the transcriptional control of the 35S promoter were coexpressed with *Bs4* and *avrBs4* in *Nicotiana benthamiana* to identify signalling components of the *Bs4*-HR. The coexpression of a cellulase synthase (*SlCesA1N*) and a *Hsp70* gene (*SlHsp70*) results in a stronger *Bs4*-HR, respectively.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen	1
1.2 Effektor-induzierte Immunität	3
1.3 Mechanismen der R-Avr-Erkennung.....	3
1.4 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate.....	6
1.5 Struktur und Funktion von AvrBs3 und AvrBs3-ähnlichen Proteinen	7
1.6 AvrBs3 und AvrBs4 als Avirulenzdeterminanten.....	8
1.7 Bs4 ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes TIR-NBS-LRR-Protein.....	10
1.8 Resistenzproteine der NBS-LRR-Klasse.....	11
1.9 Regulation der NBS-LRR-Proteinaktivität.....	14
1.10 Die Serin/Threonin-Phosphatase 5 (PP5).....	15
1.11 Zielstellungen dieser Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.2 Lösungen und Puffer	18
2.3 Nährmedien für Bakterien	18
2.4 Bakterienstämme	19
2.5 Verwendete Vektoren und Plasmide	20
2.6 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
2.7 Stabile Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
2.8 Stabile Transformation einer BY-2-Zellkultur	22
2.9 Erhaltung und Kultivierung der BY-2-Zellkultur.....	22
2.10 Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.10.2 Isolierung von RNA aus Tomate und <i>N. benthamiana</i>	23
2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	24
2.12 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen.....	24
2.13 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.14 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	25
2.15 cDNA-Synthese und RT-PCR.....	26
2.16 RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>).....	26
2.17 Sequenzierung von DNA-Fragmenten	26
2.18 Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten	27
2.18.1 Klonierung von PCR-Produkten in pENTR/D-TOPO	27
2.18.2 Klonierung von Restriktionsfragmenten in Expressionsvektoren.....	27
2.19 Klonierung mittels GATEWAY-Technologie.....	27

2.20	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	28
2.21	Transformation von Bakterienzellen	29
2.21.1	Elektroporation von <i>E. coli</i> oder <i>A. tumefaciens</i>	29
2.21.2	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	29
2.22	Dauerhafte Lagerung von Bakterien.....	29
2.23	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation	30
2.24	Isolierung von Proteinkomplexen mittels Tandemaffinitätsreinigung	31
2.24.1	Nachweis der TAPa-markierten Proteine in pflanzlichen Proteinextrakten.....	31
2.24.2	Nachweis von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa in transgenen Zellkulturlinien	31
2.24.3	Reinigungsprotokolle	32
2.25	Immunologischer Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE und Immunoblotanalyse) ...	34
2.25.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.26	Sichtung einer Tomaten-cDNA-Bibliothek mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems.....	35
2.26.1	Medien und Lösungen für die Kultivierung und Selektion von Hefen	36
2.26.2	Hefestämme	37
2.26.3	Transformation von Hefezellen	37
2.26.4	Köder- und Beutekonstrukte.....	38
2.26.5	Nachweis der Köderproteine	38
2.26.6	Sichtung der Hefe-Bibliothek	39
2.26.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen	39
2.26.8	Gerichtete Interaktionsstudien.....	40
2.27	Sichtung einer Tomaten-cDNA-Überexpressionsbibliothek.....	40
2.27.1	Eine <i>Entry</i> -cDNA-Bibliothek aus Tomate	40
2.27.2	Konjugation – triparentale Paarung.....	41
2.28	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (<i>bimolecular fluorescence complementation</i> , BiFC).....	42
2.29	Analysen am <i>Laser Scanning</i> -Mikroskop (LSM)	42
2.30	Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i> (VIGS).....	43
2.30.1	<i>Silencing</i> von Bs4-Interaktoren in <i>N. benthamiana</i>	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Isolierung von Interaktoren des Resistenzproteins Bs4 mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems	45
3.1.1	Expression der Köderproteine in Hefe	45
3.1.2	Test auf Autoaktivierung	46
3.1.3	Sichtung der Tomaten-Bibliothek mit Bs4 und den Bs4-Domänen als Köderproteine	46
3.1.4	Verifizierung der TIR- und NBS-Interaktoren in Hefe	47
3.1.5	Sequenzanalyse der TIR- und NBS-Interaktoren	49
3.1.6	Interaktionsstudien mit den bakteriellen Avirulenzproteinen AvrBs4 und AvrBs3.....	51
3.1.7	Auswahl von Bs4-Interaktoren für die <i>in planta</i> -Analyse.....	54
3.1.8	Lokalisation von SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR <i>in planta</i>	55
3.1.9	KoIP-Studien mit SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR	58
3.1.10	Funktionale Analysen in <i>N. benthamiana</i>	59
3.2	Analyse der Serin/Threonin-Phosphatase LePP5 im Kontext der Bs4-vermittelten Resistenz	61
3.2.1	Transkriptanalyse von <i>LePP5</i> in Tomate	61
3.2.2	Lokalisation von <i>LePP5</i> <i>in planta</i>	63
3.2.3	Koimmunopräzipitation von <i>LePP5</i> mit Bs4	64
3.2.4	Interaktionsstudien mit Bs4, <i>LePP5</i> und Hsp90 <i>in planta</i>	68

3.2.5	Koexpression von LePP5 mit Bs4 und AvrBs4	70
3.2.6	Virus-induziertes Gen-Silencing des <i>LePP5</i> -Homologs in <i>N. benthamiana</i>	71
3.3	Isolierung von Bs4- und AvrBs4-Proteinkomplexen mittels Tandemaffinitätsreinigung	77
3.3.1	Funktionale Analyse von Bs4::TAPa in <i>N. benthamiana</i>	77
3.3.2	Generierung <i>Bs4::TAPa</i> -transgener <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen.....	79
3.3.3	Expression von AvrBs4-Derivaten als C-terminale TAPa-Fusionen in <i>N. benthamiana</i>	80
3.3.4	Einstufige Reinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa	81
3.3.5	Stabile Transformation einer BY-2-Zellkulturlinie mit <i>avrBs4</i> Δ s227R6::TAPa	83
3.3.6	Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab aus Zellkulturextrakt.....	84
3.4	Sichtung einer cDNA-Überexpressionsbibliothek <i>in planta</i> zur Identifizierung von Signalkomponenten der <i>Bs4</i> -vermittelten HR.....	87
3.4.1	Eine cDNA-Überexpressionsbibliothek aus Tomate.....	87
3.4.2	Sichtung der Überexpressionsbibliothek <i>in planta</i>	88
3.4.3	Das cDNA-Insert des Bibliotheksklons #1946 kodiert für den C-Terminus einer Zellulosesynthase (<i>CesA</i>)	89
3.4.4	Das cDNA-Insert des Bibliotheksklons #2113 kodiert für ein zytoplasmatisches Hsp70-Protein.....	91
3.4.5	Expression von <i>SlCesA4N</i> und <i>SlHsp70</i> in <i>N. benthamiana</i>	93
4.	Diskussion.....	95
4.1	Identifizierung und Analyse <i>Bs4</i> -assoziierter Proteine	95
4.1.1	SlcpHsp70 assoziiert mit dem Resistenzprotein <i>Bs4</i>	95
4.1.2	Interaktionsstudien und funktionale Analysen lieferten keinen Hinweis auf eine Involvierung von SIEP1 und SIPRR in die <i>Bs4</i> -vermittelte HR	97
4.1.3	Die Serin/Threonin-Phosphatase 5 interagiert mit <i>Bs4</i> im Zytoplasma pflanzlicher Zellen.....	100
4.2	Tandemaffinitätsreinigung zur Identifizierung <i>Bs4</i> - und AvrBs4-assoziierter Proteine..	106
4.2.1	Expression von Bs4::TAPa in <i>N. benthamiana</i>	106
4.2.2	Reinigung von AvrBs4::TAPa aus pflanzlichen Proteinextrakten	107
4.3	Sichtung einer cDNA-Überexpressionsbibliothek in <i>N. benthamiana</i>	111
4.3.1	Die verstärkte <i>Bs4</i> -HR nach Kotransformation von 35S: <i>SlCesA4N</i> ist vermutlich auf das <i>Silencing CesA</i> -homologer Gene in <i>N. benthamiana</i> zurückzuführen.....	111
4.3.2	Die verstärkte <i>Bs4</i> -HR nach Kotransformation von 35S: <i>SlHsp70</i> wird vermutlich durch die Induktion von Zelltodreaktionen durch das <i>Silencing</i> mehrerer <i>Hsp70</i> -Endogene hervorgerufen	113
4.4	Ausblick auf weiterführende Arbeiten	114
5.	Literatur	115
ANHANG		130

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Zickzack-Modell zur Koevolution pflanzlicher Abwehr- und pathogener Anpassungsmechanismen.....	2
Abbildung 2: Mechanismen der R-Avr-Erkennung	5
Abbildung 3: Bakterielle Fleckenkrankheit und HR auf Paprika und Tomate.....	6
Abbildung 4: Struktur und Erkennung von AvrBs3, AvrBs4 und AvrHah1	9
Abbildung 5: Strukturelle Varianz von NBS-LRR-Proteinen.....	13
Abbildung 6: Arbeitsmodell zur Regulation von Bs4	16
Abbildung 7: GAL4-Hefe-Dihybrid-System.....	36
Abbildung 8: Expression von Bs4 und den Bs4-Domänen als GAL4-BD-Fusionsproteine in Hefe	46
Abbildung 9: Bestätigung der Interaktion von Bs4-TIR bzw. Bs4-NBS mit Beuteproteinen der Tomaten-Bibliothek.....	49
Abbildung 10: Gerichtete Interaktionsstudien zwischen den isolierten Bs4-Interaktoren und den Avirulenzproteinen AvrBs3 und AvrBs4	53
Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR <i>in planta</i>	56
Abbildung 12: KoIP-Analysen für SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR Δ C mit Bs4	59
Abbildung 13: Die Überexpression bzw. das <i>Silencing</i> von <i>cpHsp70</i> , <i>EP1</i> sowie <i>PRR</i> haben keinen Effekt auf die <i>Bs4</i> -HR.....	60
Abbildung 14: <i>LePP5</i> wird konstitutiv exprimiert.....	62
Abbildung 15: <i>LePP5</i> lokalisiert im Zytoplasma und Zellkern.....	64
Abbildung 16: Proteindomänen von <i>LePP5</i>	65
Abbildung 17: <i>LePP5</i> kopräzipitiert mit Bs4	66
Abbildung 18: <i>LePP5</i> assoziiert mit der LRR-Domäne von Bs4.....	67
Abbildung 19: <i>LePP5</i> interagiert mit Bs4 und NbHsp90-2 <i>in planta</i>	69
Abbildung 20: Die Koexpression von <i>LePP5</i> hat keinen detektierbaren Effekt auf die <i>Bs4</i> -HR	70
Abbildung 21: Schematische Darstellung der <i>LePP5</i> -CDS aus Tomate.....	72
Abbildung 22: Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i> von <i>PP5</i> in <i>N. benthamiana</i>	74
Abbildung 23: Reduktion der Transkriptmenge von <i>NbPP5</i> in <i>PP5-gesilenceten</i> Pflanzen.....	75
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Tandemaffinitätsreinigung eines TAPa-markierten Proteins.....	78
Abbildung 25: Expression von Bs4::TAPa in <i>N. benthamiana</i>	79
Abbildung 26: Phänotypische Analyse <i>Bs4::TAPa</i> -transgener <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen.....	80
Abbildung 27: Expression von AvrBs4 Δ s227R2::TAPa und AvrBs4 Δ s227R6::TAPa in <i>N. benthamiana</i>	81
Abbildung 28: Affinitätsreinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab .	83
Abbildung 29: Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab	85
Abbildung 30: Einstufige Reinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa unter Verwendung von transgenem Zellkulturmaterial.....	86
Abbildung 31: PCR-basierte Analyse der Insertgrößen ausgewählter Klone der Überexpressionsbibliothek	88

Abbildung 32: Die 35S-Expression von vier Klonen der Tomaten-cDNA-Bibliothek resultiert in einer verstärkten <i>Bs4</i> -HR	90
Abbildung 33: Schematische Darstellung der Sequenzalignments für <i>SICesAΔN</i> und <i>SIHsp70</i>	92
Abbildung 34: Phänotypen nach transienter Transformation von 35S: <i>SICesAΔN</i> und 35S: <i>SIHsp70</i> in <i>N. benthamiana</i>	94
Abbildung 35: Struktureller Vergleich von <i>AtCesA1</i> und <i>SICesAΔN</i>	112

Tabellen:

Tabelle 1: Antibiotika – Stammlösungen und Arbeitsverdünnungen	19
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.....	19
Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	35
Tabelle 4: Hefestämme des MATCHMAKER GAL4-Hefe-Dihybrid-Systems	37
Tabelle 5: Sichtung einer Tomaten-cDNA-Bibliothek mit <i>Bs4</i> und den <i>Bs4</i> -Domänen als Köderproteine	47
Tabelle 6: Analyse der <i>Bs4</i> -TIR- und <i>Bs4</i> -NBS-Interaktoren in Hefe	48
Tabelle 7: Sequenzhomologien der isolierten <i>Bs4</i> -TIR- und <i>Bs4</i> -NBS-Interaktoren.....	51
Tabelle 8: Weitere notwendige bzw. mögliche Experimente zur Analyse der biologischen Relevanz von <i>Bs4</i> -Interaktoren	99
Tabelle 9: Komplementäre Ansätze zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.....	100
Tabelle 10: Interaktoren von NBS-LRR-Proteinen	109

TAB1: Verwendete Vektoren, Plasmide und Binärvektorkonstrukte

Anhang

TAB2: Verwendete Oligonukleotide

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>activation domain</i> , Transkriptionsaktivierungsdomäne
AS	Aminosäure(n)
<i>avr</i> , Avr	Avirulenz
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i> , bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
C-	Carboxy-
CC	<i>coiled-coil</i>
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
d.h.	das heißt
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<i>EDS1</i>	<i>enhanced disease susceptibility 1</i>
ETI	<i>effector-triggered immunity</i> , Effektor-induzierte Immunität
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HR	hypersensitive Reaktion
<i>hrp</i>	hypersensitive Reaktion und Pathogenität
Hsp	Hitzeschockprotein
kb	Kilobasenpaare
KoIP	Koimmunopräzipitation
<i>Le</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (neu: <i>Solanum lycopersicum</i>)
LRR	<i>leucine-rich repeats</i> , Leucin-reiche Wiederholungen
min	Minute(n)
N-	Amino-
NBS	<i>nucleotide binding site</i> , Nukleotid-Bindedomäne
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal

nt	Nukleotide
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> , PAMP-induzierte Immunität
pv.	Pathovar
R, R	Resistenz
<i>RAR1</i>	<i>required for Mla12 resistance</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcribed PCR</i>
<i>SGT1</i>	<i>suppressor of G2 allele of SKP1</i>
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TAL	<i>transcription activator-like</i>
TAP	<i>tandem affinity purification</i> , Tandemaffinitätsreinigung
TIR	Toll/Interleukin 1-Rezeptor-ähnliche Domäne
TPR	<i>tetratricopeptid repeat</i>
<i>upa</i>	<i>upregulated by AvrBs3</i>
VIGS	Virus-induziertes Gen- <i>Silencing</i>
WRKY	Tryptophan (W)-Arginin (R)-Lysin (K)-Tyrosin (Y)-Motiv
WS	<i>watersoaked lesions</i> , wässrige Läsionen
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Y2H	<i>yeast two-hybrid</i> , Hefe-Dihybrid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel
35S	35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
Δ	Delta, Deletion

1. Einleitung

Jährlich verursachen Infektionen ökonomisch relevanter Nutzpflanzen mit Viren, Bakterien, Oomyceten, Pilzen, Nematoden und Insekten erhebliche Ertragseinbußen und wirtschaftliche Schäden. Der Verlust beläuft sich dabei weltweit auf etwa 24 % der Gesamtproduktion (Agrios, 2005). Bedingt werden die hohen Ertragseinbußen vor allem durch den Anbau von Nutzpflanzen in Monokulturen. Grundsätzlich besitzen Pflanzen jedoch zahlreiche Abwehrmechanismen, um sich vor potentiellen Pathogenen zu schützen. In erster Instanz verhindern präformierte strukturelle und chemische Barrieren, dass Pathogene in Pflanzen eindringen können. Dazu zählen der Epidermis aufgelagerte Wachsschichten, die Kutikula, die pflanzlichen Zellwände sowie antimikrobiell wirkende Substanzen, die Teil der sogenannten Nicht-Wirtsresistenz oder Basalresistenz sind. In zweiter Instanz vermitteln pflanzliche Rezeptoren (Immunrezeptoren) die Erkennung von Pathogenen und die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen.

1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Pflanzen haben zwei Klassen von Immunrezeptoren evolviert. Als Teil der Basalresistenz detektiert die erste Klasse konservierte mikrobielle Strukturen, sogenannte Mikroben- oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*microbe-/pathogen-associated molecular patterns*, MAMPs/PAMPs). Als PAMPs werden beispielsweise abundante bakterielle Proteine wie Flagellin oder der Elongationsfaktor Tu durch spezifische, membranständige Rezeptoren erkannt, was zur Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen führt (Nürnberger und Kemmerling, 2006; Zipfel *et al.*, 2006; Altenbach und Robatzek, 2007; Schwessinger und Zipfel, 2008). Bei dieser PAMP-induzierten Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI, Jones und Dangl, 2006; Abbildung 1) kommt es unter anderem zu Einlagerungen von Kallose, Lignin oder von phenolischen Verbindungen in die pflanzliche Zellwand. Dies erschwert das weitere Vordringen der Mikroben bzw. deren Vermehrung im pflanzlichen Gewebe. Zusätzlich wirken neu gebildete *pathogenesis-related* (PR)-Proteine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Sekundärmetabolite wie Phytoalexine antimikrobiell (Fritig *et al.*, 1998; Nürnberger und Lipka, 2005; He *et al.*, 2007).

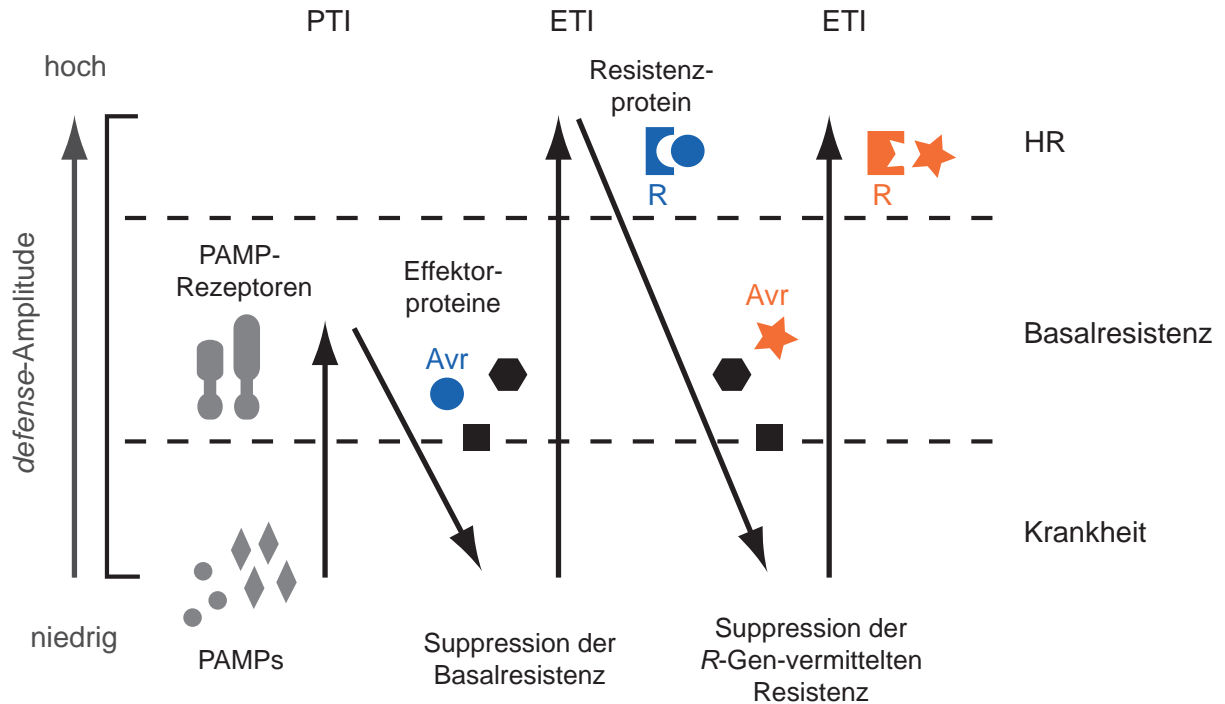


Abbildung 1: Zickzack-Modell zur Koevolution pflanzlicher Abwehr- und pathogener Anpassungsmechanismen. Die Erkennung von PAMPs durch membranständige pflanzliche Rezeptoren bedingt die Induktion der Basalabwehr (*PAMP-triggered immunity*, PTI), wodurch das Wachstum des Pathogens in der Wirtspflanze beschränkt wird. Jedoch können Effektorproteine, die vom Pathogen in die Wirtszelle transloziert werden, die PTI supprimieren. Das Pathogen kann die Wirtspflanze kolonisieren. Im Falle einer *R*-Gen-vermittelten Erkennung eines dieser Effektorproteine (blauer Kreis) wird eine verstärkte Abwehrreaktion induziert (*effector-triggered immunity*, ETI), die oftmals mit einer hypersensitiven Reaktion, einem schnellen Zelltod am Infektionsort, einhergeht. Durch Verlust oder Mutation des erkannten Effektors und/oder durch den Erwerb neuer Effektorproteine, z.B. durch horizontalen Gentransfer, kann das Pathogen die ETI umgehen oder unterdrücken und die Wirtspflanze besiedeln. Die Evolvierung neuer *R*-Gene ermöglicht wiederum der Pflanze, andere oder neu erworbene Effektorproteine (oranger Stern) zu detektieren und eine ETI zu induzieren. Modell verändert nach Jones und Dangl (2006).

Einige Pathogene sind jedoch in der Lage, die PTI zu vermeiden oder zu unterdrücken (da Cunha *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Zhou und Chai, 2008) (Abbildung 1). So supprimieren verschiedene Typ-III-sekretierte Proteine (Effektorproteine) pflanzenpathogener Bakterien beispielsweise die Kalloseeinlagerung in Zellwände (Hauck *et al.*, 2003; de Torres *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007). Vermutlich in Anpassung an Pathogene, die die Basalabwehr umgehen, haben Pflanzen wiederum Resistenzgene (*R*) evolviert, die die zweite Klasse von Immunrezeptoren repräsentieren. Diese vermitteln die spezifische Erkennung einzelner Effektorproteine des Pathogens, die auch als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet werden. Diese Form der Resistenz wird als Gen-für-Gen-Resistenz oder auch Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI, Jones und Dangl, 2006; Abbildung 1) bezeichnet. Spezialisierte Phytopathogene besitzen jedoch wiederum Effektorproteine, die

auch diese Form der pflanzlichen Resistenz unterdrücken können (Jones und Dangl, 2006; Zhou und Chai, 2008). Durch Evolvierung neuer *R*-Gen-Spezifitäten kann die Pflanze ihrerseits diese Suppression der ETI umgehen (Jones und Dangl, 2006). Diese Koevolution pflanzlicher Abwehr- und pathogener Anpassungsmechanismen ist im sogenannten Zickzack-Modell zusammenfassend dargestellt (Abbildung 1).

1.2 Effektor-induzierte Immunität

Basis der Effektor-induzierten Immunität ist die von H. Flor formulierte Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1956). Demnach kommt es nur zur Resistenz (inkompatible Interaktion), wenn das *R*-Gen in der Wirtspflanze und das korrespondierende *avr*-Gen im Pathogen exprimiert werden. Häufig assoziiert mit der ETI ist der Zelltod der Wirtszellen am Infektionsort. Diese als hypersensitive Reaktion (HR) beschriebene Abwehrreaktion verhindert eine Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze (Klement und Goodman, 1967; Lam *et al.*, 2001; Greenberg und Yao, 2004). Das Pathogen ist in diesem Fall avirulent. Das Fehlen oder die Inaktivität einer oder beider *R*-/*avr*-Komponenten hingegen bedingt, dass das Pathogen sich in der Pflanze vermehren und Krankheitssymptome auslösen kann (kompatible Interaktion). In diesem Fall ist das Pathogen virulent und die Wirtspflanze suszeptibel. Im Laufe der letzten 15 Jahre konnte die Gültigkeit der Gen-für-Gen-Hypothese durch die Analyse zahlreicher Pflanzen-Pathogen-Interaktionen sowie die Isolierung korrespondierender *R*- und *avr*-Genpaare bestätigt werden.

1.3 Mechanismen der R-Avr-Erkennung

Auf der Basis molekularer Analysen wurden drei Modelle entwickelt, die die Mechanismen der *R*-vermittelten Erkennung von Avr-Proteinen beschreiben. Das Rezeptor-Liganden-Modell geht von einer direkten Interaktion zwischen dem Avr-Protein als Liganden und dem vom *R*-Gen kodierten Rezeptor aus (Gabriel und Rolfe, 1990; Keen, 1990; Abbildung 2A). Experimentell wird das Rezeptor-Liganden-Modell bislang jedoch nur durch vier nachgewiesene, direkte R-Avr-Interaktionen gestützt (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006). Für die meisten R-Proteine wird daher ein indirekter Mechanismus der Avr-Erkennung postuliert. Im *guard*-Modell fungiert das R-Protein als *guard* („Wächter“) eines Wirtsproteins, das direkt mit dem Avr-Protein

interagiert und/oder durch dieses modifiziert wird. Dabei stellt das Wirtsprotein ein potentiell Virulenztarget (*pathogenicity target*) des Avr-Proteins dar (van der Biezen und Jones, 1998a; Dangl und Jones, 2001; Abbildung 2A). Die beiden *Pseudomonas syringae*-Effektoren AvrRpm1 und AvrB beispielsweise induzieren eine Phosphorylierung des Wirtsproteins RIN4 (*RPM1 interacting protein 4*), was in der Aktivierung der *RPM1*-vermittelten Resistenz resultiert (Mackey *et al.*, 2002; Abbildung 2B). AvrRpt2, eine Cysteinprotease aus *P. syringae*, bindet ebenfalls an RIN4, spaltet es und induziert damit die *RPS2*-vermittelte Abwehr (Axtell *et al.*, 2003; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Abbildung 2B). In allen drei Fällen resultieren Avr-induzierte Veränderungen des *pathogenicity targets* in der Induktion der *R*-vermittelten Abwehr. In einem neuen Modell, dem *decoy*-Modell (van der Hoorn und Kamoun, 2008; Abbildung 2A), wird aktuell diskutiert, dass *pathogenicity targets* wie RIN4 auch ein *decoy* („Falle“ oder „Lockvogel“) darstellen könnten. Als *decoy* wird unter anderem ein Avr-Target bezeichnet, dass notwendig für die *R*-Proteinfunktion in einer resistenten Pflanze ist, dessen Avr-induzierte Modifizierung jedoch nicht in einer verstärkten Pathogen-Fitness in einer suszeptiblen Pflanze resultiert (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Dies wird jedoch für *pathogenicity targets* im Zusammenhang mit dem *guard*-Modell angenommen. Da bisher nicht gezeigt werden konnte, dass die Modifizierungen von RIN4 einen Einfluss auf die bakterielle Virulenz im Rahmen einer kompatiblen Interaktion hat (Belkhadir *et al.*, 2004; Lim und Kunkel, 2004), könnte RIN4 ein *decoy* repräsentieren.

Als *decoy* fungiert allerdings auch der Promotor des Resistenzgens *Bs3* aus Paprika. So induziert AvrBs3 aus dem bakteriellen Phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* die Expression des Resistenzgens *Bs3*, was zur Induktion einer HR führt. Der Promotor des *Bs3-E*-Allels suszeptibler Pflanzen wird hingegen von AvrBs3 nicht aktiviert. *Bs3* kodiert für eine Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO). Neben der Vermittlung der Erkennung von AvrBs3 und einem homologen Avr-Protein, AvrHah1, ist bislang keine Funktion von *Bs3* in der Pflanze bekannt (Römer *et al.*, 2007; Schornack *et al.*, 2008).

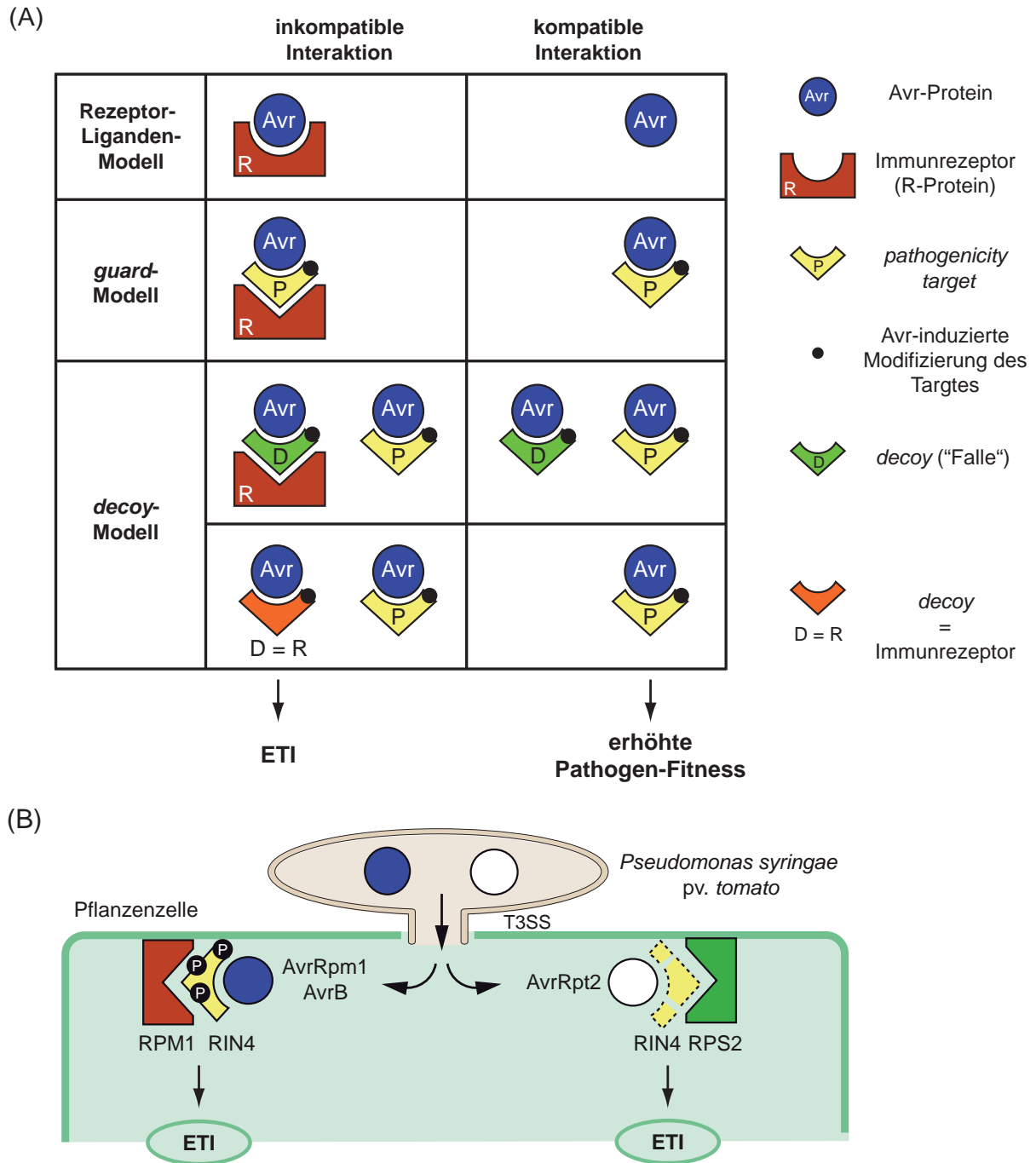


Abbildung 2: Mechanismen der R-Avr-Erkennung. (A) Rezeptor-Liganden-Modell: Eine direkte Interaktion von R- und Avr-Protein führt zur Auslösung der ETI. *guard*-Modell: Ein Wirtsprotein (*pathogenicity target*) vermittelt eine indirekte Interaktion zwischen R- und Avr-Protein. Die Interaktion und/oder eine Avr-induzierte Veränderung des Wirtsproteins resultiert in der Induktion der ETI. Im Rahmen einer kompatiblen Interaktion (susceptible Pflanze) führt die Modifizierung des *pathogenicity targets* zu einer erhöhten Pathogen-Fitness. *decoy*-Modell: Nach dem *decoy*-Modell erfolgt die Erkennung ebenfalls indirekt. Das Wirtsprotein (*decoy*) stellt jedoch kein potentielles Virulenztarget des Avr-Proteins dar, sondern ist ausschließlich in die Avr-Erkennung involviert. Der *decoy* kann auch den eigentlichen Immunrezeptor repräsentieren. Im Falle des *R*-Gens *Bs3* beispielsweise bindet und aktiviert AvrBs3 den *Bs3*-Promotor, wodurch die ETI induziert wird. (B) RIN4 ist ein potentielles *pathogenicity target* der *Pseudomonas*-Effektoren AvrRpm1, AvrB und AvrRpt2. Dabei resultiert eine Hyperphosphorylierung von RIN4 durch AvrRpm1 oder AvrB bzw. eine Spaltung durch AvrRpt2 in der Induktion der *RPM1*- bzw. *RPS2*-vermittelten Abwehr.

1.4 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate

Aufgrund ihrer guten experimentellen Zugänglichkeit dienen Gram-negative Bakterien der Gattungen *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* sowie *Xanthomonas* als Modellorganismen zur molekularbiologischen Untersuchung von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye (*Xcv*), auch bezeichnet als *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Vauterin *et al.*, 2000) oder *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004), ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit, einer ökonomisch bedeutsamen Krankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen in feucht-warmen Regionen. *Xcv* dringt über Verwundungen und natürliche Öffnungen in das pflanzliche Gewebe ein und vermehrt sich lokal im Apoplasten. Krankheitssymptome treten auf allen infizierten, oberirdischen Pflanzenteilen auf (Agrios, 2005; Abbildung 3A-C). Die zunächst dunkelgrünen Flecken, auch als wässrige Läsionen bezeichnet, werden im Verlauf der Krankheit nekrotisch (Abbildung 3A-C, 3F). Resistente Paprika- und Tomatenpflanzen zeigen makroskopisch keine Symptome. Im Labor kommt es jedoch nach Inokulation eines hohen Titers avirulenter *Xcv*-Stämme zur Ausbildung einer HR im infizierten Blattgewebe (Abbildung 3D und E).

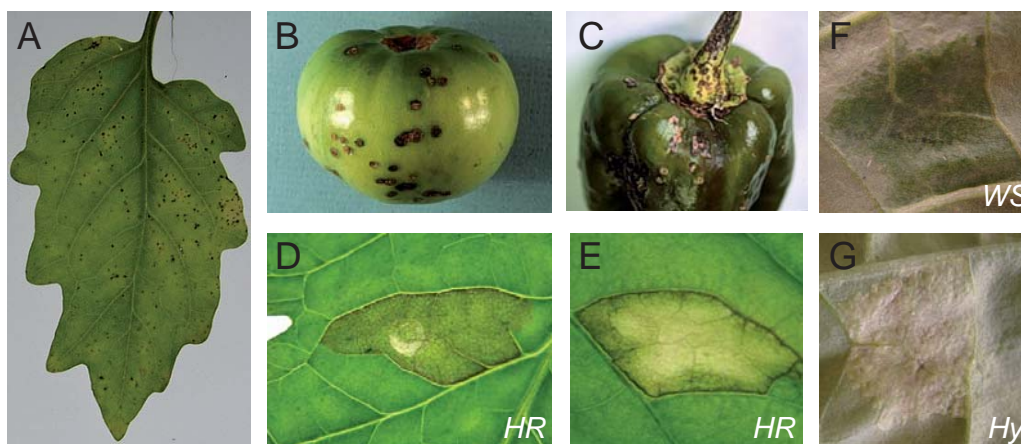


Abbildung 3: Bakterielle Fleckenkrankheit und HR auf Paprika und Tomate. Typische Symptome einer Infektion von Paprika- und Tomatenpflanzen mit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) sind wässrige Läsionen auf Blättern und Früchten, die später nekrotisch werden (**A** und **B**: Tomate; **C**: Paprika). Im Labor treten nach Inokulation eines hohen Bakterientiters (4×10^8 Zellen/ml) eines avirulenten *Xcv*-Stammes eine hypersensitive Reaktion (HR; **D**: Tomate, **E**: Paprika) und nach Inokulation eines virulenten Stammes wässrige Läsionen (water soaking, WS; **F**: Paprika) auf. Nach Inokulation eines AvrBs3-translozierenden *Xcv*-Stammes wird eine Hypertrophie, eine Vergrößerung von Mesophyllzellen, im infizierten Blattgewebe sichtbar (**G**: Paprika). (Bildquellen: **A**: S. Schornack (unveröffentlicht), **B** und **C**: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/Vegetable/vdin018/vdin018.htm>; 27.10.2008).

1.5 Struktur und Funktion von AvrBs3 und AvrBs3-ähnlichen Proteinen

Notwendig sowohl für die Ausbildung von Krankheitssymptomen als auch die Induktion einer HR ist das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) von *Xcv*, über das mehr als 20 Effektorproteine direkt in das Zytoplasma der pflanzlichen Wirtszellen transloziert werden (Büttner und Bonas, 2006). AvrBs3 ist einer dieser Effektoren und das erste beschriebene Mitglied einer Proteinfamilie, die auch als AvrBs3-Familie bezeichnet wird. AvrBs3 wurde basierend auf seiner Erkennung in resistenten Paprikapflanzen isoliert, die das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* enthalten (Bonas *et al.*, 1989). Aktuell sind mehr als 100 AvrBs3-ähnliche Proteine aus *Xanthomonas* spp. bekannt (InterPro Entry: IPR005042), wobei die Homologen eine Sequenzidentität von 80-97 % aufweisen (Schornack *et al.*, 2006). Weitere Homologe sind bisher nur aus *Ralstonia solanacearum* bekannt (Salanoubat *et al.*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004; Heuer *et al.*, 2007). Besonderes Merkmal AvrBs3-ähnlicher Proteine ist die zentrale Domäne bestehend aus 1,5 (Avr/Pth3, Wu *et al.*, 2007) bis 28,5 (PthXo3, Yang und White, 2004) nahezu identischen Wiederholungen (*Repeats*) eines 34 (*Xanthomonas*) bzw. 35 (*Ralstonia*) Aminosäure (AS)-Motivs (Abbildung 4A). Die Effektorproteine unterscheiden sich hauptsächlich an den AS-Positionen 12 und 13 der einzelnen *Repeats* (hypervariable Reste; Schornack *et al.*, 2006). Funktionale Analysen von AvrBs3 haben gezeigt, dass Anzahl und Anordnung der *Repeats* die Spezifität der R-Gen-vermittelten Erkennung bestimmen (Herbers *et al.*, 1992).

Im N-Terminus weisen die Mitglieder der AvrBs3-Familie ein Signal für die Typ-III-abhängige Translokation auf. Im C-Terminus liegen funktionale Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) und eine saure Aktivierungsdomäne (*activation domain*, AD) (van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Gürlebeck *et al.*, 2006; Abbildung 4A). Letztere sind typische Merkmale eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. AvrBs3-Homologe werden daher auch als *transcription activator-like* (TAL)-Effektoren bezeichnet (Yang *et al.*, 2006). In der Tat konnte für AvrBs3 und AvrXa7 eine Bindung an DNA nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Für AvrBs3 wurde gezeigt, dass es an pflanzliche Promotoren bindet und diese transkriptionell aktiviert (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Demnach weisen TAL-Effektoren nicht nur strukturelle Ähnlichkeit zu eukaryotischen Transkriptionsfaktoren auf, sondern können in der Tat als Transkriptionsaktivatoren im Zellkern der Wirtszelle fungieren, vermutlich um das Wirtstranskriptom zu Gunsten des Pathogens zu modulieren. So wurden zahlreiche AvrBs3-ähnliche Proteine zwar basierend auf ihrer Avirulenzaktivität isoliert, für viele konnte jedoch

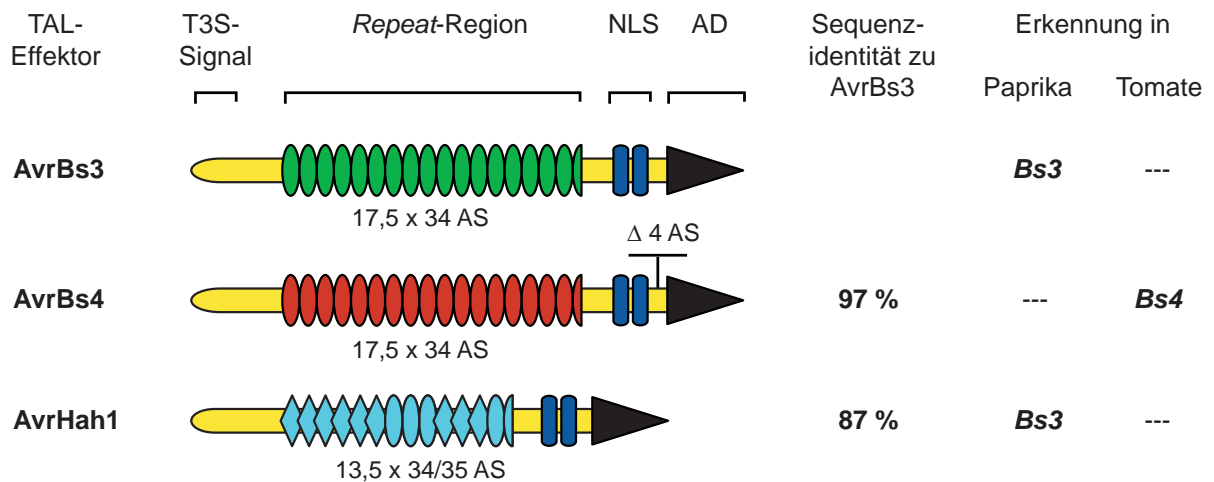
eine Beteiligung an der Pathogen-Virulenz nachgewiesen werden, die offenkundig die Primärfunktion der Effektoren darstellt (Gürlebeck *et al.*, 2006). PthXo1 beispielsweise ist ein Hauptvirulenzfaktor in *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Yang und White, 2004) und induziert die Expression von *Os8N3* in Reis, einem Gen, das für die Pollenentwicklung notwendig ist. Die Induktion von *Os8N3* ist jedoch auch essentiell für das bakterielle Wachstum (Yang *et al.*, 2006). Der TAL-Effektor PthA ist ein essentieller Virulenzfaktor von *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) und induziert in Zitruspflanzen „Pusteln“ (Hyperplasie), die eine Freisetzung von *Xac* aus dem Gewebe ermöglichen (Swarup *et al.*, 1991; Duan *et al.*, 1999). AvrBs3 induziert in suszeptiblen Paprikapflanzen eine Hypertrophie (Abbildung 3G), eine Vergrößerung von Zellen des Palisaden- und Schwammparenchyms, was vermutlich wie bei PthA der Freisetzung der Bakterien aus dem pflanzlichem Gewebe dient (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007). In Feldstudien konnte gezeigt werden, dass AvrBs3 einen positiven Effekt auf die bakterielle Verbreitung hat (Wichmann und Bergelson, 2004).

1.6 AvrBs3 und AvrBs4 als Avirulenzdeterminanten

AvrBs3 löst in Paprikaliniem (*Capsicum annuum*), die das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* tragen, eine HR aus (Bonas *et al.*, 1989; Pierre *et al.*, 2000), während das homologe Effektorprotein AvrBs4 aus *Xcv* in *Bs4*-resistenten Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) erkannt wird (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001b). Obwohl beide Proteine zu 97 % identisch sind, treten keine Kreuzreaktionen auf, das heißt, AvrBs3 wird nicht von *Bs4* erkannt bzw. AvrBs4 induziert keine HR in *Bs3*-Paprikapflanzen (Schornack *et al.*, 2005) (Abbildung 4A). Da die wenigen Sequenzunterschiede zwischen beiden Effektoren mit Ausnahme einer Deletion von vier Aminosäuren im C-Terminus nur auf die *Repeat*-Region beschränkt sind (Schornack *et al.*, 2006), sollte die Spezifität der Avr-Erkennung durch die *Repeat*-Region bestimmt sein (Bonas *et al.*, 1993). Interessanterweise wird AvrHah1 aus *X. gardneri* XV444, das „nur“ eine 87 %-ige Sequenzidentität zu AvrBs3 hat, ebenfalls von *Bs3* erkannt. Interessant ist zudem, dass AvrHah1 strukturell eine Besonderheit aufweist, da es neben 34 AS-*Repeat*-Einheiten auch *Repeats* mit 35 AS Länge enthält (Schornack *et al.*, 2008; Abbildung 4A). Ein Alignment der hypervariablen Reste der *Repeats* von AvrBs3, AvrBs4 und AvrHah1 zeigte, dass AvrBs3 und AvrHah1 zwei Blöcke identischer AS-Reste aufweisen (Abbildung 4B). Zwischen AvrBs3 und AvrBs4 sind hingegen weniger Aminosäuren konserviert (Schornack *et al.*, 2008; Abbildung 4B). Basierend auf diesen Daten

kann geschlussfolgert werden, dass die Spezifität der *Bs3*-vermittelten Erkennung durch die hypervariablen Aminosäuren bestimmt wird. Vermutlich stellen diese DNA-Interaktionsstellen dar (Schornack *et al.*, 2008).

(A)



(B)



Abbildung 4: Struktur und Erkennung von AvrBs3, AvrBs4 und AvrHah1. (A) Der N-Terminus AvrBs3-ähnlicher Proteine enthält die Signale für die Typ-III-abhängige Sekretion und Translokation. Die zentrale Region umfasst nahezu identische Wiederholungen (*Repeats*) eines 34 AS-Motivs (bzw. 34/35 AS-Motive, AvrHah1). Der C-Terminus enthält Kernlokalisierungssignale (NLSs) und eine saure Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). AvrBs3 und AvrHah1 werden von *Bs3* in Paprika und AvrBs4 von *Bs4* in Tomate erkannt. (B) Alignment der hypervariablen AS (12./13. AS der einzelnen *Repeats*) von AvrBs3, AvrBs4 und AvrHah1. Während AvrBs3 und AvrHah1 zwei Blöcke identischer AS-Reste aufweisen (schwarz hinterlegt), treten weniger konservierte Reste zwischen AvrBs3 und AvrBs4 auf (grau hinterlegt). Die Zahlen über bzw. unter dem Alignment kennzeichnen die Nummern der *Repeats* von AvrHah1 bzw. AvrBs3 und AvrBs4. Die hypervariablen AS-Reste der 35 AS-*Repeats* von AvrHah1 sind durch Fettdruck hervorgehoben. Abbildung B modifiziert nach Schornack *et al.*, 2008.

Wie bereits erwähnt, bindet und aktiviert AvrBs3 in resistenten Pflanzen den *Bs3*-Promotor (siehe 1.5). Die Induktion der Transkription ist dabei abhängig von der Präsenz der AD-Domäne in AvrBs3 (van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Römer *et al.*, 2007). Auch die Erkennung von AvrXa27 aus *Xoo* durch *Xa27* in Reis erfolgt AD-abhängig (Gu *et al.*, 2005). AvrBs4-Mutanten hingegen, die keine NLS oder AD besitzen, lösen in *Bs4*-resistenten Tomaten weiterhin eine HR aus (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001b; Schornack *et al.*, 2004). Demnach ist die *Bs4*-vermittelte Resistenz nicht an die Aktivität von AvrBs4 als Transkriptionsaktivator gekoppelt. Dies scheint jedoch nur auf die AvrBs4-Erkennung in Tomate beschränkt zu sein. In *Capsicum pubescens*, in Kartoffel (*Solanum tuberosum* 'Desiree'), in *Solanum suaveolens* und in *Nicandra physalodes* wird AvrBs4 NLS- und AD-abhängig erkannt (Minsavage *et al.*, 1999; Schornack *et al.*, 2004; Schornack, 2006, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlicht). Somit ist AvrBs4 nicht ein atypischer TAL-Effektor, sondern vielmehr *Bs4* aus Tomate ein atypisches TAL-Effektor-Resistenzgen.

1.7 *Bs4* ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes TIR-NBS-LRR-Protein

Während AvrBs4-translozierende *Xcv*-Stämme in *Solanum lycopersicum* Kultivar MoneyMaker (*Bs4*) eine HR induzieren (Abbildung 3D), tritt in *Solanum pennellii* LA2963 (*bs4*) ein von der schnellen HR abweichender Phänotyp auf. Diese Tomatenlinie zeigt nach *Xcv*-Inokulation zwar eine nekroseähnliche Reaktion, die jedoch zeitlich verzögert auftritt (Schornack *et al.*, 2005). Auf Basis dieses differentiellen Phänotyps wurde das Resistenzgen *Bs4* (*bacterial spot resistance locus no.4*) mittels kartengestützter Klonierung isoliert (Ballvora *et al.*, 2001b; Ballvora *et al.*, 2001a). *Bs4* kodiert für ein Protein mit Nukleotid-Bindedomäne (NBS, *nucleotide binding site*) und 15 leucinreichen Sequenzwiederholungen (LRRs, *leucine-rich repeats*) im C-Terminus. *Bs4* gehört damit zur größten Klasse bekannter, pflanzlicher R-Proteine, zur NBS-LRR-Klasse (Ballvora *et al.*, 2001a; Schornack *et al.*, 2004) (siehe 1.8). Im N-Terminus weist *Bs4* eine Domäne mit Homologien zum *Drosophila* Toll- und Interleukin-1-Rezeptor aus Säugetieren auf (TIR, siehe 1.8) (Schornack *et al.*, 2004). *Bs4* ist homolog zum Resistenzprotein N aus Tabak und Y-1 aus Kartoffel mit 54 % bzw. 57 % Sequenzidentität (Schornack *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *Bs4* vermitteln diese R-Proteine allerdings die Erkennung viraler Proteine (Whitham *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2002).

Neben AvrBs4 erkennt Bs4 auch die beiden AvrBs3-Homologen Hax3 und Hax4 aus *X. campestris* pv. *amoraciae* (*Xca*) (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001b; Kay *et al.*, 2005). Die molekularen Grundlagen der *Bs4*-vermittelten Resistenz sind allerdings noch weitgehend unverstanden. Die NLS- und AD-unabhängige Erkennung (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001b; Schornack *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005; siehe 1.6) weist jedoch auf eine Perzeption der Effektorproteine durch Bs4 im Zytoplasma resistenter Wirtszellen hin. In Übereinstimmung damit zeigten fluoreszenzmikroskopische Analysen und Fraktionierungsstudien, dass Bs4 im Zytoplasma lokalisiert (Schornack, 2006).

Bs4 induziert nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Koexpression mit AvrBs4 in *Nicotiana benthamiana* eine HR, was zeigt, dass Bs4 auch in *N. benthamiana* funktional und die Elemente der Signalkette konserviert sind (Schornack *et al.*, 2004).

1.8 Resistenzproteine der NBS-LRR-Klasse

NBS-LRR-Proteine vermitteln Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen, gegen Viren, Oomyceten, Bakterien, Pilze oder Insekten (McHale *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Innerhalb der NBS-LRR-Klasse wird zwischen Mitgliedern mit N-terminaler TIR- oder *coiled-coil*-Domäne (CC) unterschieden (Abbildung 5). Allerdings sind auch einzelne Mitglieder ohne konservierte N-terminale Strukturen (X, Abbildung 5) oder mit zusätzlichen Domänen (Bsp.: *solanaceous domain* (SD)-Domäne) bekannt (McHale *et al.*, 2006; Tameling und Takken, 2008).

Basierend auf der Homologie zum *Drosophila* Toll- und Interleukin-1-Rezeptor aus Säugetieren wird für die TIR-Domäne eine Rolle in der Signaltransduktion angenommen (Uematsu und Akira, 2006; Burch-Smith und Dinesh-Kumar, 2007). Aktuelle Publikationen zeigen jedoch, dass TIR- und CC-Domänen auch Interaktionen mit den *pathogenicity*- oder *decoy*-Targets (siehe 1.3) der korrespondierenden Avr-Proteine vermitteln und somit nicht nur in die Signalweiterleitung sondern auch in die Erkennung des Avr-Proteins involviert sein könnten (Mackey *et al.*, 2002; Ade *et al.*, 2007; Burch-Smith *et al.*, 2007; Caplan *et al.*, 2008; Tameling und Takken, 2008). So interagiert beispielsweise das NBS-LRR-Protein RPM1 über die CC-Domäne mit RIN4, das vom korrespondierenden Avr-Protein AvrRpm1 phosphoryliert wird. Dies führt zur Induktion der *RPM1*-vermittelten Resistenz in *Arabidopsis* (siehe 1.3, Abbildung 2B). Für die N-induzierte Resistenz in Tabak ist NRIP1 (*N receptor-interacting protein 1*), eine Schwefeltransferase, essentiell, die sowohl mit dem Avr-

Elicitor p50 des Tabakmosaikvirus (TMV) als auch mit der TIR-Domäne von N interagiert und damit vermutlich die indirekte Erkennung von p50 vermittelt (Caplan *et al.*, 2008).

Die NBS-Domäne pflanzlicher R-Proteine weist Homologie zum humanen APAF-1- und zum CED4-Protein aus *Caenorhabditis elegans* auf, weshalb die NBS-Domäne auch als NB-ARC (ARC: homologe Region in APAF-1, R-Proteinen und CED4)-Domäne bezeichnet wird (van der Biezen und Jones, 1998b). NB-ARC-Domänen enthalten konservierte, Nukleotidtriphosphat (NTP)-bindende Motive, die charakteristisch für STAND (*signal transduction ATPases with numerous domains*)-Proteine sind, zu denen auch die NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-LRR-Proteine aus Säugetieren gehören (Leipe *et al.*, 2004; Albrecht und Takken, 2006; Tameling und Takken, 2008). STAND-Proteine fungieren als molekulare Schalter. Nukleotidaustausch oder NTP-Hydrolyse resultieren in der Konformationsänderung des Proteins, wodurch Signale generiert bzw. weitergegeben werden (Leipe *et al.*, 2004). Biochemische Analysen der NBS-LRR-Proteine I-2, Mi-1 und N haben in der Tat bereits die Funktion der NBS-Domäne als ATPase bestätigt (Tameling *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2006). Punktmutationen im konservierten P-Loop des ATPase-Motivs führen zu einer reduzierten ATP-Bindung und Hydrolyse (Tameling *et al.*, 2002; Takken *et al.*, 2006) und zum partiellen bzw. vollständigen Verlust der Resistenz oder HR (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2000; Bendahmane *et al.*, 2002). Mutationen im Bereich der ARC-Region (z.B. im konservierten MHD-Motiv) einiger NBS-LRR-Proteine resultieren hingegen in autoaktiven R-Proteinen, die auch in Abwesenheit des korrespondierenden Elicitors eine HR induzieren (Bendahmane *et al.*, 2002; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Howles *et al.*, 2005; Takken *et al.*, 2006).

Die LRR-Domäne pflanzlicher R-Proteine bestimmt vermutlich die Spezifität der Avr-Erkennung. Die einzelnen *Repeats* bestehen aus 24-28 AS mit 14 konservierten Resten (LxxLxxLxLxxC/Nxx; L: Leucin, C: Cystein, N: Asparagin und x: beliebige AS) (Kajava, 1998; Tameling und Takken, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2009), wobei die Gesamtzahl der leucinreichen Wiederholungen in den verschiedenen R-Proteinen variiert. Auf der Grundlage von Kristallstrukturanalysen tierischer LRR-Proteine wird eine hufeisenförmige 3D-Struktur für die LRR-Domäne vorhergesagt. Dabei bilden parallel angeordnete β -Faltblätter die konkave Innenseite der Struktur, die eine geeignete Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen und Ligandenbindung darstellt (Kobe und Deisenhofer, 1994; McHale *et al.*,

2006). Hypervariable Lösungsmittel-exponierte AS-Reste (x) im Bereich der β -Faltblätter könnten die Erkennungsspezifität definieren (Parniske *et al.*, 1997; Meyers *et al.*, 1998; Dodds *et al.*, 2001).

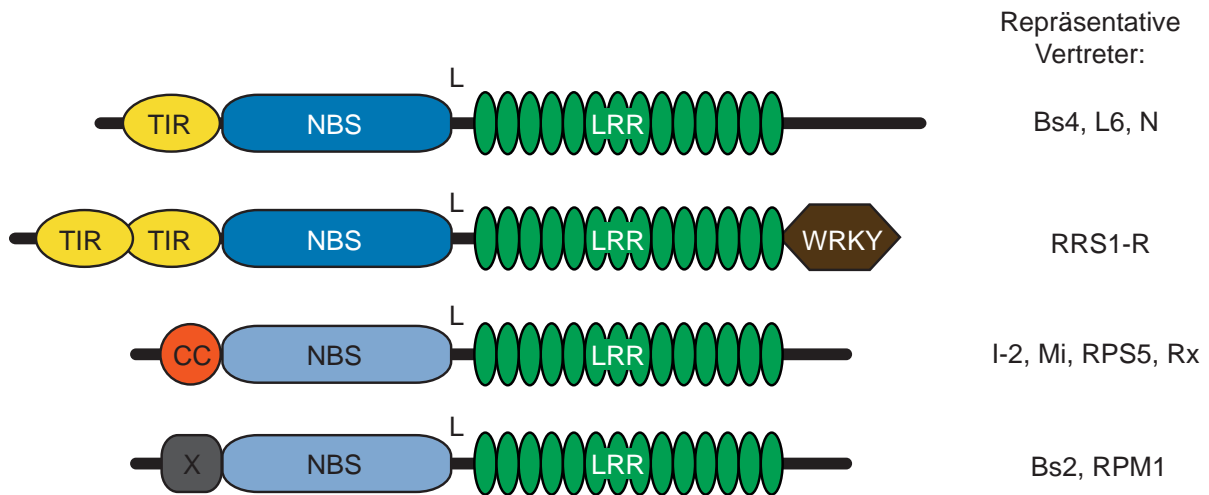


Abbildung 5: Strukturelle Varianz von NBS-LRR-Proteinen. Anhand verschiedener N- und C-terminaler Domänen können vier Strukturklassen von NBS-LRR-Proteinen unterschieden werden. TIR- und CC-NBS-LRR-Proteine weisen zudem AS-Unterschieden innerhalb der NBS-Domäne auf. Für jede Strukturklasse sind repräsentative Vertreter angegeben. Bs4, I-2, Mi aus Tomate, L6 aus Flachs, N aus Tabak, RRS1-R, RPS5 und RPM1 aus *Arabidopsis*, Rx aus Kartoffel und Bs2 aus Paprika. TIR: Toll/Interleukin-1-Rezeptor-ähnliche Domäne, CC: coiled-coil-Domäne, X: Domäne ohne eindeutiges CC-Motiv, NBS: nucleotide binding site, L: Linker, LRR: leucine-rich repeats, WRKY: WRKY-Domäne. Abbildung modifiziert nach McHale *et al.*, 2006.

Das TIR-NBS-LRR-Protein RRS1-R aus *Arabidopsis thaliana* weist im C-Terminus eine WRKY-Domäne auf (Deslandes *et al.*, 2002; Abbildung 5), die charakteristisch für die Familie von WRKY-Transkriptionsfaktoren ist. Die WRKY-Domäne vermittelt die Bindung an sogenannte W-Boxen, die auch in Promotoren zahlreicher Pathogen-responsiver Gene zu finden sind (Ulker und Somssich, 2004). Nach der *Rosetta Stone*-Hypothese weist die Fusion von R-Protein und WRKY-Domäne in RRS1-R daraufhin, dass NBS-LRR-Proteine auch physikalisch mit WRKY-Transkriptionsfaktoren assoziiert sein könnten (Marcotte *et al.*, 1999; Lahaye, 2002). In der Tat wurde kürzlich eine Interaktion zwischen dem NBS-LRR-Protein MLA10 aus Gerste und dem WRKY-Transkriptionsfaktor *Hv*WRKY2 gezeigt (Shen *et al.*, 2007). Die Fusion bzw. Assoziation von NBS-LRR-Proteinen mit WRKY-Faktoren legt nahe, dass R-Proteine als transkriptionelle Koregulatoren im pflanzlichen Zellkern fungieren könnten (Tamelung und Takken, 2008).

1.9 Regulation der NBS-LRR-Proteinaktivität

Um eine unerwünschte Aktivierung von Zelltodreaktionen zu vermeiden, muss die Funktion der R-Proteine strikt reguliert sein. Auf Proteinebene kontrollieren beispielsweise intramolekulare Interaktionen die Aktivität der NBS-LRR-Proteine. So konnten für Rx aus Kartoffel, Bs2 aus Paprika, sowie für Bs4 aus Tomate intramolekulare Interaktionen zwischen den jeweiligen LRR-Domänen und TIR-NBS bzw. CC-NBS nachgewiesen werden (Moffett *et al.*, 2002; Leister *et al.*, 2005; Schornack, 2006). Es wird postuliert, dass die Bindung der LRR-Domäne an die ARC-Region der NBS-Domäne das R-Protein im inaktiven Zustand hält. Eine direkte oder indirekte Erkennung des Avr-Proteins induziert die Auflösung der Interaktion zwischen NBS- und LRR-Domäne. Eine anschließende ATP-Statusänderung an der NBS-Domäne geht einher mit einer zweiten Konformationsänderung im Protein, die zur Auflösung der Interaktion zwischen NBS-Domäne und N-Terminus führt. Das resultierende aktive R-Protein induziert die HR. Dieses Modell der R-Protein-Regulation wird auch als Schaltermodell bezeichnet (Rathjen und Moffett, 2003; Takken *et al.*, 2006).

Für die Regulation der NBS-LRR-Aktivität sind jedoch noch weitere pflanzliche Proteine von Bedeutung, so z.B. das Hitzeschockprotein Hsp90. Es wird angenommen, dass Hsp90 in Abwesenheit des Pathogeneffektors an das inaktive, erkenntnis-kompetente R-Protein bindet und es stabilisiert. Die funktionale Abhängigkeit von Hsp90 sowie der Nachweis direkter Interaktionen zwischen R-Proteinen und dem Hitzeschockprotein weisen in der Tat darauf hin, dass NBS-LRR-Proteine „Klienten“ des Chaperons Hsp90 sind (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003b; Takahashi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Schornack, 2006) (Abbildung 6). Reduzierte Hsp90-Mengen führten zu reduzierten R-Proteinmengen und zum Verlust der HR (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003b; Schornack, 2006). Eine reduzierte HR konnte für Bs4, N und Bs2 jedoch auch nach Überexpression von Hsp90 beobachtet werden (Schornack, 2006). Vermutlich verhindert die Überexpression des Hitzeschockproteins die Transition des R-Proteins nach Avr-Perzeption vom erkenntnis-kompetenten Zustand (Abbildung 6). Die Signalweiterleitung würde dadurch verzögert oder blockiert und die HR reduziert sein (Schornack, 2006). Als Ko-Chaperone von Hsp90 werden RAR1 (*required for MLA12 resistance 1*) und SGT1 (*suppressor of G-two allele of SKP1*) diskutiert (Shirasu, 2008). Die beiden Proteine interagieren miteinander und mit Hsp90. RAR1 und SGT1 sind für die Funktion zahlreicher R-Proteine essentiell und interagieren mit Komponenten des COP9 (*constitutive photomorphogenic*)-Signalosoms (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002c; Peart *et al.*, 2002; Serino und Deng, 2003; Azevedo

et al., 2006; Seo *et al.*, 2008). SGT1 bindet zudem auch an Komponenten des SCF (*SKP1-Cullin-F-Box-Protein*)-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002c). COP9 und SCF sind in den regulierten Ubiquitin- bzw. Proteasom-vermittelten Proteinabbau in der Zelle involviert. Potentielle Targetproteine könnten die R-Proteine selbst und/oder negativ-regulatorische Proteine der Immunabwehr sein (Shen und Schulze-Lefert, 2007). In der Tat konnte für Bs4 und RPM1 eine Elicitor-induzierte Reduktion der R-Proteinmenge beobachtet werden (Boyes *et al.*, 1998; Schornack, 2006) (Abbildung 6). Eine Blockierung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus durch Überexpression einer Ubiquitinmutante (ubR48, Schlögelhofer *et al.*, 2006) bzw. durch chemische Inhibierung mit Geldanamycin weist jedoch daraufhin, dass die Bs4- und RPM1-Mengen selbst nicht ubiquitinabhängig degradiert werden. In beiden Fällen konnte zwar eine reduzierte HR, nicht jedoch eine Akkumulation der R-Proteine festgestellt werden (Holt *et al.*, 2005; Schornack, 2006). Zusammengefasst erfolgt die Regulation der R-Proteinfunktion offenbar durch ein komplexes Zusammenspiel stabilisierender und abbauender Prozesse.

In Abbildung 6 sind die bekannten Aspekte der Regulation der Bs4-Funktion in einem Arbeitsmodell dargestellt (Schornack, 2006). So sind Hsp90 und SGT1, nicht jedoch RAR1 für die Bs4-Funktion essentiell (Schornack *et al.*, 2004). Zudem ist die Bs4-Resistenz von einer weiteren Komponente, von *EDS1* (*enhanced disease susceptibility 1*), abhängig, welche für ein Lipase-ähnliches Protein kodiert (Falk *et al.*, 1999; Schornack *et al.*, 2004). EDS1 ist auch für die Funktion zahlreicher anderer TIR-NBS-LRR-Proteine essentiell (Aarts *et al.*, 1998; Glazebrook, 2001). Es ist bislang jedoch nicht bekannt, welche biochemische Funktion EDS1 im Rahmen der NBS-LRR-vermittelten Resistenz zukommt.

1.10 Die Serin/Threonin-Phosphatase 5 (PP5)

In einer Hefe-Dihybrid-Sichtung wurde als Interaktor des NBS-LRR-Proteins I-2 aus Tomate die Serin/Threonin-Phosphatase 5 (PP5) identifiziert (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Als besonderes strukturelles Merkmal besitzt PP5 neben der katalytischen Phosphatase-Domäne eine N-terminale *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne (Cohen, 1997; Chinkers, 2001) (Abbildung 16), die die Interaktion mit I-2 vermittelt. Über die TPR-Domäne interagiert PP5 auch mit dem Hitzeschockprotein Hsp90, das seinerseits an die LRR-Domäne von I-2 bindet (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Auch für das CC-NBS-LRR-Protein RPM1 aus *Arabidopsis* und für das TIR-NBS-LRR-Protein N aus Tabak konnte bereits eine

Interaktion mit Hsp90 und PP5 nachgewiesen werden (Hubert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Möglicherweise liegen NBS-LRR-Proteine generell in einem Komplex mit Hsp90 und PP5 in pflanzlichen Zellen vor. Welche Rolle PP5 jedoch in der NBS-LRR-Protein-vermittelten Resistenz spielt, ist bislang ungeklärt.

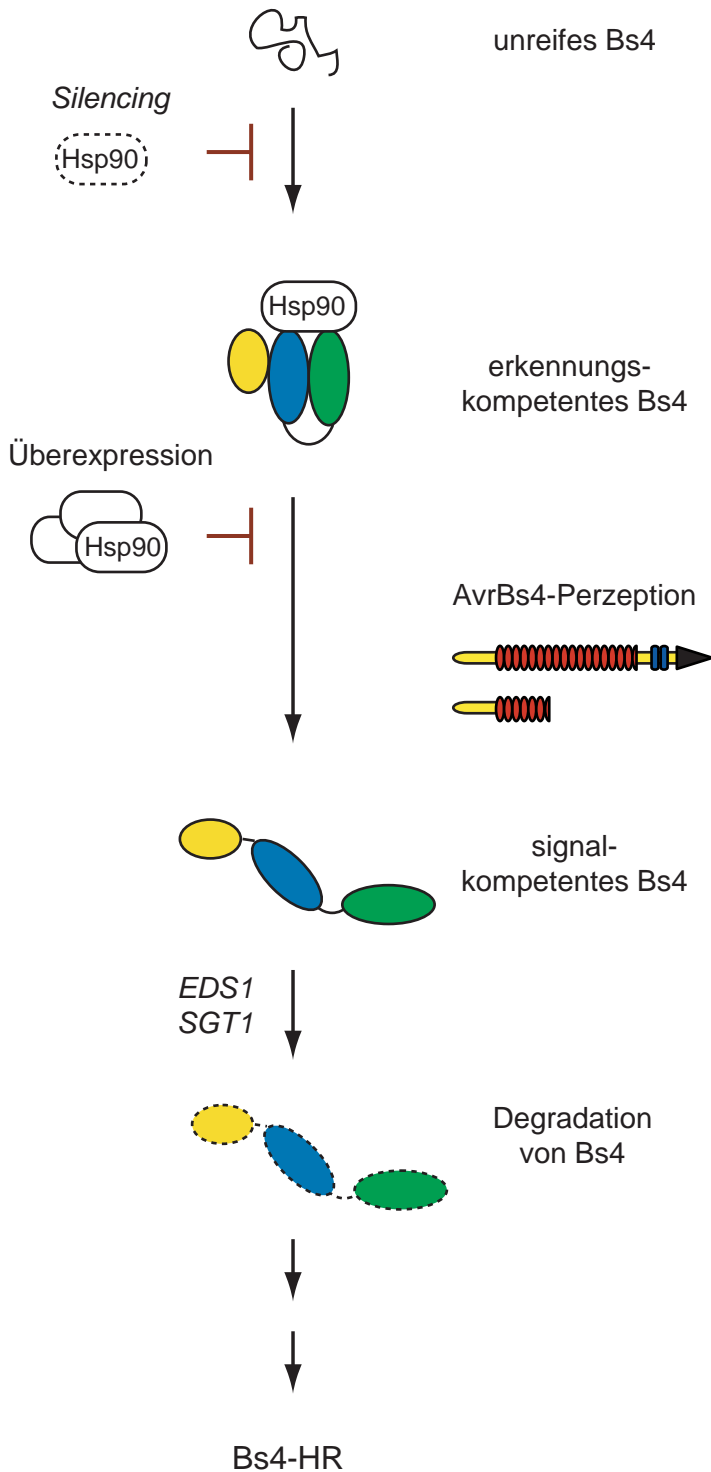


Abbildung 6: Arbeitsmodell zur Regulation von Bs4. Bs4 interagiert mit Hsp90 und wird durch das Chaperon im inaktiven, erkenntnis-kompetenten Zustand stabilisiert. Die Erkennung von AvrBs4 nach *Xcv*-Infektion führt zur Transition von Bs4 in den signalkompetenten Zustand. Die Bindung an Hsp90 sowie intramolekulare Domäneninteraktionen werden dabei aufgelöst, Bs4 wird degradiert und die *Bs4*-HR wird induziert. *Silencing* von Hsp90 führt zu einer reduzierten Bs4-Menge und zum Verlust der *Bs4*-HR (Schornack, 2006). Aber auch die Überexpression von Hsp90 resultiert in einer reduzierten HR. Vermutlich bleibt Bs4 auch in Anwesenheit von AvrBs4 an Hsp90 gebunden, wodurch die Transition in den signalkompetenten Zustand und damit die Degradation von Bs4 und die Induktion der HR blockiert oder verzögert wird. Dafür spricht, dass nach Hsp90-Überexpression Bs4 auch in Anwesenheit von AvrBs4 im Immunoblot noch nachweisbar ist (Schornack, 2006). Neben Hsp90 sind auch SGT1 und EDS1 für die *Bs4*-HR essentiell (Schornack *et al.*, 2004). Abbildung modifiziert nach Schornack (2006).

1.11 Zielstellungen dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass das TIR-NBS-LRR-Protein Bs4 aus Tomate, das die Erkennung des bakteriellen Effektors AvrBs4 vermittelt, in seiner Funktion abhängig von den Signalkomponenten SGT1 und EDS1 und von Hsp90 ist (siehe 1.9). Trotz intensiver Studien ist der Mechanismus der AvrBs4-Perzeption noch weitgehend ungeklärt. Es konnte bislang weder eine direkte Interaktion zwischen Bs4 und AvrBs4 gezeigt, noch mögliche *pathogenicity*- oder *decoy*-Targets, die eine indirekte Interaktion vermitteln, isoliert werden. Um neue Erkenntnisse hinsichtlich der AvrBs4-Erkennung durch Bs4 zu erlangen, sollten im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems bzw. mittels Tandemaffinitätsreinigung Interaktions- und Komplexpartnern von Bs4 und/oder AvrBs4 identifiziert werden. Isolierte Kandidaten sollten mittels Lokalisations- und Koimmunopräzipitations (KoIP)-Studien sowie in Überexpressionstudien und *Silencing*-Experimenten näher analysiert werden. In einem genetischen Ansatz sollten weitere, neue Komponenten der *Bs4*-Signalkaskade identifiziert werden. Zudem sollte die Serin/Threonin-Phosphatase 5 auf Interaktion mit Bs4 getestet und deren biologische Relevanz für die *Bs4*-vermittelte HR in Überexpressions- und *Silencing*-Experimenten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Im Rahmen der Arbeit wurden Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterialien folgender Firmen genutzt:

Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Applichem GmbH (Darmstadt), Applied Biosystems (Weiterstadt), BD Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), BioRad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf), BRAND GmbH (Wertheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Takara Bio Europe/Clontech, SAS (St-Germain-en-Laye, Frankreich), DIAGONAL GmbH & Co.KG (Münster), Difco (Augsburg), Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Greiner BIO-ONE GmbH (Frickenhausen), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Merck Biosciences GmbH (Bad Soden), metabion GmbH (Martinsried), New England Biolabs GmbH (Frankfurt), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Schleicher und Schüll Biosciences GmbH/Whatman (Dassel), SCHOTT DURAN (Mainz), Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Vivascience AG (Hannover), VWR International GmbH (Darmstadt)

2.2 Lösungen und Puffer

Häufig verwendete Lösungen und Puffer:

10 x PCR-Puffer:	0,5 M KCl, 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,3), 20 mM MgCl ₂ , 1 % (v/v) TritonX 100, 0,1 % (w/v) Gelatine
6 x Ladepuffer:	15 % Ficoll 400, Farbstoff: Orange G
1 x TAE	40 mM Tris, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3 Nährmedien für Bakterien

Für die Herstellung der Bakterienmedien wurden Produkte der Firmen BD Becton Dickinson GmbH und Carl Roth GmbH verwendet.

LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5
NYG-Medium:	0,5 % (w/v) Bacto Pepton, 0,3 % (w/v) Hefeextrakt, 0,2 % Glycerin
YEB-Medium:	0,5 % (w/v) Bacto Beef-Extrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Bacto Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 0,2 % (v/v) 1 M Mg ₂ SO ₄ ; pH 7,2

Für die Herstellung von Platten wurden den Medien jeweils 1,5% (w/v) Bacto Agar zugegeben. Die Sterilisation erfolgte bei 121 °C, 1,1 x 10⁵ Pa für 20 min (Autoklavieren). Zur selektiven Kultivierung von Bakterien wurden den Medien die jeweiligen, benötigten Antibiotika zugesetzt (siehe Tabelle 1).

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitsverdünnung
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml (in H ₂ O)	1/1000 für Platten 1/2000 für Flüssigkultur
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml (in EtOH)	1/1000
Gentamycin (Gent)	7,5 mg/ml (in H ₂ O)	1/500
Hygromycin (Hyg)	50-150 mg/ml (in H ₂ O)	1/1000
Kanamycin (Kan)	5 mg/ml (in H ₂ O)	1/200 (<i>E. coli</i>) 1/50 (<i>A. tumefaciens</i>)
Rifampicin (Rif)	100 mg/ml (in DMF)	1/1000
Spectinomycin (Spec)	10 mg/ml (in H ₂ O)	1/100

2.4 Bakterienstämme

In Tabelle 2 sind die für Inokulationsexperimente (siehe 2.6, 2.7 und 2.27) verwendeten *Xcv*- und *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme aufgeführt. Für Klonierungen, für die Erstellung von Binärvektorkonstrukten (siehe 2.18-2.19, Anhang TAB1) sowie für Konjugationen (siehe 2.27.2) wurden die im Folgenden angegebenen *Escherichia coli*-Stämme genutzt.

Bakterienstamm	Resistenz	Beschreibung	Referenz
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>)			
85-10	Rif	Paprikarasse 2, enthält <i>avrBs1</i> und <i>avrBs2</i>	Minsavage <i>et al.</i> , 1990; Thieme <i>et al.</i> , 2005
85-10 pDS200F	Rif, Spec	Paprikarasse 2, enthält <i>avrBs1</i> und <i>avrBs2</i> ; <i>avrBs4</i> kloniert in pDSK602	Schorneck <i>et al.</i> , 2004
82-8	Rif	Paprikarasse 1, enthält <i>avrBs3</i> und <i>avrBs4</i>	Minsavage <i>et al.</i> , 1990

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme			
Bakterienstamm	Resistenz	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)			
One Shot TOP10		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>ccdB</i> Survival (<i>One Shot ccdB</i> <i>Survival T1 Phage</i> <i>resistant cells</i>)		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>tonA::Ptrc-ccdA</i>	Invitrogen
DH10B-T1(<i>Phage</i> <i>resistant cells</i>)		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> <i>tonA</i>	Invitrogen
HB101 (pRK2013)	Kan	<i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>rpsL20</i> (Str ^R), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> ; pRK2013	Boyer und Roulland- Dussoix, 1969; Figurski und Helinski, 1979
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>)			
GV3101 (pMP90)	Rif, Gent	Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58ΔT-DNA)	van Larebeke <i>et al.</i> , 1974; Koncz und Schell, 1986

2.5 Verwendete Vektoren und Plasmide

Im Anhang sind alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide aufgelistet (Tabelle TAB1).

2.6 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Inokulationsmedium: 10 mM MgCl₂, 5 mM MES (pH 5,3),

150 μM Acetosyringon (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenon)

Für die transiente Expression ausgewählter Gene in *N. benthamiana* wurden die jeweiligen Binärvektorkonstrukte (siehe Anhang TAB1) zunächst in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 (pMP90) (Tabelle 2) transformiert (siehe 2.21.1) und in selektivem Medium angezogen. Je 4 ml einer Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (1 min, 12000 rcf) und das Bakterienpellet in 250 μl Inokulationsmedium resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurde auf eine optische Dichte von 0,8 bei 600 nm eingestellt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann über das stumpfe Ende einer Einwegspritze in die Blattunterseite von vier bis acht

Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Für Lokalisations- und KoIP-Experimente wurde zur Suppression posttranskriptionellem Gen-Silencings (PTGS) ein T-DNA-Konstrukt kodierend für den viralen *Silencing*-Inhibitor p19 stets kotransformiert (Voinnet *et al.*, 1998; Johansen und Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2003). Bei Kotransformation mehrerer T-DNA-Konstrukte (z.B. für KoIP und BiFC) wurden die entsprechenden Bakteriensuspensionen vor Inokulation in gleichen Anteilen gemischt.

Nach Inokulation verblieben die Pflanzen in Gewächshausatmosphäre (Tag: 25 °C, 60 % relative Luftfeuchte; Nacht: 19 °C, 40 % relative Luftfeuchte; Lichtperiode von 5.00 bis 21.00 Uhr). Drei bzw. vier Tage nach Inokulation wurde Blattmaterial für mikroskopische oder proteinbiochemische Analysen mit Hilfe eines Korkbohrers (Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm) geerntet.

2.7 Stabile Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Murashige and Skoog (MS)-Medium: 0,43 % (w/v) MS-Salze (Duchefa), 2 % (w/v) Saccharose, pH 5,8 (1N NaOH)

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 500 µl/l Vitaminlösung (Duchefa) zugegeben.

MSII-Medium:

MS-Medium

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 500 µl/l Vitaminlösung (Duchefa), 1 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP), 0,1 mg/l Naphthaline Acetic Acid (NAA) und 250 mg/l Claforan (Cefotaxim) zugegeben.

MSIII-Medium:

MS-Medium, 250 mg/l Claforan (Cefotaxim)

Für Platten wurde den Medien 0,8 % (w/v) Pflanzenagar der Firma Duchefa zugesetzt.

Für die stabile Transformation von *N. benthamiana*-Planzen wurde zunächst Saatgut mit Hypochloridlösung (1,5 ml Hypochlorid, 3,3 ml H₂O, 4,8 µl Tween 20) sterilisiert und auf MS-Platten ausgebracht. Nach dem Auskeimen der Pflanzen wurden diese in Weck[®]-Gläser mit MS-Medium umgesetzt. Vier bis sechs Wochen später wurde Blattmaterial dieser Pflanzen für die stabile, *Agrobacterium*-vermittelte Transformation genutzt.

Der *Agrobacterium*-Stamm GV3101 (pMP90) (Tabelle 2) mit dem Plasmid pYL436_*Bs4* (*35S:Bs4::TAPa*, Anhang TAB1) wurde über Nacht bei 30 °C in 50 ml Flüssigmedium (YEB Rif, Spec) angezogen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3320 rcf pelletiert, in Inokulationsmedium (siehe 2.6) resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,8 eingestellt. Blätter der steril angezogenen Tabakpflanzen wurden mit einem Skalpell in etwa 1 cm x 1 cm große Stücke geschnitten und in etwa 100 ml der Bakteriensuspension für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke auf Whatmanpapier aufgelegt und in einer Petrischale im Dunkeln bei 28 °C für zwei Tage inkubiert. Als Selektionsmarker für transgene Pflanzen trägt der T-DNA-Vektor pYL436 eine Gentamycin-Resistenzkassette. So wurden die Blattstücken nach dem Waschen in destilliertem Wasser (mit Claforan 250 µg/ml) auf MSII-Medium mit Gentamycin (100 µg/ml) zur Induktion der Kallibildung umgesetzt. Die ersten Kalli wurden etwa nach vier Wochen erhalten und zur Wurzelbildung auf MSIII-Medium mit Gentamycin (100 µg/ml) in Weck[®]-Gläser transferiert. Die *Bs4::TAPa*-transgenen Pflanzen wurden nach weiteren vier Wochen in Jiffy-Torfquelltopfe und zwei Wochen später in Erde umgesetzt.

2.8 Stabile Transformation einer BY-2-Zellkultur

Die stabile Transformation einer *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (BY-2)-Suspensionskultur (Nagata *et al.*, 2004) mit dem Plasmid pYL436_*avrBs4Δs227R6* (*35S:avrBs4Δs227R6::TAPa*, Anhang TAB1) erfolgte *Agrobacterium*-vermittelt. Die Transformation selbst wurde von Dr. Flora Schuster in Aachen (AG Dr. Thomas Rademacher, RWTH Aachen/IME Fraunhofer-Institut) durchgeführt.

2.9 Erhaltung und Kultivierung der BY-2-Zellkultur

BY-2-Medium: 0,44 % (w/v) MS-Salze (Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose,
0,2 % (v/v) KH_2PO_4 (100 mg/ml), 0,1 % (v/v) 2,4-D
(Dichlorphenoxyessigsäure, 20 mg/100 ml), 0,01 % (v/v) Thiamin
(6 mg/ml); pH 5,8
Für Platten wurde dem Medium 2 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa)
zugesezt.

Zur Erhaltung der *avrBs4Δs227R6::TAPa*-transgenen Zellkulturlinie wurden wöchentlich 2-5% (v/v) der Kultur in 100 ml frisches BY-2-Medium (mit Gentamycin 100 µg/ml) überimpft. Die Zellkultur wurde im Dunkeln bei 24 °C und 120 rpm in einem INFORS-Schüttler inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollte die Verdopplungszeit der Zellen bei 12-14 h liegen. Neben den Flüssigkulturen wurde die transgene Linie auch auf Agarplatten erhalten. Hier erfolgte die Umsetzung auf frische Platten einmal monatlich.

2.10 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Resuspensionspuffer (P1):	25 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 3 µl RNase (10 mg/ml) auf 100 µl Puffer
Lysepuffer (P2):	0,2 M NaOH 1 % SDS
Neutralisationspuffer (P3):	3 M NaAc, pH 5,0

Die Isolierung von *high copy*-Plasmiden aus *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Die Bakterien wurden über Nacht in selektivem Medium angezogen. 1,5 ml der Kultur wurde abzentrifugiert (1 min, 12000 rcf) und das Pellet in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2, Invertieren der Probe und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Anschließend wurde 200 µl Puffer P3 zugegeben, für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 16100 rcf 10 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus dem Überstand durch Zugabe von 96% Ethanol gefällt. Die DNA wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl bidest. H₂O resuspendiert.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden zudem Kits der Firmen Amersham Bioscience Europe GmbH (GFXTM *Micro Plasmid Prep*-Kit) und metabion GmbH (*mi-Plasmid Mini Prep*-Kit) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.10.2 Isolierung von RNA aus Tomate und *N. benthamiana*

Für die Isolierung von RNA wurden zwei bzw. vier Blattscheiben (Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm) von *N. benthamiana*- bzw. Tomatenpflanzen in 2 ml Reaktionsgefäße

(Typ *Safe-lock*; Eppendorf) geerntet und in Flüssigstickstoff überführt. Das Blattmaterial wurde fein gemörsert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini-Kits* der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll. DNA-Kontaminationen wurden durch eine DNase-Behandlung entfernt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte am NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) über die Messung der Absorption von UV-Licht durch die Nukleinsäurelösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm. Dabei entspricht ein Extinktionswert von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration (doppelsträngige DNA) von 50 µg/ml und einer Konzentration von 40 µg/ml bei RNA oder einzelsträngiger DNA. Jeweils 1-2 µl Nukleinsäurelösung wurden für die Messungen unverdünnt verwendet. Die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen wurden in ng/µl ausgegeben.

2.12 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Für die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA wurden Enzyme und Puffer der Firmen Fermentas GmbH und New England Biolabs GmbH verwendet. In einem Standardansatz (20 µl) wurden 150 ng bis 400 ng Plasmid-DNA mit 0,5 µl Enzym (10-30 Units/µl) in 1 x Puffer bei 37 °C für 1-2 h inkubiert. Zur Analyse wurden die Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.13).

2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1 % genutzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE (siehe 2.2) verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden den Gelen 3 µl einer Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) pro 100 ml zugesetzt. Zur Bestimmung der Größe von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten wurden als Längenstandards der 100 bp- oder der 1 kb-Marker der Firma Fermentas GmbH eingesetzt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage der Firma AlphaInnotech (AlphaImager[®], Biozym Scientific GmbH).

2.14 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, Saiki *et al.*, 1988) können Nukleinsäureabschnitte selektiv vervielfältigt werden. Ausgehend von chemisch hergestellten Oligonukleotiden synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase einen neuen DNA-Doppelstrang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Die wesentlichen Schritte der PCR sind: Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelsträngige Matrize (*Annealing*) und Synthese des neuen DNA-Doppelstrangs (*Elongation*).

In vorliegender Arbeit wurde im Allgemeinen die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* für die Amplifikationen von DNA verwendet. Allerdings besitzt diese Polymerase keine *proof reading*-Funktion. Um möglichst fehlerfreien PCR-Produkte zu erhalten, wurde die *Phusion*TM *High-Fidelity* DNA-Polymerase der Firma Finnzymes/NEB (mit *proof reading*-Funktion) eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit beheizbarem Deckel (PTC-225 *Peltier Thermal Cycler* bzw. *FlexCycler*) der Firmen MJ Research bzw. analytik jena durchgeführt.

Standard-PCR-Bedingungen:

Standardansatz (20 µl):	10-250 ng DNA
	1x PCR-Puffer
	200 µM dNTPs
	je 30 ng Oligonukleotide
	2 U <i>Taq</i> -Polymerase
	ad 20 µl bidest. H ₂ O

PCR-Programm:

Denaturierung	95 °C 2 min	1 x
Denaturierung	95 °C 30 sec	
<i>Annealing</i>	50-70 °C 20 sec	30-35 x
Elongation	72 °C 30 sec – 1,5 min	
Elongation	72 °C 2 min	1 x

Für Kolonie-PCRs wurde eine kleine Menge an Bakterienkolonie direkt in den 20 µl PCR-Ansatz eingerührt. Der erste Denaturierungsschritt wurde auf 5 min verlängert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma metabion GmbH hergestellt. Die Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet (Tabelle TAB2).

2.15 cDNA-Synthese und RT-PCR

Je 1 µg Gesamt-RNA, gewonnen aus Probenmaterial von Tomate (je 2 x 4 Blattscheiben, Korkbohrer 4, zwei verschiedene Pflanzen) und *N. benthamiana* (je 2 x 2 Blattscheiben, Korkbohrer 4, zwei verschiedene Pflanzen) (siehe 2.10.2), wurden für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurde der *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis*-Kit der Firma Fermentas GmbH nach Herstellerangaben verwendet. Die Amplifikation kodierender Sequenzen (CDS, *coding sequences*) bzw. die RT (*reverse transcribed*)-PCR-Analysen erfolgten anschließend mittels genspezifischer Oligonukleotide (siehe Anhang TAB2). Für die RT-PCR-Analysen wurden für jede Oligonukleotidkombination verschiedene Zyklenzahlen getestet.

2.16 RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Für die Isolierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden wurde das BD SMARTTM (*switching mechanism at 5' end of RNA transcript*)-RACE Kit von Takara Bio Europe/Clontech nach Herstellerprotokoll verwendet. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde für die 5'- und 3'-cDNA-Synthese eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA-Enden erfolgte mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide (siehe Anhang TAB2) in Kombination mit Adaptor-Oligonukleotiden, die spezifisch an den am 5'- bzw. 3'-cDNA-Ende fusionierten Adaptor binden.

2.17 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und von klonierten DNA-Fragmenten erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierreaktionen wurden der ABI PRISM[®] *BigDye[®] Terminator v1.1*-Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Amplifikationen wurden in einem PCR-Thermoblock nach den unten aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die Auftrennung und Auswertung der markierten DNA-Fragmente erfolgte über einen arbeitsgruppeninternen Service mit dem 3130 *Genetic Analyzer*-Sequenzierautomat (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Sequencher 4.6*-Software.

Sequenzier-Programm:

Denaturierung	96 °C 10 sec	
Annealing	50 °C 20 sec	30x
Elongation	60 °C 4 min	

2.18 Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten

2.18.1 Klonierung von PCR-Produkten in pENTR/D-TOPO[®]

Zur Erstellung sogenannter *Entry*-Plasmide wurden PCR-Fragmente, die mit der *Phusion*[™] *High-Fidelity* DNA-Polymerase (siehe 2.14) amplifiziert wurden, in den pENTR/D-TOPO[®]-Vektor der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll ligiert. Die für die jeweiligen Amplifikationen verwendeten *forward*-Oligonukleotide umfassten vier zusätzliche Nukleotide (5'-CACC- 3', siehe Anhang TAB2), um eine richtige Orientierung des PCR-Produktes (Insert) im *Entry*-Plasmid zu erreichen. Das Insert flankierende *attL*-Rekombinationsstellen ermöglichten eine schnelle, rekombinationsbasierte Klonierung des Inserts in GATEWAY-kompatible Expressionsvektoren (siehe 2.19).

2.18.2 Klonierung von Restriktionsfragmenten in Expressionsvektoren

Die Klonierung von cDNA-Fragmenten, kodierend für Bs4- bzw. die einzelnen Bs4-Domänen, in den Hefeexpressionsvektor pGBKT7 (siehe 2.26.4, Anhang TAB1) erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH). In einem Standardansatz (10 µl) wurden Restriktionsfragment und Plasmid-DNA im Verhältnis 3:1 gemischt, 1 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (5 Units) zugesetzt. Der Ligationsansatz wurde 1 h oder über Nacht bei RT inkubiert.

2.19 Klonierung mittels GATEWAY-Technologie

Zahlreiche Expressionsplasmide dieser Arbeit (siehe Anhang TAB1) wurden mit Hilfe der GATEWAY-Technologie (www.invitrogen.com; Hartley *et al.*, 2000; Katzen, 2007) erstellt. Die Klonierung erfolgt hierbei nicht über Restriktionsspaltung und Ligation, sondern über sequenzspezifische Rekombination über sogenannte *attachment (att)*-sites. Diese leiten sich aus der *attP*-Stelle (200 bp) des Bakteriophagen λ und der *attB*-Stelle (25 bp) im *E.coli*-

Genom ab. Durch homologe Rekombination zwischen *attP* und *attB* erfolgt die Integration des Phagen in das Bakteriengenom im natürlichen System. Dabei entstehen *attL*- (100 bp) und *attR*- (125 bp) Stellen. Die Rekombinationsstellen wurden gentechnisch modifiziert und beispielsweise in pENTR/D-TOPO[®] (*Entry*-Vektor mit *attL1* und *attL2*) bzw. in zahlreiche Expressionsvektoren (*attR1* und *attR2*) integriert (www.invitrogen.com; siehe Anhang TAB1). In einer sogenannten LR-Rekombination wird das DNA-Fragment (Insert) des *Entry*-Plasmids durch sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor transferiert und liegt in diesem flankiert von *attB*-Stellen (*attB1* und *attB2*) vor. Um die Selektion positiver Klone zu erleichtern, flankieren die *attR*-Stellen im Expressionsvektor (vor Rekombination) eine *cat*-(Chloramphenicol-Acetyltransferase)-*ccdB*-Kassette. Das *ccdB*-Genprodukt ist toxisch für die meisten *E.coli*-Stämme, da es die Funktion der bakteriellen Gyrase hemmt und damit die Replikation der Bakterien stört. Daher können („leere“) Expressionsvektoren nur in *ccdB Survival*-Zellen (siehe 2.4) erhalten werden. In der LR-Rekombination erfolgt der „Austausch“ der *cat-ccdB*-Kassette gegen das Insert des *Entry*-Plasmids. Nach Transformation des LR-Ansatzes in *ccdB*-„sensitive“ Zellen (z.B. TOP10-Zellen, siehe 2.4) wachsen ausschließlich die Bakterienklone, die das Expressionsplasmid (mit Insert) aufgenommen haben.

<u>LR-Rekombination:</u>	<i>Entry</i> -Vektor	100-200 ng
	Expressionsvektor	250-300 ng
	LR-Klonase II	0,5 µl
	1 x TE (pH 8,0)	ad 10 µl

Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bzw. über Nacht bei RT inkubiert. Je 2 µl wurden anschließend in elektrokompente oder 10 µl in chemisch kompetente TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.21).

2.20 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*- (TOP10) bzw. *A. tumefaciens* (GV3101 (pMP90))-Zellen wurde jeweils 1 L LB- bzw. YEB-Medium (mit Rif und Gent, siehe Tabelle 1) mit 50 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes beimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4-0,6 wurden die Kulturen bei 4 °C, für 20 min und 3220 rcf in einer Sorvall-Zentrifuge (Typ RC26 Plus) abzentrifugiert. Das

Bakterienpellet wurde dreimal mit eisgekühltem Wasser und einmal mit 80 ml 10 % Glycerin gewaschen (jeweils bei 4 °C, für 15 min und 3220 rcf). Die Bakterien wurden abschließend in etwa 5 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.21 Transformation von Bakterienzellen

2.21.1 Elektroporation von *E. coli* oder *A. tumefaciens*

Die Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente *E. coli*- (TOP10) oder *A. tumefaciens* (GV3101 (pMP90))-Zellen erfolgte in 1 mm Küvetten bei $U = 2500 \text{ V}$ und $R = 200 \Omega$ unter Verwendung eines Elektroporators (MicroPulser™) der Firma BioRad Laboratories GmbH. Die Bakterienzellen wurden anschließend in 250 µl LB- oder SOC-Medium (Invitrogen) aufgenommen und bei 37 °C (*E.coli*) bzw. 30 °C (*A. tumefaciens*) für 1 h inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf selektiven LB- bzw. YEB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bzw. für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.21.2 Chemische Transformation von *E. coli*

Bei der chemischen Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst 10 µl Ligationsansatz mit 50 µl Zellen vorsichtig gemischt, für 15 min auf Eis und anschließend für exakt 1 min bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde mit 250 µl LB- oder SOC-Medium (Invitrogen) versetzt. 1 h nach Inkubation bei 37 °C wurde der Transformationsansatz auf selektiven LB-Platten ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.22 Dauerhafte Lagerung von Bakterien

Bakterienstämme, *Entry*- und Expressionklone wurden, wenn nicht anders beschrieben, als DMSO (Dimethylsulfoxid)-Stammproben (7 % (v/v) DMSO) bei -80 °C aufbewahrt.

2.23 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation

KoIP-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin, 5 mM Dithiothreitol (DTT), *complete protease inhibitor cocktail* w/o EDTA (Roche Diagnostics GmbH) (1 Tablette auf 50 ml Puffer)

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte in vorliegender Arbeit u.a. mittels Koimmunopräzipitation. Dafür wurden die potentiellen Interaktionspartner als Fusionen an einen *3xHA*- bzw. *10xc-myc*-Epitop in *N. benthamiana* transient koexprimiert (siehe 2.6). Vier Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation der entsprechenden T-DNA-Konstrukte wurden je acht Blattscheiben aus dem Inokulationsbereich (Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm, etwa 41 mg; etwa 450 µg Gesamtprotein) in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Typ *Safe lock*, Eppendorf) geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Zugabe einer Spatelspitze PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) wurde das Blattmaterial zu einem feinen Pulver gemörsert und 1 ml KoIP-Puffer zugegeben. Nach Durchmischen der Probe wurde bei 4 °C, 15 min und 12000 rcf zentrifugiert. 800 µl des klaren Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Puffer sowie mit Nonidet-P40 in einer Endkonzentration von 0,15 % (v/v) versetzt. Nach Zugabe von 20 µl Protein G-Agarose (Roche Diagnostic GmbH) wurde die Probe für 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert (*pre clearing*). Nach kurzem Abzentrifugieren (4 °C, 3 min, 3000 rcf) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 30 µl Protein G-Agarose und 2 µl α -c-Myc-Antikörper (9E10, siehe 2.25) zugegeben, um die c-Myc-markierten Proteine zu präzipitieren. Bei physikalischer Assoziation sollten die HA-markierten Proteine mit den c-Myc-Fusionsproteinen kopräzipitieren. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Durch viermaliges Waschen wurden ungebundene Proteine entfernt. Die Elution der präzipitierten Proteine von der Protein G-Agarose erfolgt durch Zugabe von 50 µl 4 x Laemmli (siehe 2.25) und Vortexen. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE und Immunodetektion analysiert (siehe 2.25).

2.24 Isolierung von Proteinkomplexen mittels Tandemaffinitätsreinigung

Für die Isolierung von Proteinkomplexen mittels Tandemaffinitätsreinigung (*tandem affinity purification*, TAP, Rigaut *et al.*, 1999) wurden das Resistenzgen *Bs4* sowie zwei Deletionsderivate von *avrBs4* (*avrBs4Δs227R2* und *avrBs4Δs227R6*, siehe TAB1) in den GATEWAY-kompatiblen Binärvektor pYL436 (Rubio *et al.*, 2005) rekombiniert. Dieser enthält eine TAPa-Fusionskassette bestehend aus zwei Kopien des 35S-Promotors, für die konstitutive Expression von *Bs4* und *avrBs4 in planta* und dem TAPa-Eptiop (Rubio *et al.*, 2005; Abbildung 24). Die Reinigung der C-terminal TAPa-markierten Zielproteine aus Pflanzenextrakten sollte in zwei Schritten erfolgen (siehe Abbildung 24).

2.24.1 Nachweis der TAPa-markierten Proteine in pflanzlichen Proteinextrakten

Für den Expressionsnachweis der *Bs4*- und *AvrBs4*-TAPa-Fusionsproteine in Gesamtproteinextrakten von *N. benthamiana* wurden drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Transformation der entsprechenden T-DNA-Konstrukte je vier Blattscheiben (Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm) aus dem inokulierten Blattgewebe geerntet, in Flüssigstickstoff gefroren, gemörsert und mit 500 µl KoIP-Puffer (siehe 2.23) versetzt. Nach Zentrifugation (4 °C, 12000 rcf, 20 min) wurden je 20 µl Gesamtproteinextrakt mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung eines α-c-Myc-Antikörpers analysiert (siehe 2.25).

2.24.2 Nachweis von *AvrBs4Δs227R6::TAPa* in transgenen Zellkulturlinien

Für den Expressionsnachweis von *AvrBs4Δs227R6::TAPa* in Proteinextrakten transgener Zellkulturlinien wurde jeweils etwas Kallusmaterial von den Kulturplatten genommen und zwischen zwei Tüchern (Kimwipes) getrocknet. Das Kallusmaterial wurde anschließend in Flüssigstickstoff gefroren, zu einem feinen Pulver gemörsert und mit 50 µl 4 x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung eines α-c-Myc-Antikörpers analysiert (siehe 2.25).

2.24.3 Reinigungsprotokolle

Im Folgenden sind detailliert die einzelnen Protokolle zur Reinigung von AvrBs4 Δ s227R6::TAPa aus transient transformierten Blattmaterial oder aus transgenem Zellkulturmaterial beschrieben.

Protokoll 1:

Drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation von 35S:avrBs4 Δ s227R6::TAPa und 35S:p19 (Voinnet *et al.*, 2003) wurde Blattmaterial (acht Blattscheiben, Korkbohrer 4, Durchmesser 0,85 cm, etwa 41 mg; etwa 450 μ g Gesamtprotein) geerntet und in Flüssigstickstoff gefroren. Zur Aufarbeitung wurden die Proben mit einer Spatelspitze PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) versetzt und zu einem feinen Pulver verarbeitet. 1 ml Extraktionspuffer (KoIP-Puffer (siehe 2.23) ohne 5 mM DTT) wurde zugegeben, der Pflanzenextrakt gevortext und bei 4 °C und 12000 rcf für 20 min zentrifugiert. 800 μ l Gesamtproteinextrakt aus dem Überstand wurde mit Nonidet-P40 in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) und mit 35 μ l gewaschener IgG-Sepharose (*IgG Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare) für fünf Stunden bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden anschließend präzipitiert, der Überstand verworfen und die Matrix dreimal mit Elutionspuffer (KoIP-Puffer ohne *complete protease inhibitor cocktail*, mit 1 mM DTT und 0,1 % Nonidet P-40) gewaschen (4 °C, 3000 rcf, 3 min), um unspezifisch assoziierte Proteine zu entfernen. Die Elution des Fusionsproteins von der Matrix erfolgte in 1 ml Elutionspuffer durch Inkubation mit 2,5 μ l (16 Units) 3C-Protease (*PreScission Protease*, Amersham Biosciences) über Nacht (> 12 h) bei 4 °C. Nach Zentrifugation (4 °C, 3000 rcf, 3 min) wurde die IgG-Sepahrose noch einmal mit 1 ml Waschpuffer (KoIP-Puffer mit *complete protease inhibitor cocktail*, 1 mM DTT und 0,1 % Nonidet P-40) gewaschen und die beiden Überstände vereint. Eine Probe zur Immunoblotanalyse wurde entnommen. Die verbliebene Probe (etwa 1,9 ml) wurde über einen Vivaspin 15-Konzentrator (Sartorius AG, Göttingen) auf ein Volumen von etwa 300 μ l eingegrenzt. Proben des Gesamtproteinextraktes, der IgG-Sepharose-Beads und Proben aus dem Überstand nach Proteasebehandlung wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung eines α -c-Myc-Antikörpers analysiert (siehe 2.25).

Protokoll 2:

8 ml *avrBs4Δs227R6::TAPa*-transgener Zellkultursuspension wurden abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und unter Flüssigstickstoff zu einem feinen Pulver verarbeitet. 90 mg Zellpellet wurde mit 2 ml Extraktionspuffer (KoIP-Puffer, siehe 2.23) versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Der Gesamtproteingehalt wurde anschließend mittels Bradford-Test (siehe 2.25.1) bestimmt (~ 750 µg/2 ml). Dem Proteinextrakt wurde Nonidet P-40 in einer Endkonzentration von 0,15 % zugegeben und mit IgG-Sepharose (*IgG Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Elution TAPa-markierten AvrBs4-Proteins erfolgte nach dreimaligem Waschen der Sepharose in 2 ml Probenvolumen mit 3 µl 3C-Protease (*PreScission Protease*, Amersham Biosciences) bei 4 °C für zwei Tage. Der Überstand wurde anschließend mit 40 µl gewaschener Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose versetzt und für 7 h bei 4 °C inkubiert. Die Elution an Ni-NTA gebundener Proteine erfolgte mit 40 µl 4 x Laemmli-Puffer (siehe 2.25) bei 95 °C und 5 min. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung eines α -c-Myc-Antikörpers analysiert (siehe 2.25).

Wasch- und Elutionspuffer entsprechen in ihrer Zusammensetzung den jeweiligen, in Protokoll 1 beschriebenen Puffern.

Protokoll 3:

Rund 1,5 g gemörstertes Zellkulturmaterial der transgenen *avrBs4Δs227R6::TAPa*-Linie #4 wurden mit 20 ml Extraktionspuffer (KoIP-Puffer, siehe 2.23) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden Nonidet P-40 in einer Endkonzentration von 0,15 % und 200 µl IgG-Sepharose-Suspension zugegeben. Nach Inkubation (über Nacht, 4 °C) wurden die *Beads* viermal gewaschen. Die Elution TAPa-markierten AvrBs4-Proteins erfolgte in 20 ml Probenvolumen mit 10 µl 3C-Protease bei 4 °C über Nacht. Das Volumen des Eluats wurde anschließend mit Hilfe eines Amicon-Konzentrators (Amicon Ultra-15 MWCO 30000, Millipore GmbH, Schwalbach) um das 50-fache reduziert (auf 400 µl).

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 2.25) wurde das Gel für eine halbe Stunde in Coomassie G250-Lösung (0,05 % Coomassie G250, 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) inkubiert und über Nacht in H₂O entfärbt.

Wasch- und Elutionspuffer entsprechen in ihrer Zusammensetzung den jeweiligen, in Protokoll 1 beschriebenen Puffern.

2.25 Immunologischer Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE und Immunoblotanalyse)

Trenngel (10 ml, 10 %):	3,3 ml 30 % Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 100 µl 10 % (w/v) SDS, 100 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 4 µl TEMED
Sammelgel (3 ml):	0,5 ml 30 % Acrylamid, 380 µl 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 30 µl 10 % (w/v) SDS, 30 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 2 µl TEMED
4 x Laemmli-Puffer:	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau
1 x TANK-Puffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3, 0,1 % (w/v) SDS
1 x TBST:	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
Transfer-Puffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8,3, 20 % (v/v) Methanol
Blockierungspuffer:	5 % (w/v) Milchpulver in 1 x TBST
ECL-Substrat:	100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 215 nM p-Cumarsäure, 1,25 mM 3-Aminophthalhydrazid, 0,15 % (v/v) H ₂ O ₂ (30 %)

Für die Analyse rekombinanter Proteine wurden die jeweiligen Proteinproben zunächst für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10 % Gele) unter Verwendung von vertikalen Apparaturen für Mini-Gele (Mighty Small II, Amersham Biosciences) bei 100-140 V in 1 x TANK-Puffer. Als Molekulargewichtstandard wurde der *prestained protein ladder* von Fermentas GmbH genutzt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran[®], Schleicher und Schüll Biosciences GmbH) erfolgte im Tank-Blot-Verfahren (Hoefer TE22 Serie, Hoefer Scientific Instruments, USA) bei 4 °C für 1,5 h und 95 V. Die Membran wurde anschließend zur Absättigung freier Bindestellen für 30 min bei RT in Blockierungspuffer schüttelnd inkubiert. Der jeweilige Primärantikörper (Tabelle 3) wurde in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran dreimal mit 1 x TBST gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation dieser mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tabelle 3) für 2 h bei RT. Bei den verwendeten Sekundärantikörpern handelte es sich um Meerrettichperoxidase-Konjugate. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST wurde die Membran in 6 ml ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung für 1 min inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Filmen der Firma Eastman Kodak Company

(Biomax Light 1). Die Filme wurden abschließend mit Entwickler- und Fixierlösungen der Firma Sigma von Hand entwickelt.

Es wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen (in 1 x TBST) verwendet:

Primär-antikörper	Verdünnung	Hersteller	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Hersteller
α -c-Myc (clone 9E10)	1/5000	Roche Diagnostics	α -mouse	1/10000	GE Healthcare
α -HA (clone 3F10)	1/5000	Roche Diagnostics	α -rat	1/10000	Sigma Aldrich
α -GFP	1/2000	Invitrogen	α -rabbit	1/10000	GE Healthcare
α -Hsp90	1/2000	de la Fuente van Bentem <i>et al.</i> , 2005	α -rat	1/10000	Sigma Aldrich

2.25.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in pflanzlichen Gesamtproteinextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines Fertigreagens (Roti-Quant) der Firma Carl Roth GmbH. Als Standard zur Erstellung einer Eichgeraden diente BSA (Rinderserumalbumin).

2.26 Sichtung einer Tomaten-cDNA-Bibliothek mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems (*yeast two-hybrid*, Y2H)

Das Hefe-Dihybrid-System stellt einen molekularbiologischen Ansatz zur Identifizierung oder Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* dar. Das System wurde erstmals von Fields und Song (1989) beschrieben. In vorliegender Arbeit wurde das GAL4-basierte System unter Nutzung der Vektoren und Reporterstämme der Firma Clontech (MATCHMAKER *Library Construction and Screening*-Kit, Anhang TAB1) verwendet, um Interaktionspartner des Resistenzproteins Bs4 zu isolieren (siehe 3.1). Bs4 bzw. die einzelnen Bs4-Domänen wurden, fusioniert an die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (GAL4-BD, Köderproteine), mit Proteinen, kodiert von einer Tomaten-cDNA-Bibliothek und fusioniert an die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD, Beuteproteine), in Hefe koexprimiert. Bei Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein kommen GAL4-BD und

GAL4-AD in räumliche Nähe, was in der transkriptionellen Aktivierung der GAL4-regulierten Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* resultiert (Abbildung 7).



Abbildung 7: GAL4-Hefe-Dihybrid-System. Köder (K)- und Beuteprotein (B) fusioniert an die DNA-Binde (BD)- bzw. Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors GAL4 werden in Hefe koexprimiert. Bei Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein kommen GAL4-BD und GAL4-AD in räumliche Nähe, wodurch die Transkription der GAL4-regulierten Reporter *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* aktiviert wird. Die entsprechenden Hefen wachsen auf Medium ohne Zusatz von Adenin und Histidin (Y-SD-HAd). Die Kolonien sind bei Zusatz von X- α -Gal durch die enzymatische Aktivität der von *MEL1* kodierten α -Galactosidase (Melibiase) blau gefärbt. UAS: *upstream activating sequences*.

2.26.1 Medien und Lösungen für die Kultivierung und Selektion von Hefen

YPDA (für die Anzucht):	2 % (w/v) Bacto Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glucose, 0,1 % (w/v) Adenin, pH 5,8
Y-SD (für die Selektion):	0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base (w/o aa), 2 % (w/v) Glucose, 10 % (v/v)
10 x Aminosäurelösung:	10 x Aminosäurelösung, pH 5,8
	L-Arginin 200 mg/l, L-Isoleucin 300 mg/l, L-Lysin 300 mg/l, L-Methionin 200 mg/l, L-Phenylalanin 500 mg/l, Uracil 200 mg/l, L-Threonin 2000 mg/l, L-Tyrosin 300 mg/l, L-Valin 1500 mg/l
100 x Adenin (Ad)	5000 mg/l
100 x Histidin (H)	2400 mg/l
100 x Leucin (L)	7200 mg/l
100 x Tryptophan (W)	4800 mg/l

Für Platten wurde jeweils 2 % (w/v) Bacto Agar zugegeben. Medien und Aminosäurelösungen wurden in einem Schnellkochtopf für 20 min autoklaviert. Für die selektive Kultivierung von Hefezellen wurden dem Y-SD Medium nach dem Autoklavieren

10 % (v/v) der 10 x Aminosäurelösung und gegebenenfalls jeweils 1 % (v/v) der 100 x Aminosäurestammlösungen zugesetzt. Zur Analyse der transkriptionellen Aktivierung des Reporters *MEL1* wurde den Platten X- α -Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-Galactopyranosid; Glycosynth, UK; Stammlösung 20 mg/ml in DMF) in einer Endkonzentration von 40 mg/l zugegeben.

2.26.2 Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Selektionsmarker	Reportergene	Referenz
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	<i>lacZ</i> , <i>MEL1</i>	Clontech
AH 109	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	<i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , <i>lacZ</i> , <i>MEL1</i>	Clontech

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme AH109 des Paarungstyps a (*MATa*) und Y187 des Paarungstyps α (*MAT α*) verwendet (Tabelle 4). Beide weisen eine Deletion in den Endogenen *GAL4* und *GAL80* auf. Mutationen in Genen, die für Enzyme der Biosynthese der Aminosäuren Tryptophan und Leucin kodieren, ermöglichten eine Selektion von Hefeklonen, die mit dem Köder- (pGBKT7, *TRP1*; Anhang TAB1) und/oder Beuteplasmid (pGADT7-Rec, *LEU2*; Anhang TAB1) transformiert wurden (siehe 2.26.3). Tabelle 4 gibt zudem eine Übersicht über die Reportergene der beiden Hefestämme.

2.26.3 Transformation von Hefezellen

Die Transformation der Hefestämme AH109 und Y187 mit den Köder- und Beuteplasmiden erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Gietz und Woods (2002) (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html>; 30.01.2008). Pro Reaktionsansatz wurden 2 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (30 sec, 12000 rcf). Das Pellet wurde anschließend mit 240 μ l 50 % (v/v) Polyethylenglycol (PEG, MW 3350), 36 μ l 1 M Lithiumacetat, 50 μ l 2 mg/ml denaturierter Heringssperma-DNA (Carl Roth GmbH) und 10-

20 µl Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 1 h bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abzentrifugieren (30 sec, 12000 rcf) wurde das Pellet in 100 µl bidest. H₂O resuspendiert und auf selektivem Medium ausplattiert. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.26.4 Köder- und Beutekonstrukte

Köderkonstrukte: Ausgehend von einem fehlerfreien, vollständigen *Bs4*-cDNA-Klon wurden cDNA-Fragmente kodierend für die *Bs4*-Domänen (TIR, NBS und LRR) unter Verwendung der Oligonukleotide Y2H-TIR-Fwd, Y2H-NBS-Fwd bzw. Y2H-LRR-Fwd in Kombination mit den Oligonukleotiden Y2H-TIR-Rev, Y2H-NBS-Rev bzw. Y2H-LRR-Rev (siehe Anhang TAB2) amplifiziert. Die *MunI/SalI*-flankierten *Bs4*-cDNA-Fragmente wurden anschließend in den *EcoRI/SalI*-gespaltenen Vektor pGBKT7 kloniert und die resultierenden Konstrukte (siehe Anhang TAB1) in Hefe transformiert. In Hefe erfolgte die Expression der Köderkonstrukte unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors. Eine N-terminale Fusion des Köderproteins an ein c-Myc-Epitop erlaubte die Analyse der Proteinexpression (siehe 2.26.5).

Beutekonstrukte: In vorangegangenen Arbeiten wurde eine uninduzierte, normalisierte Tomaten-cDNA-Bibliothek im Vektor pDADT7-Rec erstellt (S. Masiero, H. Sommer, D. Gürlebeck und U. Bonas, MPIZ Köln und MLU Halle; Gürlebeck, 2007). Hierfür wurde aus Blattmaterial von *Solanum lycopersicum* Kultivar Moneymaker Gesamt-RNA isoliert. Für die cDNA-Synthese wurden zufällige (*random*) Oligonukleotide verwendet. Die durchschnittliche cDNA-Fragmentgröße lag bei 1-1,5 kb (Gürlebeck, 2007). Während der cDNA-Synthese wurden Adaptoren an die 5'- und 3'- Enden der cDNA-Fragmente angefügt, die eine *in vivo* Rekombination dieser in den Vektor pGADT7-Rec in Hefe ermöglichten (MATCHMAKER *Library Construction and Screening*-Kit, Clontech; Gürlebeck, 2007). In Hefe erfolgte die Expression der Beutekonstrukte unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors. Die verwendete Bibliothek enthielt etwa $1,5 \times 10^7$ Hefeklone/ml.

2.26.5 Nachweis der Köderproteine

Für den Expressionsnachweis der *Bs4*-Köderproteine wurden je 4 ml Hefekultur ($OD_{600\text{ nm}} \sim 0,8$) abzentrifugiert und das Zellpellet in 50 µl 4 x Laemmli-Puffer (siehe 2.25)

resuspendiert (Gesamtproteinextrakt, GE). Je 20 μ l Gesamtproteinextrakt wurde anschließend mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α -c-Myc-Antikörpern analysiert (siehe 2.25).

2.26.6 Sichtung der Hefe-Bibliothek

Je 100 ml einer Hefekultur (Stamm Y187, *MAT α*), transformiert mit dem *Bs4-*, *Bs4-TIR*, *Bs4-NBS-* bzw. mit dem *Bs4-LRR*-Köderkonstrukt (siehe 2.26.4), wurden abzentrifugiert (10 min, 3220 rcf), das Pellet in 50 ml 2 x YPDA resuspendiert und mit einem Aliquot der Beutebibliothek (Stamm AH109, *MAT α* , 1 ml) versetzt. Die Ansätze wurden zur Paarung der haploiden Hefezellen in 2 L Erlenmeyerkolben überführt und bei 30 °C unter leichtem Schwenken (50 rpm; INFORS-Schüttler HT) für 22 -24 h inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen pelletiert (210 rcf, 10 min) und in 20 ml 0,5 x YPDA aufgenommen. Je 100 μ l einer Verdünnungsreihe dieser Suspension (10^{-3} bis 10^{-6}) wurden auf selektive Platten (Y-SD –WL) ausplattiert, um die Zahl der erhaltenen Diploiden im jeweiligen Paarungsansatz zu bestimmen. 20 x je 1 ml der Paarungsansätze wurde auf selektive Platten ohne Zusatz von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin (Y-SD -WLHAd) verteilt. Die Platten wurden bis zu sechs Tage bei 30 °C inkubiert. Die in diesem Zeitraum gewachsenen Hefekolonien wurden auf Y-SD –WLHAd-Platten, die zusätzlich X- α -Gal enthielten (siehe 2.26.1; Abbildung 7), übergepickt.

2.26.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

S-Puffer: 10 mM K_2HPO_4 (pH 7,2), 10 mM EDTA,

50 mM β -Mercaptoethanol, 50 μ g/ml Zymolase

Lysis-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM EDTA, 2,5 % SDS

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen wurden jeweils 2 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (30 sec, 12000 rcf), das Pellet in 0,5 ml S-Puffer resuspendiert und der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l Lysis-Puffer erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 65 °C. Zur Fällung der Proteine wurde 166 μ l 3 M Kaliumacetat zugegeben, gemischt und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei RT und 16100 rcf zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen 96 % EtOH gefällt (10 min, Eis). Das nach Zentrifugation (10 min, 16100 rcf) erhaltene Pellet wurde einmal mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl bidest. H₂O gelöst.

2.26.8 Gerichtete Interaktionsstudien

Für gerichtete Interaktionsstudien (siehe 3.1.4 und 3.1.6) erfolgte eine Paarung der Hefestämme AH109 und Y187, die die jeweiligen Köder- (*Bs4*-, *Bs4*-Domänen-, *Lam C*-, *avrBs3*- oder *avrBs4*-Konstrukte in pGBKT7, Anhang TAB1) bzw. Beuteplasmide (Bibliotheksfragmente in pGADT7-Rec) enthielten, im kleinen Maßstab. Die Hefezellen wurden direkt von Platte in 2 x YPDA Medium eingequirlt. Je 20 µl beider Hefestämme wurden in 500 µl 2 x YPDA, in einer Gewebekulturplatte (24 well; Greiner BIO-ONE GmbH) für mindestens 6 h bei 30 °C langsam schüttelnd inkubiert (50 rpm; INFORS-Schüttler HT). 10-50 µl der Paarungsansätze wurden zur Selektion diploider Hefezellen auf Y-SD -WL ausplattiert. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Analyse der Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein wurden die diploiden Hefezellen auf selektives Medium übergestrichen (Y-SD -WLHAd/X -α -Gal).

2.27 Sichtung einer Tomaten-cDNA-Überexpressionsbibliothek

Zur Identifizierung von Signalkomponenten der *Bs4*-vermittelten HR wurden zusammen mit dem Resistenzgen *Bs4* und dem Avirulenzgen *avrBs4* cDNA-Fragmente einer Bibliothek aus Tomate in *N. benthamiana* transient koexprimiert. Die Expression der cDNA-Fragmente erfolgte unter Kontrolle des starken, konstitutiven 35S-Promotors (Guilley *et al.*, 1982; Odell *et al.*, 1985), was zu einer Überexpression der korrespondierenden Proteine *in planta* führen sollte (siehe 3.4).

2.27.1 Eine Entry-cDNA-Bibliothek aus Tomate

Die verwendete cDNA-Überexpressionsbibliothek wurde durch die Firma Invitrogen erstellt. Als Ausgangsmaterial diente eine Entry-cDNA-Bibliothek aus Tomate (*Solanum lycopersicum* Kultivar Moneymaker), die durch GATEWAY-basierte Rekombination in den T-DNA-Vektor pK7FWG2 (Anhang TAB1, Karimi *et al.*, 2002) erhalten wurde.

Für die *Entry*-cDNA-Bibliothek wurden zunächst Tomatenpflanzen mit dem *Xanthomonas*-Stamm 82-8 (mit *avrBs3* und *avrBs4*, Tabelle 2; Minsavage *et al.*, 1990) vakuuminfiltriert ($OD_{600nm} \sim 0,1$). Sechs und zwölf Stunden nach Infiltration wurde Blattmaterial geerntet, in Flüssigstickstoff gefroren und zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das Pathogen-induzierte Material wurde zu gleichen Teilen vermengt. Anschließend wurde nicht induziertes, gemörsertes Blattmaterial im gleichen Anteil zugegeben. Aus diesem Material erstellte die Firma Invitrogen unter Nutzung der *CloneMiner*TM-Technologie (*EvoQuest*TM *Custom Laboratory Services Uncut cDNA Library Construction*; Invitrogen) eine cDNA-Bibliothek, die normalisiert und für Vollängenfragmente angereichert ist. Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte ausgehend von oligo-dT-Oligonukleotiden, die am 3'-Ende mit einer *attB2-site* (siehe 2.19) und Biotin fusioniert waren. An die 5'-Enden der synthetisierten cDNA-Fragmente wurden *attB1*-Adaptoren ligiert. Die *attB*-flankierten cDNA-Fragmente wurden anschließend durch BP-Rekombination gerichtet in den Vektor pDONR222TM.F1 (Anhang TAB1) transferiert und in *E. coli* DH10BTMT1-Zellen transformiert. Im *Entry*-Vektor liegen die Tomaten-cDNA-Fragmente flankiert von *attL-sites* vor. Die *Entry*-cDNA-Bibliothek enthält $1,8 \times 10^5$ cfu/ml. Mindestens 92 % der Klone enthalten ein Insert und die durchschnittliche Insertgröße liegt bei 1,65 kb (Angaben: *EvoQuest, Custom Laboratory*; UK; Invitrogen). Zur Überprüfung der Normalisierung der Bibliothek wurde die Abundanz von cDNA-Fragmenten kodierend für eine ATPase bestimmt. In nicht normalisierten cDNA-Bibliotheken tritt die ATPase als Insert in einem von 1000 Klonen (0,1 %) auf. In der vorliegenden normalisierten *Entry*-cDNA-Bibliothek wurde die ATPase als Insert in einem von $3,5 \times 10^4$ Klonen (0,0028 %) identifiziert. Dies entspricht einer Reduktion in der Abundanz um das 35-fache (Angaben: *EvoQuest, Custom Laboratory*; UK; Invitrogen).

2.27.2 Konjugation – triparentale Paarung

Die Transformation von Plasmiden der Überexpressionsbibliothek (pK7FWG2-Plasmide) in *A. tumefaciens* (Stamm GV3101 (pMP90)) erfolgte durch triparentale Paarung. Aliquots der *E. coli*-Klone der Bibliothek (Donorstamm) wurden auf LB-Platten mit Spectinomycin selektiert. Etwa 700 – 1000 Klone wurden in 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. Parallel wurden je 2 ml bzw. 4 ml einer Übernachtskultur des Helferstammes HB101 (pRK2013) (Tabelle 2) bzw. des Rezipienten GV3101 (pMP90) (Tabelle 2) abzentrifugiert, mit LB-Medium gewaschen und in 2 ml bzw. 4 ml LB ohne Antibiotika

resuspendiert. Donor, Helfer und Rezipient wurden gemischt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Konjugationsansatz zentrifugiert, die Bakterien in 2 ml LB-Medium resuspendiert und auf selektive Platten mit Rifampicin und Spectinomycin ausgestrichen. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die erhaltenen *Agrobacterium*-Klone wurden als Einzelklone gepickt, in Medium mit Antibiotika angezogen und in 96er Mikrotiterplatten organisiert. Die Klone wurden als 20 % Glycerinstammproben bei -80 °C gelagert.

2.28 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (*bimolecular fluorescence complementation, BiFC*)

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels BiFC wurden die beiden potentiellen Interaktionspartner an die N- (YN₁₋₁₅₄) bzw. C-terminale (YC₁₅₅₋₂₃₉) Hälfte des gelb fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein, YFP*) fusioniert (Miyawaki *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2002) und in *N. benthamiana* transient koexprimiert. Bei Interaktion der Proteine gelangen die YFP-Hälften in räumliche Nähe und es kommt zur funktionalen Komplementation des YFP-Moleküls (Hu *et al.*, 2002; Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004).

Zur Analyse mittels BiFC wurden *Bs4*, *LePP5* und *NbHsp90-2* in den GATEWAY-kompatiblen Binärvektor pSYPNE-35S-GW (35S:*attR*::*c-myc*-YN) bzw. pGBW735.1 (35S:*HA*-YC::*attR*) rekombiniert (Schornack, 2006; S. Schornack und Th. Lahaye, unveröffentlicht). Die resultierenden T-DNA-Konstrukte (Anhang TAB1) wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* zusammen mit dem *Silencing*-Inhibitor *p19* (Voinnet *et al.*, 2003) kotransformiert (siehe 2.6). Drei Tage nach Inokulation der Bakterien wurden Blattscheiben am konvokalen *Laser Scanning*-Mikroskop analysiert (siehe 2.29).

2.29 Analysen am Laser Scanning-Mikroskop (LSM)

Für Lokalisationsstudien und BiFC-Analysen (siehe 3.1.8, 3.2.2 und 3.2.4) wurde transient transformiertes Blattmaterial am konvokalem *Laser Scanning*-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) untersucht. Für die Detektion von grün fluoreszierenden Fusionsproteinen (GFP-

Fusionen) bzw. einer YFP-Komplementation (resultierend aus der Interaktion YN- und YC-fusionierter Proteine, siehe 2.28) wurde der BP 505-530-Filter verwendet (Emission).

Für die Färbung pflanzlicher Zellkerne wurde eine 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung genutzt. Das Blattmaterial wurde drei bzw. vier Tage nach Transformation der *GFP*-Konstrukte mit der DAPI-Lösung infiltriert. Eine Stunde später wurden die Blattproben am LSM untersucht (Filter BP 385-470 (Emission)).

Anregungs- bzw. Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (<http://www.zeiss.de/>):

eGFP:	Anregung 488 nm	Emission 509 nm
eYFP:	Anregung 514 nm	Emission 526 nm
DAPI:	Anregung 358 nm	Emission 463 nm

2.30 Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)

Virus-induziertes *Gen-Silencing* stellt eine schnelle und einfache Methode zur funktionalen Analyse pflanzlicher Gene durch Reduktion bzw. Stilllegung der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene dar (Baulcombe, 1999). Hierfür werden Fragmente des zu analysierenden Gens ins Genom eines pflanzlichen Virus – in vorliegender Arbeit in das Genom des Tabak-Rattlevirus (TRV) – integriert. Nach Infektion verbreitet sich das Virus systemisch in der Pflanze und die endogenen Transkripte, die homolog zum Insert im verwendeten Virusvektor sind, werden durch posttranskriptionelles *Gen-Silencing* (PTGS) degradiert (Baulcombe, 1999). Induziert wird PTGS durch doppelsträngige RNAs (dsRNAs), die bei der Replikation der Virus-RNA gebildet werden. Die dsRNAs werden in einem sogenannten Dicer-Komplex in *small interfering RNAs* (siRNAs) von 21-25 Nukleotiden Länge endonukleolytisch gespalten. Zu den siRNAs komplementäre, endogene mRNAs werden anschließend im RNA-induzierten *Silencing* (RISC)-Komplex degradiert (Hammond *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001; Meister und Tuschl, 2004). Dadurch wird der mRNA-Level des zu analysierenden Gens in der Zelle reduziert.

TRV ist ein stäbchenförmiges, Einzelstrang-(+)-RNA-Virus. Das virale Genom umfasst zwei RNA-Moleküle (RNA1 und RNA2). Zu Generierung geeigneter Vektoren für VIGS-Experimente wurden korrespondierende cDNA-Fragmente in zwei Ti-Plasmide kloniert (pTRV1 und pTRV2; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b). Die T-DNA des Vektor pTRV1

enthält die Gene des RNA1-Fragmentes, kodierend für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, ein *movement*-Protein, ein 16 kDa cysteinreiches Protein und für ein Ribozym. Die cDNA-Fragmente der T-DNA des Vektors pTRV2 (RNA2) kodieren für das virale Hüllprotein und ein Ribozym. Die Expression der viralen Gene werden durch zwei Kopien des konstitutiven 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus kontrolliert. RNA2 enthält zudem eine GATEWAY-*attR*-Kassette (Liu *et al.*, 2002a), die es ermöglicht, pflanzliche cDNA-Fragmente (*Silencing*-Fragmente) für VIGS-basierte Analysen in den Virusvektor pTRV2 zu rekombinieren. Aus klonierungstechnischen Gründen (für einfache Selektion positiver Klone) wurde der pTRV2-Vektor modifiziert, in dem in das Vektorrückgrat eine Ampicillinresistenz-Kassette kloniert wurde. Dieser Vektor wurde als pTRV2a bezeichnet (P. Römer und Th. Lahaye, unveröffentlicht; Anhang TAB1).

2.30.1 Silencing von Bs4-Interaktoren in *N. benthamiana*

Für die funktionale Analyse von Bs4-Interaktoren mittels VIGS (siehe 3.1.10 und 3.2.6) wurden die Tomaten-cDNA-Fragmente *SlcpHsp70_sil*, *SLEP1_sil*, *SIPRR_sil* bzw. *LePP5-SF1*, *-SF2* und *-SF3* (siehe Anhang A1, A3, TAB1 und TAB2) durch Rekombination in den GATEWAY-kompatiblen Vektor pTRV2a kloniert (siehe 2.19) und in *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) transformiert (siehe 2.21.1). pTRV1- und pTRV2a-enthaltene Bakterien wurden zu gleichen Teilen gemischt ($OD_{600nm} = 0,3$) und über das stumpfe Ende einer Spritze in die Blattunterseite von vier bis sechs Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Zwei Wochen nach Initiierung des VIGS wurden *Bs4* und *avrBs4* (pK7T1WG2-Konstrukte, Anhang TAB1) bzw. *Bs4* und *GFP* (oder leerer Vektor pVP60) *Agrobacterium*-vermittelt kotransformiert ($OD_{600nm} = 0,8$). Eine Woche nach Inokulation der Bakterien wurden die *Bs4*-Phänotypen analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von Interaktoren des Resistenzproteins Bs4 mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems

Mit dem Ziel pflanzliche Proteine zu identifizieren, die mit dem Resistenzprotein Bs4 interagieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit Hefe-Dihybrid-Sichtungen durchgeführt. Fusioniert an die DNA-Bindedomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4-BD; Köderprotein) wurden Bs4 bzw. die Bs4-Domänen TIR, NBS und LRR mit Proteinen kodiert von einer Tomaten-cDNA-Bibliothek (D. Gürlebeck, S. Masiero, U. Bonas und H. Sommer, unveröffentlicht, 2.26.4) und fusioniert an die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD; Beuteproteine) in Hefe koexprimiert. Bei Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein sollte es zur transkriptionellen Aktivierung der GAL4-regulierten Reportergene *ADE2*, *HIS3* sowie *MEL1* kommen (Abbildung 7, 2.26).

3.1.1 Expression der Köderproteine in Hefe

cDNA-Fragmente kodierend für Bs4 und die Bs4-Domänen wurden mittels PCR amplifiziert und in den Ködervektor pGBKT7 kloniert (siehe 2.26.4). Die erhaltenen Plasmide (pGBKT7_Bs4, pGBKT7_Bs4-TIR, pGBKT7_Bs4-NBS und pGBKT7_Bs4-LRR) wurden in die Hefestämme AH109 (*MATa*) und Y187 (*MAT α*) transformiert. Unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI*-Promotors erfolgte die Expression der rekombinanten Proteine als N-terminale Fusionen an GAL4-BD. Ein c-Myc-Epitop erlaubte den Expressionsnachweis der Fusionsproteine mittels Immunoblot (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass die Köderproteine, die die LRR-Domäne enthielten, schwächere Signale lieferten als die TIR- und NBS-Fusionen. Dies ist vermutlich auf eine Instabilität dieser Proteine zurückzuführen. Zudem war festzustellen, dass die GAL4-BD-Fusionsproteine im Hefestamm Y187 prinzipiell schwächer exprimiert wurden als im Stamm AH109 (Abbildung 8). Weder GAL4-BD::Bs4-LRR noch GAL4-BD::Bs4 ließen sich im Gesamtproteinextrakt von Y187-Zellen nachweisen (Abbildung 8). PCR-Analysen zeigten, dass die untersuchten Hefezellen die jeweiligen Köderkonstrukte enthielten (Daten nicht gezeigt).

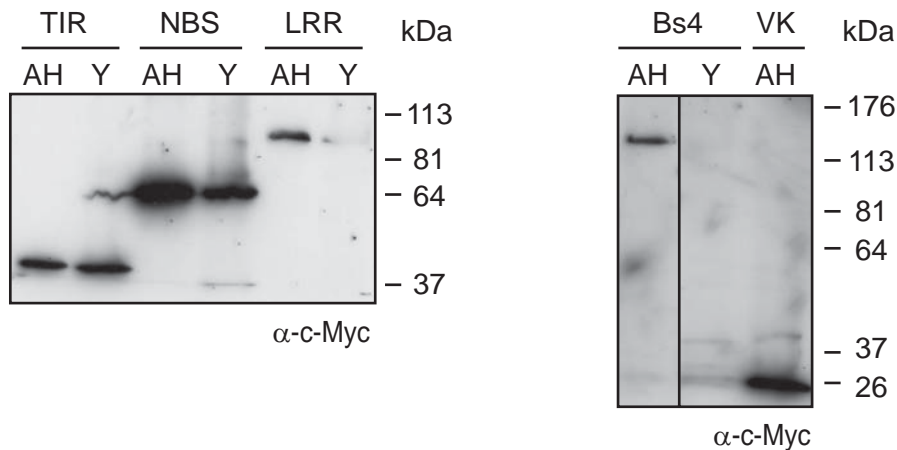


Abbildung 8: Expression von Bs4 und den Bs4-Domänen als GAL4-BD-Fusionsproteine in Hefe. Bs4 sowie die TIR-, NBS- und LRR-Domäne wurden als N-terminale Fusionen an GAL4-BD und ein c-Myc-Epitop in den Hefestämmen AH109 (AH) und Y187 (Y) exprimiert. Je 20 μ l Gesamtproteinextrakt wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α -c-Myc-Antikörpern analysiert. VK: Vektorkontrolle pGBKT7 (GAL4-BD).

3.1.2 Test auf Autoaktivierung

Vor Sichtung der Tomaten-Bibliothek musste sichergestellt sein, dass die Köderproteine nicht die Transkription der Reportergene in Abwesenheit eines Interaktionspartners induzieren (Test auf Autoaktivierung). Bs4 bzw. Bs4-TIR, Bs4-NBS und Bs4-LRR exprimierende Hefeklone des Stammes AH109 wurden auf selektive Platten ausgestrichen, um auf die Aktivierung der Reporter *ADE2*, *HIS3* sowie *MEL1* zu testen. Die Hefezellen zeigten weder ein Wachstum auf den selektiven Platten ohne Adenin bzw. Histidin noch eine Blaufärbung. Die Expression der Bs4-GAL4-BD-Fusionsproteine allein führte demnach nicht zu einer transkriptionellen Reporteraktivierung (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Sichtung der Tomaten-Bibliothek mit Bs4 und den Bs4-Domänen als Köderproteine

Für die Interaktorsichtung stand eine normalisierte, *random primed* cDNA-Bibliothek aus Tomate in pGADT7-Rec, transformiert in den haploiden Hefestamm AH109 (*MAT α*), zur Verfügung (D. Gürlebeck, S. Masiero, U. Bonas und H. Sommer, unveröffentlicht, 2.26.4). Als Köderproteine wurden Bs4 sowie die TIR-, NBS- und LRR-Domänen im haploiden Stamm Y187 (*MAT α*) exprimiert (siehe 3.1.1). Für die Sichtung wurden die Hefestämme AH109 und Y187 gepaart. Die Paarungsansätze wurden auf Medium ohne Tryptophan,

Leucin, Histidin und Adenin (Y-SD –WLHAd) ausplattiert, um zum einen auf die Anwesenheit von Köder- und Beuteplasmid und zum anderen auf Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein zu selektieren (siehe 2.26.6). Im Ergebnis der durchgeführten Bibliothekssichtungen wurden für die TIR- bzw. die NBS-Domäne 179 bzw. 82 diploide Hefeklone auf den Y-SD –WLHAd-Platten erhalten. Die Klone wurden auf selektive Platten (Y-SD –WLHAd) mit X- α -Gal übergestrichen, um die transkriptionelle Aktivierung des Reporters *MEL1* zu prüfen. *MEL1* kodiert für eine α -Galactosidase, die von den Hefezellen sekretiert wird und X- α -Gal im Medium unter Bildung eines blauen Endprodukts hydrolysiert. Lediglich 34 von 179 bzw. zwei von 82 Klonen zeigten erneut Wachstum und teilweise auch Blaufärbung (Tabelle 5). Einige diploide Hefezellen (16), die einen möglichen TIR-Interaktor exprimierten, blieben weiß. Dies kann auf eine schwache oder transiente Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein hinweisen. Eine Bestimmung der Gesamtzahl der erhaltenen diploiden Hefezellen ergab, dass in beiden Paarungsansätzen etwa $1,8 \times 10^8$ Hefekolonien auf Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein gesichtet wurden (Tabelle 5).

Mit der LRR-Domäne bzw. dem Bs4-Volllängenprotein als Köder konnten keine potentiellen Interaktoren isoliert werden. Erst eine Woche nach Ausplattieren der Paarungsansätze wurden Hefekolonien erhalten, die jedoch sehr klein waren. Alle übergestrichenen Klone wuchsen nicht auf neuen, selektiven Platten. Die Zahl der erhaltenen Diploiden war in der Sichtung mit Bs4 zudem deutlich geringer als die, die für die Bibliothekssichtungen mit der Bs4-TIR- oder Bs4-NBS-Domäne erreicht wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Sichtung einer Tomaten-cDNA-Bibliothek mit Bs4 und den Bs4-Domänen als Köderproteine

Köderprotein	Anzahl gesichteter diploider Hefezellen	Anzahl übergestrichener diploider Hefezellen	Anzahl potentieller Interaktoren
TIR	$1,8 \times 10^8$	179	34
NBS	$1,8 \times 10^8$	82	2
LRR	n.b.	114*	0
Bs4	$2,6 \times 10^7/1,6 \times 10^6$	213*/0	0

n.b.: die Zahl der gesichteten diploiden Hefen wurde nicht bestimmt; *: sehr kleine Hefekolonien, die erst eine Woche nach Ausplattieren des Paarungsansatzes auf Y-SD –WLHAd erhalten wurden

3.1.4 Verifizierung der TIR- und NBS-Interaktoren in Hefe

Für die weitere Analyse der putativen TIR- und NBS-Interaktoren wurden die jeweiligen Beuteplasmide aus den diploiden Hefezellen isoliert und in *E.coli*-Zellen transformiert (siehe 2.26.7). Anschließend wurde in direkten Paarungsansätzen die Reproduzierbarkeit der

Interaktionen geprüft (siehe 2.26.8). Für 28 der potentiellen TIR-Interaktoren und für die beiden NBS-Interaktoren konnte erneut eine Aktivierung der Reportergene nach Koexpression mit Bs4-TIR bzw. Bs4-NBS nachgewiesen werden (Tabelle 6, Abbildung 9, Daten nicht gezeigt).

Eine Aktivierung der Reporter weist jedoch nicht zwangsläufig auf eine spezifische Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein hin. So können Mutationen in den Reportergenen oder eine unspezifische Bindung des Beuteproteins oder eine direkte Bindung des Beuteproteins selbst an die *UAS* (*upstream activating sequences*)-Elemente der Reportergene eine spezifische Interaktion „vortäuschen“. Um potentiell spezifische von falsch-positive Interaktoren zu unterscheiden, wurden die isolierten Interaktoren mit humanem Lamin C als Köderprotein in Hefe koexprimiert. Lamin C ist am Aufbau der Kernlamina beteiligt und bildet Homo- sowie Heterodimere mit Lamin A und B (Gerace *et al.*, 1978; Ye und Worman, 1995). Eine Aktivierung der Reportergene nach Koexpression mit Lamin C weist auf eine unspezifische Bindung des Beuteproteins hin. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass das Beuteprotein allein die Reportergene induziert.

Aufgrund einer Reporterogenaktivierung nach Koexpression mit Lamin C wurden sechs der identifizierten TIR-Interaktoren als falsch-positiv klassifiziert und im Folgenden nicht weiter analysiert (Tabelle 6, Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst wurden für Bs4-TIR 22 (TI-Klone, Tabelle 7, Abbildung 9) und für Bs4-NBS zwei Beuteproteine (NI4 und NI71, Tabelle 7, Abbildung 9) als Interaktionspartner isoliert.

Tabelle 6: Analyse der Bs4-TIR- und Bs4-NBS-Interaktoren in Hefe				
Köderprotein	Anzahl gesichteter Interaktoren	Anzahl reproduzierbarer Interaktionen ^{a)}	Anzahl unspezifischer Interaktoren ^{b)}	Anzahl spezifischer, Interaktoren ^{c)}
TIR	34	28	6	22
NBS	2	2	0	2

^{a)} Die Interaktionen der Beuteproteine mit GAL4-BD::Bs4-TIR bzw. GAL4-BD::Bs4-NBS konnten wiederholt nachgewiesen werden.
^{b)} Die Koexpression der Beuteproteine mit GAL4-BD::Lam C resultierte in der Aktivierung der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *MEL1*.
^{c)} Für die korrespondierenden Beuteproteine konnte wiederholt eine Interaktion mit GAL4-BD::Bs4-TIR bzw. GAL4-BD::Bs4-NBS gezeigt werden.

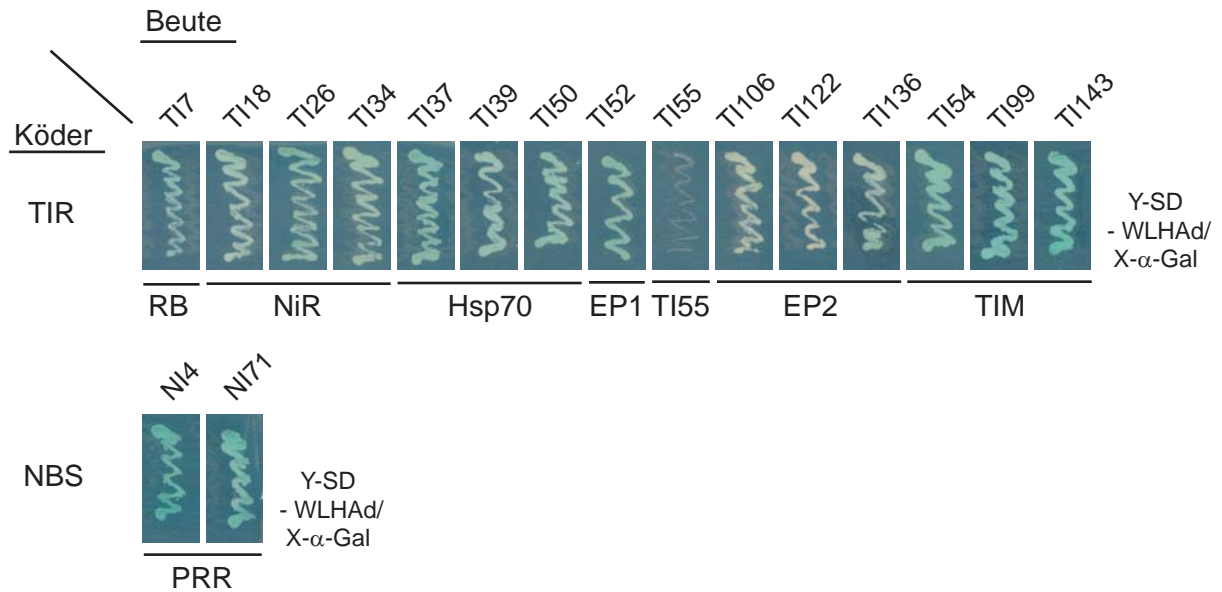


Abbildung 9: Bestätigung der Interaktion von Bs4-TIR bzw. Bs4-NBS mit Beuteproteinen der Tomaten-Bibliothek. Bs4-TIR- und Bs4-NBS wurden als GAL4-BD-Köderproteine im Hefestamm AH109 (*MATa*) und die identifizierten GAL4-AD-Beuteproteine im Hefestamm Y187 (*MATα*) exprimiert. Die Hefestämme wurden gepaart und die diploiden Hefezellen selektiert. Eine Woche nach dem Überstreichen der Kolonien auf Y-SD -WLHAd/X-α-Gal-Medium wurde das Wachstum der Hefezellen dokumentiert. TI: TIR-Interaktoren, NI: NBS-Interaktor. Siehe Tabelle 7: NiR: Nitritreduktase, EP: Exprimiertes Protein, TIM: Triosephosphat-Isomerase, RB: RNA-Bindeprotein, PRR: *Pseudo-Response Regulator*.

Die Abbildung 9 zeigt die gerichteten Interaktionsstudien zwischen GAL4-BD::Bs4-TIR bzw. GAL4-BD::Bs4-NBS und 17 isolierten Bs4-Interaktoren (Tabelle 7). Wachstum und Blaufärbung der diploiden Hefezellen auf den selektiven Platten (Y-SD -WLHAd/X-α-Gal) wiesen auf eine Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein hin. Jedoch wuchsen einige der Diploiden (TI106 bzw. TI122, Abbildung 9) schlechter und blieben weiß. Dies kann auf eine schwache Interaktion zwischen der TIR-Domäne und den jeweiligen Beuteproteinen zurückzuführen sein. Die Abbildung 9 zeigt mit TI55 auch einen der in der Bibliothekssichtung identifizierten Kandidaten, dessen Interaktion mit der TIR-Domäne von Bs4 nicht bestätigt werden konnte.

3.1.5 Sequenzanalyse der TIR- und NBS-Interaktoren

Die zu den verifizierten Beuteproteinen korrespondierenden Tomaten-cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe vektorspezifischer Oligonukleotide sequenziert (Anhang A1, TAB2). Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Interaktoren und deren Homologien.

Für die 22 potentiellen TIR-Interaktoren konnten Homologien zu sechs verschiedenen Proteinen gefunden werden. Vier Beutekonstrukte bargen cDNA-Fragmente kodierend für eine Region im N-Terminus eines Hsp70-Hitzeschockproteins (99 % Sequenzidentität auf AS-Ebene zu SGN-U313975; 477 AS im Vergleich). Hsp70-Proteine spielen im zellulären Kontext eine wichtige Rolle für Faltung, Regulation und Translokation von Proteinen und sind sowohl im Zytoplasma, ER, Mitochondrien und Plastiden zu finden (Sung *et al.*, 2001; Mayer und Bukau, 2005). Fünf TIR-Interaktoren wurden identifiziert, die Homologie zu einer Triosephosphat-Isomerase (TIM) aufweisen (100 % Sequenzidentität auf AS-Ebene zu SGN-U312987; 146 AS), wobei drei der fünf cDNA-Fragmente sequenzidentisch waren. TIM ist ein Enzym der Glykolyse (Christen und Jaussi, 2005). Drei weitere Interaktoren zeigten Homologie zu einer Nitritreduktase (NiR, 100 % Sequenzidentität auf AS-Ebene zu SGN-U316477; 172 AS), einem Enzym, das essentiell für die Stickstoff-Assimilation in Pflanzen ist (Christen und Jaussi, 2005). Für zwei putative TIR-Interaktoren (ein bzw. acht Beutekonstrukte) wurden jeweils Sequenzhomologe identifiziert, für die bisher noch keine Funktion beschrieben wurde. Diese wurden als exprimierte Proteine bezeichnet (EP1 und EP2, Tabelle 7). Einer der beiden Interaktoren (EP1) weist eine konservierte Domäne im C-Terminus auf, eine COG4-Domäne. COG4 ist eine Komponente des oligomeren Golgikomplexes und involviert in Transportvorgänge zwischen ER und Golgi-Apparat (Lupashin und Sztul, 2005). Die BLAST-Analysen ergaben aber auch eine Homologie von EP1 zu Proteinen mit pentatricopeptide repeat (PPR)-ähnlichem Motiv (Small und Peeters, 2000). In der Proteinsequenz von EP1 wurden jedoch keine Wiederholungen des charakteristischen 35 AS-Motivs identifiziert. Für den Interaktor TI7 wurden in BLAST-Analysen zwei konservierte Motive vorhergesagt – im N-Terminus ein Zink-Finger-Motiv (RanBP-Typ) und im C-Terminus ein kurzer Abschnitt (23 AS) eines RNA-Erkennungsmotivs (Tabelle 7).

Die cDNA-Fragmente der beiden NBS-Interaktoren waren sequenzidentisch und kodieren für die N-terminale Region eines putativen Pseudo-Response Regulators (PRR) (99 % Sequenzidentität auf AS-Ebene zu SGN-U317075; 163 AS). Es ist bekannt, dass diese Proteine in die Regulation der circadianen Rhythmik von Pflanzen involviert sind (Makino *et al.*, 2002; Mizuno, 2004). Insgesamt wurden sieben verschiedene Proteine als mögliche Interaktionspartner von Bs4 identifiziert.

Tabelle 7: Sequenzhomologien der isolierten Bs4-TIR- und Bs4-NBS-Interaktoren			
Sequenzhomologie ^{a)}	Korrespondierende Genindizes ^{b)} (E)	Bezeichnung der Klone	Unabhängige Kl./Gesamt ^{c)}
TIR-Interaktoren (TI)			
Hitzeschockprotein Hsp70	SGN-U313975 (0) TC180984 (7,1e-145)	TI30, TI37, TI39 TI50	4/4
Triosephosphat-Isomerase (TIM)	SGN-U312987 (1e-155) TC184816 (2,2e-122)	TI15, TI54, TI58 TI99, TI143	3/5
Nitritreduktase (NiR)	SGN-U316477 (1e-116) TC177950 (4,8e-90)	TI18, TI26, TI34	3/3
Exprimiertes Protein ^{d)} (EP1)	SGN-U326605 (0) TC190238 (3,3e-123)	TI52	1/1
Exprimiertes Protein (EP2)	SGN-U327744 (9e-63) AW933552 (1,2e-32) BM535192 (2,3e-34)	TI14, TI87, TI89 TI106, TI122, TI132, TI136, TI156	1/8
RNA-Bindeprotein ^{e)} (RB)	SGN-U323955 (3e-33) TC181690 (3,4e-86)	TI7	1/1
NBS-Interaktor (NI)			
Putativer <i>Pseudo-Response Regulator</i> (PRR)	SGN-U317075 (1e-111) TC180812 (2,2e-56)	NI4, NI71	1/2

^{a)} Homologien der identifizierten Interaktorfragmente basierend auf BLAST-Analysen (www.tigrblast.tigr.org/tgi, www.sgn.cornell.edu/tools/blast).

^{b)} Genindizes entsprechen der Datenbank-Nomenklatur (SGN bzw. TIGR) und repräsentieren homologe Tomaten-EST-Fragmente.

^{c)} Anzahl unabhängiger Klone im Verhältnis zur Gesamtzahl isolierter Klone (für dasselbe Gen).

^{d)} Die BLAST-Analysen ergaben Homologien zu Proteinen mit COG4- bzw. *pentatricopeptide repeat*-Motiven.

^{e)} In BLAST-Analysen (BLASTP) wurde ein konserviertes Zn-Finger-Motiv (RanBP-Typ; 13 AS; E: 0,001) im N-Terminus und C-terminal die ersten 23 AS eines RNA-Erkennungsmotivs (E: 1e-04) identifiziert.

Die Nukleotidsequenzen der cDNA-Fragmente sind im Anhang (A1) zu finden.

3.1.6 Interaktionsstudien mit den bakteriellen Avirulenzproteinen AvrBs4 und AvrBs3

Bislang konnte weder im Hefe-Dihybrid-System noch in Koimmunopräzipitations (KoIP)-Experimenten eine Interaktion zwischen dem Resistenzprotein Bs4 und dem korrespondierenden Avirulenzprotein AvrBs4 nachgewiesen werden (Schornack *et al.*, 2004; Schornack, 2006). Um zu prüfen, ob die isolierten Bs4-Interaktoren möglicherweise mit AvrBs4 interagieren und somit eine indirekte Interaktion zwischen R- und Avr-Protein vermitteln (siehe 1.3), wurden gerichtete Interaktionsstudien in Hefe mit AvrBs4 als Köderprotein durchgeführt. Als weiteres Köderprotein wurde das Effektorprotein AvrBs3 verwendet. Da AvrBs3 und AvrBs4 auf Proteinebene zu 97 % identisch sind, jedoch von verschiedenen *R*-Genen (*Bs3* bzw. *Bs4*) erkannt werden (Schornack *et al.*, 2005; Schornack *et*

al., 2006; siehe 1.6 und 1.7), sollten die Analysen mit AvrBs3 Aufschluss über die Spezifität der Interaktionen geben. Die verwendeten Avr-Köderproteine stellen Deletionsderivate dar, denen die N-terminalen Aminosäuren 2-152 ($\Delta 2$) fehlen (AvrBs3 $\Delta 2$ und AvrBs4 $\Delta 2$, Abbildung 10A; Plasmide: pGBKT7_*avrBs3* $\Delta 2$ und pGBKT7_*avrBs4* $\Delta 2$; Gürlebeck, 2007). In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass diese Region für eine Autoaktivierung der Reportergene in Hefe verantwortlich ist (Szurek *et al.*, 2002; Schornack *et al.*, 2004; Gürlebeck, 2007). Eine Expression der N-terminal verkürzten Derivate *in planta* zeigte, dass diese Deletionsderivate weiterhin eine *Bs4*- bzw. *Bs3*-abhängige Resistenzreaktion induzieren können (Szurek *et al.*, 2002; Schornack *et al.*, 2004; Schornack, 2006). Zudem wurde AvrBs4 $\Delta 227\Delta 2$, ein C-terminal verkürztes Derivat von AvrBs4, als Köderprotein verwendet (Plasmid: pGBKT7_*avrBs4* $\Delta 227\Delta 2$; Gürlebeck, 2007). Dieses enthält lediglich 5,5 der 17,5 *Repeats* (Abbildung 10A), induziert aber weiterhin eine *Bs4*-HR (Schornack *et al.*, 2004). Eine Bindung von AvrBs4 $\Delta 227\Delta 2$ an die *Bs4*-Interaktoren würde bekräftigen, dass diese Proteine in die *Bs4*-vermittelte Abwehr involviert sind.

Die gerichteten Interaktionsstudien zeigten, dass keiner der isolierten *Bs4*-Interaktoren mit AvrBs3 $\Delta 2$ oder AvrBs4 $\Delta 227\Delta 2$ interagiert (Abbildung 10B). Die Koexpression der TIR-Interaktoren NiR, Hsp70 und EP1 mit AvrBs4 $\Delta 2$ hingegen resultierte in der Aktivierung der Reportergene (Abbildung 10B), was auf eine direkte Interaktion zwischen AvrBs4 $\Delta 2$ und den drei Beuteproteinen hinwies. Zu einem späteren Zeitpunkt, im Rahmen einer Diplomarbeit (J. Piprek und Th. Lahaye, unveröffentlicht), wurde allerdings festgestellt, dass das *avrBs4* $\Delta 2$ -Konstrukt (pGBKT7_*avrBs4* $\Delta 2$) eine Deletion von 102 bp unmittelbar vor der zentralen *Repeat*-Region aufwies. Der Leserahmen blieb erhalten, aber das korrespondierende Protein wies eine Deletion von 34 AS auf (Abbildung 10A). Um zu prüfen, ob die Deletion für die Bindung von AvrBs4 $\Delta 2$ an die identifizierten *Bs4*-Interaktoren von Bedeutung ist, wurde ein neues *avrBs4* $\Delta 2$ -Konstrukt erstellt (pGADT7_*avrBs4* $\Delta 2N$, M. Egler und Th. Lahaye, unveröffentlicht; AvrBs4 $\Delta 2N$ Abbildung 10A) und die Interaktionsstudien wiederholt. Wie die Abbildung 10B zeigt, interagiert keines der Beuteproteine mit AvrBs4 $\Delta 2N$. Basierend auf den Hefe-Dihybrid-Daten vermittelt keiner der isolierten *Bs4*-Interaktoren eine indirekte Interaktion zwischen *Bs4* und AvrBs4.

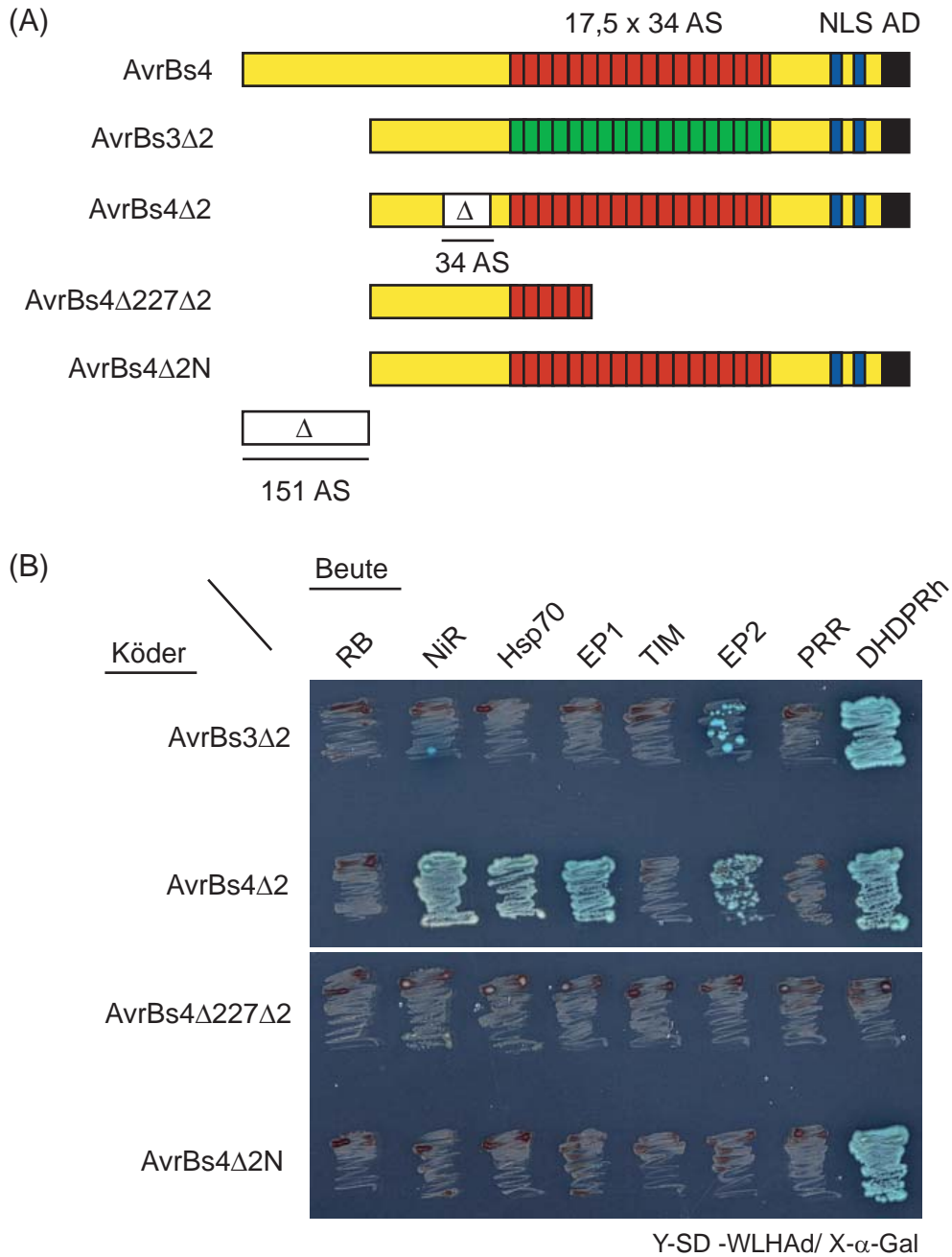


Abbildung 10: Gerichtete Interaktionsstudien zwischen den isolierten Bs4-Interaktoren und den Avirulenzproteinen AvrBs3 und AvrBs4. (A) Für die Hefe-Dihybrid-Analysen wurden die N-terminale Deletionsderivate ($\Delta 2$) AvrBs3 $\Delta 2$, AvrBs4 $\Delta 2$ sowie AvrBs4 $\Delta 227\Delta 2$ und AvrBs4 $\Delta 2N$ als Köderproteine verwendet. Die strukturellen Merkmale der Proteine sind schematisch dargestellt (siehe Abbildung 4; NLS: *nuclear localization signal*, AD: *activation domain*). (B) Die Avr-Köderproteine wurden als GAL4-BD-Fusionen im Hefestamm AH109 und die sieben potentiellen Bs4-Interaktoren als Beuteproteine in Y187 exprimiert. Diploide Hefezellen wurden selektiert und auf Y-SD -WLHAd/X- α -Gal-Medium übergestrichen. Eine Woche nach dem Überstreichen wurde das Wachstum der Hefezellen dokumentiert. Für die sieben Interaktorenklassen ist die Interaktion von jeweils einem Klon gezeigt. TI: TIR-Interaktoren, NI: NBS-Interaktor, RB: RNA-Bindeprotein (Klon # TI7), NiR: Nitritreduktase (# TI18), Hsp70 (# TI37), EP: Exprimiertes Protein (EP1: # TI52; EP2: # TI106), TIM: Triosephosphat-Isomerase (# TI54), PRR: *Pseudo-Response Regulator* (# NI71), Positivkontrolle: DHDPRh: Homolog der Dihydrodipicolinatreduktase aus Paprika.

Als Positivkontrolle wurde in den durchgeführten Interaktionsstudien ein Homolog der Dihydrodipicolinatreduktase (DHDPRh) aus Paprika (*Capsicum annuum* ECW-123) verwendet, das als Interaktor von AvrBs3 Δ 2 in einer vorangegangenen Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziert wurde. Dieses Protein interagiert auch mit AvrBs4 Δ 2; die Bindung von DHDPRh erfolgt über den C-Terminus der Avr-Proteine (D. Gürlebeck, B. Szurek und U. Bonas, unveröffentlicht). Wie Abbildung 10B zeigt, interagierten die Köderproteine AvrBs3 Δ 2, AvrBs4 Δ 2 sowie AvrBs4 Δ 2N mit DHDPRh. Damit konnte die Funktionalität von AvrBs4 Δ 2N gezeigt werden. AvrBs4 Δ 227 Δ 2 interagiert nicht mit DHDPRh (Abbildung 10B), da die Region des C-Terminus, die als Interaktionsoberfläche fungiert, in AvrBs4 Δ 227 Δ 2 deletiert ist (D. Gürlebeck, B. Szurek und U. Bonas, unveröffentlicht).

3.1.7 Auswahl von Bs4-Interaktoren für die *in planta*-Analyse

Für eine Analyse *in planta* wurden die TIR-Interaktoren Hsp70 und EP1 sowie der NBS-Interaktor PRR ausgewählt. Für die drei Kandidaten sollten Lokalisationsstudien und KoIP-Experimente durchgeführt und die funktionale Relevanz der Proteine für die Bs4-vermittelte HR über Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) und Überexpression adressiert werden. Für die *in planta*-Analysen war es notwendig, zunächst die vollständigen kodierenden Sequenzen (CDS, *coding sequences*) der drei ausgewählten Interaktoren zu bestimmen, denn die Sequenzanalysen hatten gezeigt, dass keines der cDNA-Inserts der isolierten Beuteplasmide den vollständigen offenen Leserahmen des jeweiligen Gens umfasste. Von den klonierten cDNAs sowie von homologen *expressed sequence tags* (EST)-Sequenzen aus den Datenbanken wurden Oligonukleotide abgeleitet und mittels RACE-PCR (siehe 2.16) die Vollängen-cDNA-Sequenzen mit 5'- und/oder 3'-UTR ermittelt. Die kodierenden Sequenzen umfassen für Hsp70, EP1 bzw. PRR 2112 bp, 2211 bp bzw. 2373 bp (ATG bis STOPP, siehe Anhang A1). Die CDS der drei Kandidaten (ohne STOPP-Kodon) wurden amplifiziert und in den Vektor pENTR/D-TOPO kloniert (siehe 2.18.1). Ausgehend von diesen GATEWAY-kompatiblen *Entry*-Klonen wurden die Interaktoren für die *in planta*-Analysen in verschiedene Expressionsvektoren rekombiniert (siehe 2.19, 3.1.8 - 3.1.10).

Eine Analyse der TIR-Interaktoren TIM, NiR, EP2 und RB wurde im Rahmen dieser Arbeit hingegen nicht fortgesetzt. Da TIM und NiR essentielle Enzyme des pflanzlichen Stoffwechsels sind, stellte sich die Frage, ob beide Proteine für weiterführende genetische Analysen wie Überexpression und Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) überhaupt geeignet sind. Es war zu vermuten, dass z.B. eine VIGS-induzierte Reduktion der NiR- bzw. TIM-Transkripte pleiotrope Effekte auf den Pflanzen hervorruft. Eine eventuell auftretende, veränderte *Bs4*-HR könnte auf pleiotrope Effekte und nicht auf eine spezifische Funktion der Enzyme im Rahmen der *Bs4*-HR zurückzuführen sein. Tatsächlich weisen transgene Tabakpflanzen, die ein *NiR-antisense* Konstrukt enthalten, ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu Wildtyppflanzen und chlorotische Blätter auf (Vaucheret *et al.*, 1992). Eine Analyse von NiR und TIM im Kontext der *Bs4*-HR wurde daher nicht für sinnvoll erachtet. Die gerichteten Interaktionsstudien für den TIR-Interaktor EP2 hatten auf eine schwache Interaktion mit *Bs4* hingewiesen (siehe 3.1.4). Aufgrunddessen wurde die *in planta*-Analyse dieses Kandidaten nicht fortgesetzt. Für den TIR-Interaktor RB, der Homologie zu einem RNA-Bindeprotein aufwies, zeigten Sequenzanalysen, dass in der Übergangsregion von *GAL4-AD* zur Tomaten-cDNA eine Leserasterverschiebung vorlag (Daten nicht gezeigt). Dadurch kommt es nicht zu einer translationalen Fusion des RNA-Bindeproteins an *GAL4-AD*, sondern es wird nur ein sehr kurzes Fusionsprotein ohne Struktur motive translatiert. Der TIR-Interaktor wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

3.1.8 Lokalisation von SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR *in planta*

Die Proteinsequenzen der drei Interaktoren Hsp70, EP1 und PRR (Anhang A1) wurden mit TargetP V1.1 bzw. ChloroP 1.1 analysiert (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>). Für Hsp70 wurde eine Lokalisation in den Chloroplasten vorhergesagt (im Folgenden bezeichnet als SlcpHsp70, Hsp70 aus *Solanum lycopersicum*, chloroplastidär lokalisiert). Die ersten 63 AS im N-Terminus von SlcpHsp70 wurden als Transitpeptid vorhergesagt. In EP1 (SIEP1) und PRR (SIPRR) wurden keine Transitpeptide oder Sekretionssignale identifiziert. Auf Basis der Homologie zu *Pseudo-Response Regulatoren* war für eine SIPRR eine Lokalisation im Zellkern wahrscheinlich (Strayer *et al.*, 2000).

Um die Lokalisationen der drei Proteine *in planta* zu untersuchen, wurden die kodierenden cDNA-Fragmente in den T-DNA-Vektor pGWB5 (35S:attR::GFP, Nakagawa *et al.*, 2007) rekombiniert und *Agrobacterium*-vermittelt, transient in *N. benthamiana* exprimiert (siehe 2.6). Vier Tage nach Inokulation der Bakterien wurde die subzelluläre Lokalisation der C-terminalen GFP-Fusionsproteine am Laser Scanning-Mikroskop (LSM, siehe 2.29) analysiert. Das als Bs4-TIR-Interaktor isolierte Chaperon SlcpHsp70::GFP konnte in Chloroplasten, SIEP1::GFP im Zytoplasma und SIPRR::GFP im Zellkern detektiert werden (Abbildung 11A). Immunoblotanalysen von Gesamtproteinextrakten zeigten, dass SlcpHsp70::GFP und SIEP1::GFP als Vollängenproteine vorlagen (Abbildung 11B). SIPRR::GFP hingegen konnte mittels Immunoblotanalysen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11B und C).

Die C-Termini von *Arabidopsis*-Homologen des *Pseudo-Response Regulators* SIPRR enthalten ein konserviertes Motiv, das sogenannte CCT-Motiv (CONSTANS, CONSTANS-*like* und TOC1 (*Timing of cab expression 1*)), welches eine Länge von etwa 45 AS mit einem Kernlokalisierungssignal aufweist (Strayer *et al.*, 2000; Mizuno und Nakamichi, 2005). Dieses Motiv ist auch in der Proteinsequenz von SIPRR zu finden (siehe Anhang A1). Um die Funktionalität des Kernimportsignals zu prüfen, wurde der C-Terminus von SIPRR deletiert und die subzelluläre Lokalisation dieses Derivates (SIPRRΔC) *in planta* bestimmt. Wie Abbildung 11A zeigt, lokalisierte SIPRRΔC im Zytoplasma. Im Immunoblot war SIPRRΔC::GFP detektierbar, jedoch nur nach längerer Exposition der Membran (Abbildung 11C).

Abbildung 11: (Abbildung siehe nächste Seite) Subzelluläre Lokalisation von SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR *in planta*. (A) Lokalisationsstudien. LSM-Analysen von *N. benthamiana*-Zellen vier Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *SlcpHsp70::GFP*, *SIEP1::GFP*, *SIPRR::GFP*, *SIPRRΔC::GFP* (pGWB5-Konstrukte) und *GFP* (pGWB6). Die Abbildung zeigt die GFP-Fluoreszenz (grün), die Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot), sowie DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-gefärbte Zellkerne (blau). Maßstab (Balken): 50 μm. (B) Proteinnachweis. Je 20 μl Gesamtproteinextrakt, isoliert aus *N. benthamiana*-Blättern vier Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *SlcpHsp70::GFP*, *SIEP1::GFP*, *SIPRR::GFP*, *SIPRRΔC::GFP* (pGWB5-Konstrukte) und *GFP* (pGWB14), wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α-GFP-Antikörpern analysiert (Expositionszeit 2 min). Die Ponceau S-Färbung der Membran vor Antikörperinkubation zeigt, dass annähernd gleiche Mengen Gesamtprotein für die Immunoblotanalyse verwendet wurden. (C) Längere Expositionszeit (etwa 10 min) derselben Membran. Mit einem Stern ist die Bande markiert, die der erwarteten Größe des SIPRRΔC::GFP-Fusionsproteins entspricht.

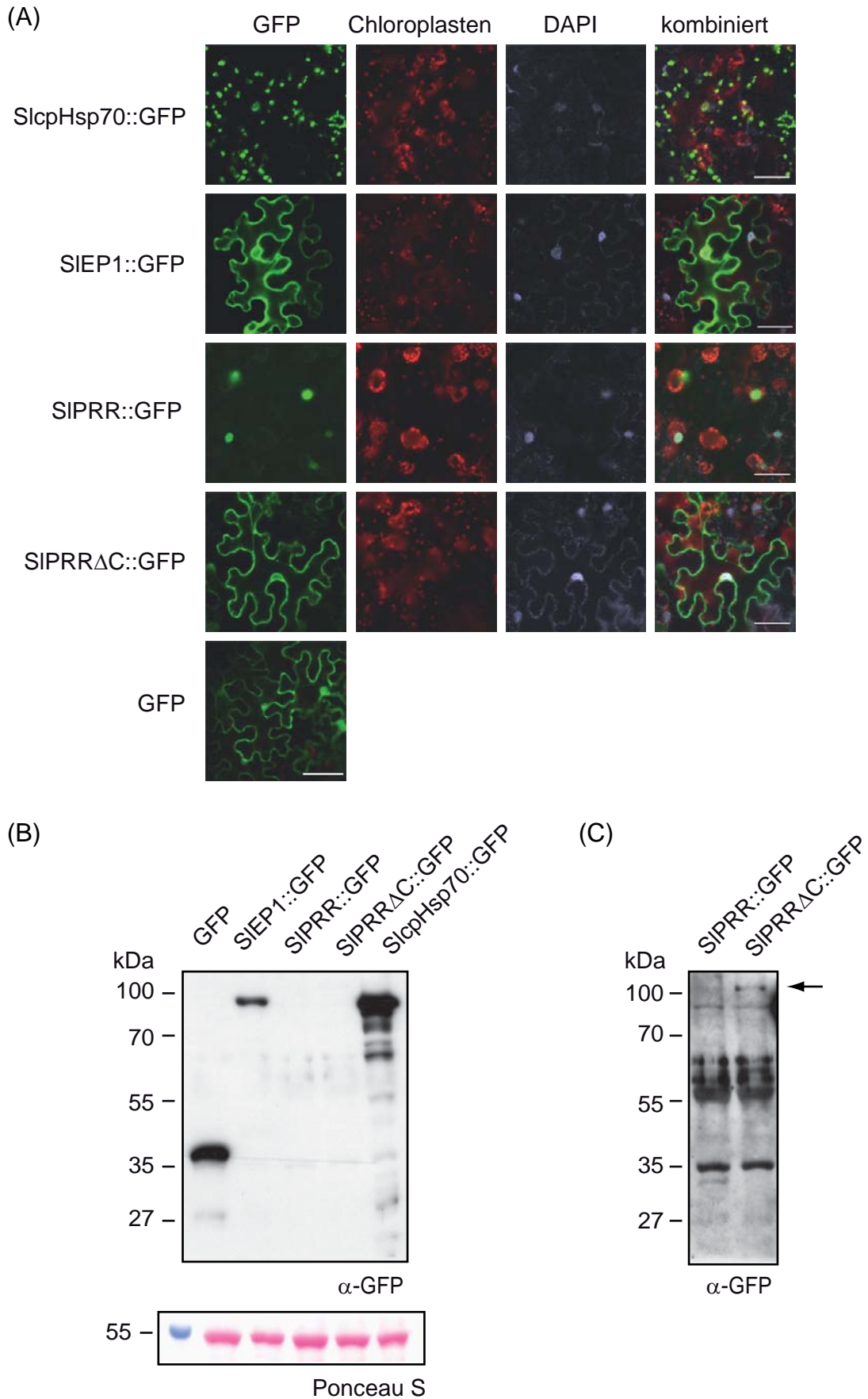


Abbildung 11: Abbildungsunterschrift siehe vorherige Seite.

3.1.9 KoIP-Studien mit SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRR

Mittels KoIP-Analysen sollte die physikalische Interaktion von Bs4 mit SlcpHsp70, SIEP1 bzw. SIPRR untersucht werden. Trotz Lokalisation im Chloroplasten bzw. Kern wurden SlcpHsp70 und SIPRR in die Analysen mit einbezogen. Bs4 hingegen lokalisiert ausschließlich im Zytoplasma (Schornack, 2006). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Tabakresistenzprotein N, welches im Zytoplasma und Kern lokalisiert, *in planta* mit einem Protein (NRIP1) interagiert, das normalerweise in den Chloroplasten zu finden ist. NRIP1 konnte mit N koimmunopräzipitiert werden (Caplan *et al.*, 2008).

Für die KoIP-Experimente wurde Bs4 als C-terminal 10xc-Myc-markiertes Protein (*35S::attR::10xc-myc*, Nakagawa *et al.*, 2007) und die potentiellen Interaktoren als C-terminale 3xHA-Fusionsproteine (*35S::attR::3xHA*, Nakagawa *et al.*, 2007) in *N. benthamiana* transient koexprimiert. Da SIPRR::3xHA, wie auch eine entsprechende C-terminale GFP-Fusion im Immunoblot nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt, Abbildung 11B und C), wurde für die Interaktionsstudien das Deletionsderivat SIPRR Δ C verwendet. Der mittels Hefe-Dihybrid identifizierte Interaktionsbereich lag im N-Terminus des Proteins und ist im Deletionsderivat SIPRR Δ C enthalten (siehe Anhang A1).

Drei Tage nach Inokulation der *Agrobacterium*-Stämme wurde Blattmaterial für die KoIP-Analysen geerntet und aufgearbeitet (siehe 2.23). Bs4 wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das c-Myc-Epitop aus pflanzlichen Proteinextrakten präzipitiert. Im Falle einer physikalischen Assoziation sollten SlcpHsp70, SIEP1 bzw. SIPRR Δ C kopräzipitieren. Dies wurde mittels Immunoblotanalyse untersucht. Für SIEP1 bzw. SIPRR Δ C konnte keine Assoziation mit Bs4 detektiert werden (Abbildung 12). Beide Fusionsproteine waren im Gesamtproteinextrakt detektierbar, wurden aber nicht mit Bs4 kopräzipitiert (Abbildung 12). SlcpHsp70::3xHA hingegen wurde kopräzipitiert (Abbildung 12), was auf eine Interaktion zwischen SlcpHsp70 und Bs4 hinweist. Allerdings konnten auch geringe Mengen des SlcpHsp70::3xHA-Proteins in der GFP-Elutionsfraktion detektiert werden (Abbildung 12). Das signifikant stärkere Signal in der Bs4-Elutionsfraktion lässt jedoch vermuten, dass SlcpHsp70 spezifisch mit Bs4 assoziiert.

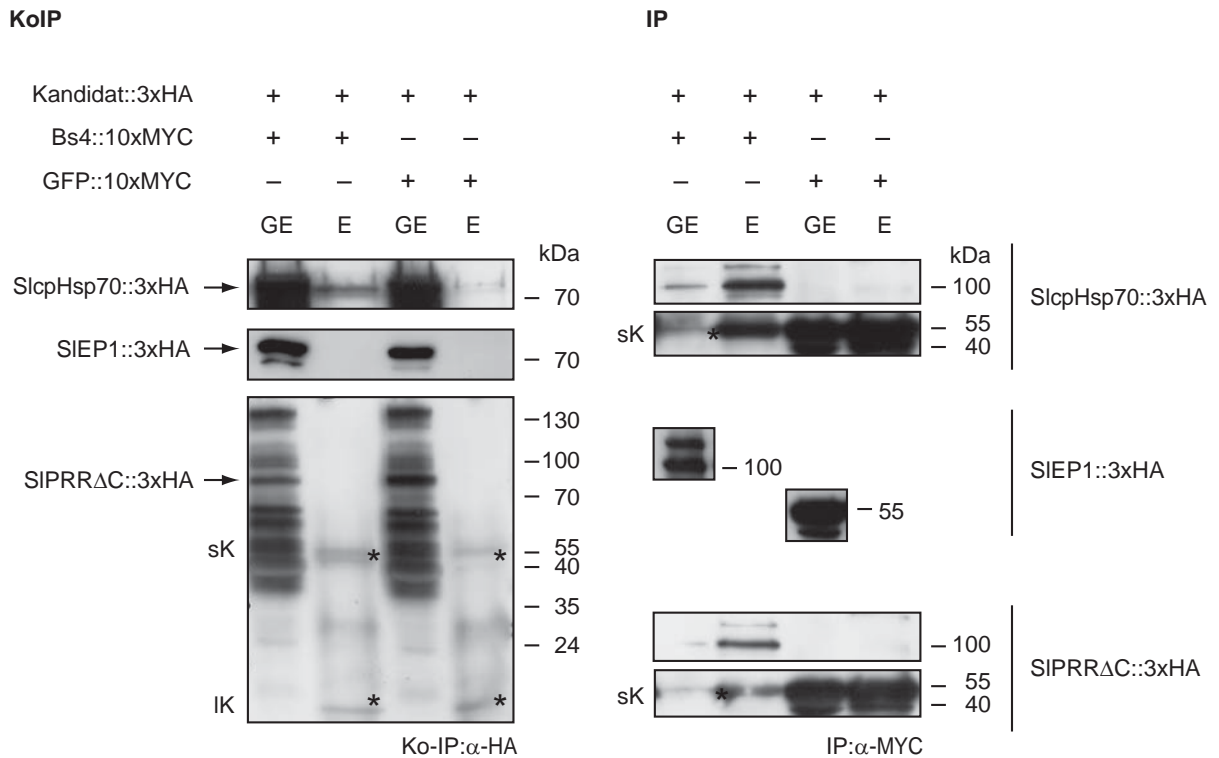


Abbildung 12: KoIP-Analysen für SlcpHsp70, SIEP1 und SIPRRΔC mit Bs4. *SlcpHsp70::3xHA*, *SIEP1::3xHA* sowie das Deletionsderivat *SIPRRΔC::3xHA* (pGWB14-Konstrukte) wurden *Agrobacterium*-vermittelt mit *Bs4::10xc-myc* bzw. *GFP::10c-myc* (pGWB20-Konstrukte) in *N. benthamiana* transient kotransformiert. Drei Tage nach Transformation wurden *Bs4::10xc-Myc* bzw. *GFP::10xc-Myc* aus isolierten Gesamtproteinextrakten immunopräzipitiert. Von der Matrix eluierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α-c-Myc- (IP) bzw. α-HA-Antikörpern (KoIP) analysiert. GE: Gesamtproteinextrakt (je 20 µl geladen), E: Eluat (je 20 µl geladen). Mit Sternen bzw. sK und IK sind schwere und leichte Kette des α-c-Myc-Antikörpers gekennzeichnet. *SlcpHsp70::3xHA*, *SIEP1::3xHA* sowie *SIPRRΔC::3xHA* sind mit Pfeilen (erwartete Molekülmasse) markiert.

3.1.10 Funktionale Analysen in *N. benthamiana*

Neben den KoIP-Experimenten wurden Überexpressions- und *Silencing*-Analysen (siehe 2.30) durchgeführt, um eine biologische Relevanz von *SlcpHsp70*, *SIEP1* und *SIPRR* für die *Bs4*-vermittelte HR zu prüfen. Für die Überexpressionsanalysen wurden *SlcpHsp70*, *SIEP1* und *SIPRR* unter Kontrolle des *35S*-Promotors zusammen mit *Bs4* und einem *avrBs4*-Derivat (pK7T1WG2_ *Bs4*, pK7T1WG2_ *avrBs4s227R6*; R. Morbitzer und Th. Lahaye, unveröffentlicht; Anhang TAB1) in *N. benthamiana* kotransformiert und die resultierenden *Bs4*-HRs analysiert (Abbildung 13A). Für die Virus-induzierten *Silencing*-Experimente wurden kurze cDNA-Fragmente der drei Gene amplifiziert (siehe Anhang A1) und in das Genom des Tabak-Rattlevirus integriert (siehe 2.30). Zwei Wochen nach der Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen mit den *Silencing*-Konstrukten wurden *Bs4* und *avrBs4*

Agrobacterium-vermittelt kotransformiert. Die pflanzlichen Reaktionen wurden eine Woche später analysiert (Abbildung 13B). Makroskopisch konnten jedoch keine Veränderungen der *Bs4*-HR beobachtet werden weder nach Überexpression von *SlcpHsp70*, *SIEP1* oder *SIPRR* noch nach Virus-induziertem *Silencing* der homologen Gene (Abbildung 13A und B). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass eines der drei Proteine eine wesentliche Rolle für die *Bs4*-HR spielt.

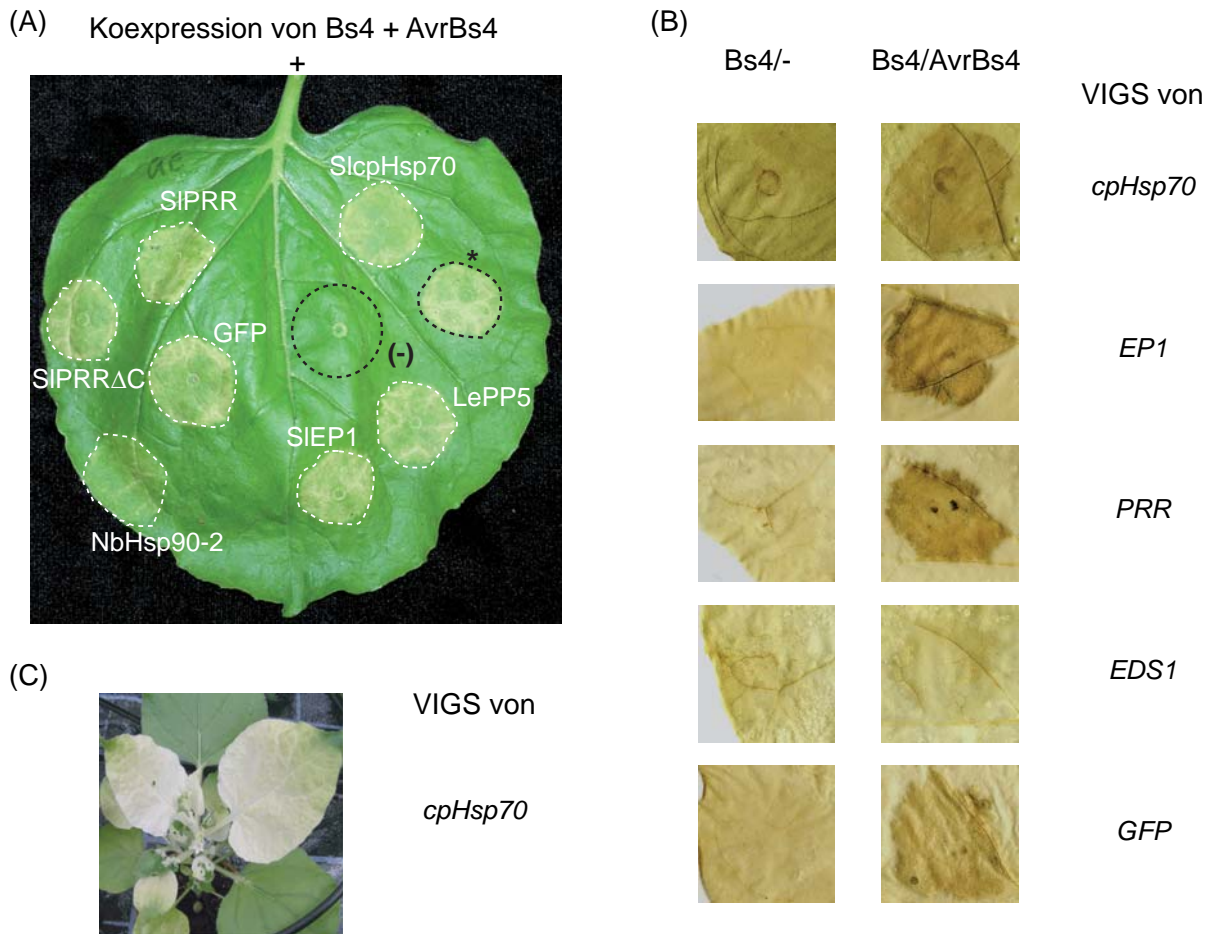


Abbildung 13: Die Überexpression bzw. das *Silencing* von *cpHsp70*, *EPI* sowie *PRR* haben keinen Effekt auf die *Bs4*-HR. (A) Überexpressionsanalysen. Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation von *35S:SlcpHsp70::GFP*, *35S:SIEP1::GFP*, *35S:SIPRR::GFP*, *35S:SIPRRΔC::GFP* (pGWB5-Konstrukte) und als Kontrollen *35S:GFP::3xHA* (pGWB14; kein Effekt auf die *Bs4*-HR) bzw. *35S:NbHsp90-2::3xHA* (pGWB14; reduzierte *Bs4*-HR) (Schornack, 2006) zusammen mit *35S:Bs4::TIA1* und *35S:avrBs4s227R6::TIA1* (pK7T1WG2-Konstrukte) in *N. benthamiana*. Die *Bs4*-HRs wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien fotografiert. (*): *Bs4* + *AvrBs4s227R6*; (-) *Bs4* + *GFP*. (B) VIGS-Analysen. *Bs4*-Phänotypen nach VIGS von *cpHsp70*, *EPI*, *PRR* und als Kontrollen *GFP* (kein Effekt auf die *Bs4*-HR) und *EDS1* (reduzierte *Bs4*-HR) (Schornack *et al.*, 2004) in *N. benthamiana*. Das *Silencing* wurde induziert durch *Agrobacterium*-vermittelte Kotransformation von *RNA1* (pTRV1-Konstrukt) zusammen mit *SlcpHsp70_sil-*, *SIEP1_sil-*, *SIPRR_sil-*, *GFP-* bzw. *NbEDS1-RNA2-Silencing*-Konstrukten (pTRV2/2a-Konstrukte, Anhang A1) Zwei Wochen nach Initiierung des VIGS wurden die Pflanzen mit *35S:Bs4* und einem leeren T-DNA-Konstrukt (pVP60) bzw. mit *35S:Bs4* und *35S:avrBs4* kotransformiert. Die *Bs4*-HRs wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien fotografiert. Die Blätter wurden in EtOH gebleicht. (C) Mosaikphänotyp *cpHsp70-gesilencter N. benthamiana*-Pflanzen.

3.2 Analyse der Serin/Threonin-Phosphatase LePP5 im Kontext der *Bs4*-vermittelten Resistenz

Für die CC-NBS-LRR-Proteine I-2 aus Tomate und RPM1 aus *Arabidopsis* sowie für das TIR-NBS-LRR-Protein N aus Tabak wurden das Hitzeschockprotein Hsp90 und die Serin/Threonin-Phosphatase PP5 als Interaktionspartner identifiziert (Hubert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005) (siehe 1.10). Dies weist daraufhin, dass Hsp90 und PP5 generell mit NBS-LRR-Proteinen *in vivo* assoziiert sein könnten. Während jedoch für zahlreiche Mitglieder der NBS-LRR-Klasse, so auch für *Bs4*, eine funktionale Abhängigkeit von Hsp90 gezeigt wurde und für Hsp90 eine Funktion in Reifung und Stabilisierung von R-Proteinen sowie in der Regulation der R-Proteinaktivität angenommen wird (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003b; Takahashi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Schornack, 2006) (siehe 1.9), ist bislang nicht bekannt, welche Rolle PP5 in der NBS-LRR-vermittelten Resistenz spielt. Um dies zu hinterfragen, sollte *PP5* aus Tomate (*LePP5*, de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005) kloniert und in RT-PCR-, KoIP-, Überexpressions- und *Silencing*-Experimenten im Kontext der *Bs4*-vermittelten Resistenz analysiert werden.

3.2.1 Transkriptanalyse von *LePP5* in Tomate

LePP5 ist ein *single copy*-Gen in Tomate. Die *pre*-mRNA (> 9365 Nukleotiden) wird alternativ gespleißt (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2003). Es entstehen zwei mRNAs mit 1458 (GenBank AY150041) bzw. 1671 (GenBank AY182777) Nukleotiden Länge. RT-PCR-Analysen zeigten, dass (i) *LePP5* konstitutiv in Wurzeln, Blättern und Stängeln nicht Pathogen-befallener Tomatenpflanzen exprimiert wird und (ii) dass die kürzere mRNA in höherer Abundanz vorliegt (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2003). Um zu prüfen, ob sich im Rahmen der *Bs4*-vermittelten Resistenz die Expression von *LePP5* verändert, wurden die Transkriptmengen in Tomatenpflanzen nach Inokulation von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) untersucht. Vergleichend wurden kompatible und inkompatible Tomaten-*Xcv*-Interaktionen analysiert. Das heißt, *Bs4*-Tomaten wurden mit dem Wildtypstamm 85-10 und dem isogenen, *AvrBs4*-translozierenden *Xcv*-Stamm 85-10 pDS200F infiziert. Auch RNA aus unbehandelten Pflanzen wurde analysiert, um einen möglichen Einfluss von Verwundungsreaktionen auf den Expressionslevel von *LePP5* beurteilen zu können. Die Transkriptanalysen erfolgten mittels semiquantitativer Reverser-Transkriptase (RT)-PCR

(siehe 2.15). Es wurden Oligonukleotide zur Amplifikation der Vollängen-cDNA-Fragmente von *LePP5* sowie eines 3`-Abschnittes mit 437 bp Länge verwendet (Abbildung 14). Als Standard für die RT-PCR-Analysen diente der Elongationsfaktor EF-1 α , der konstitutiv exprimiert wird (Pokalsky *et al.*, 1989) (Abbildung 14).

Wie die Abbildung 14 zeigt, bedingt weder eine Verwundung noch eine Infektion der Tomatenpflanzen mit *Xcv* eine sichtbare Änderung der *LePP5*-Transkriptlevel. Die Mengen an *LePP5*-Produkt, die mit beiden Oligonukleotidkombinationen amplifiziert wurden, waren zwischen unbehandelter, mit MgCl₂-infiltrierter und den Pathogen-infizierten Proben nicht signifikant verschieden. Es konnte somit keine differentielle transkriptionelle Regulation der *LePP5*-Expression im Vergleich von kompatibler und inkompatibler Interaktion festgestellt werden.

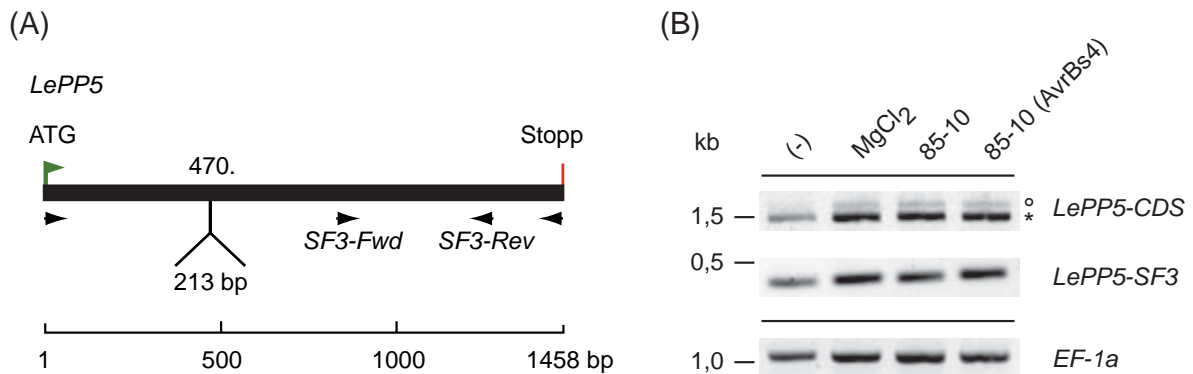


Abbildung 14: *LePP5* wird konstitutiv exprimiert. (A) Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz von *LePP5* (kürzere Spleißvariante, 1458 bp). An Position 470 (relativ zum ATG) enthält die längere Spleißvariante zusätzlich 213 bp. Mit Pfeilen sind die relativen Positionen der für die RT-PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide dargestellt. (B) RT-PCR-Analysen. Amplifikation von *LePP5* aus cDNA von Tomatenpflanzen des Kultivars Moneymaker (*Bs4*) nach Infiltration von *Xcv* 85-10, *Xcv* 85-10 pDS200F (*AvrBs4*) bzw. MgCl₂ (10 mM). Das für die cDNA-Synthese verwendete Probenmaterial wurde jeweils 20 Stunden nach Infiltration geerntet. Für die RT-PCR-Analysen wurden Oligonukleotide zur Amplifikation der *LePP5*-CDS (beide Spleißvarianten; * 1458 bp bzw. ° 1671 bp) und eines 437 bp-Fragmentes (*SF3*) verwendet. Als Kontrolle für den Einsatz annähernd gleicher cDNA-Mengen diente die Amplifikation des Elongationsfaktors EF-1 α . Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. (-) cDNA unbehandelter Blätter.

3.2.2 Lokalisation von LePP5 in planta

Als Interaktor des R-Proteins I-2 wurde die 55 kDa-Isoform von LePP5 identifiziert, die vom kürzeren Transkript kodiert wird (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2003; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Daher wurde auch für die Charakterisierung von LePP5 im Kontext der *Bs4*-vermittelten Resistenz ausschließlich die 55 kDa-Isoform analysiert. Die korrespondierende cDNA wurde zunächst ohne Stopp-Kodon amplifiziert und in den *Entry*-Vektor pENTR/D-TOPO kloniert (siehe 2.18.1). Für Lokalisationsstudien wurde *LePP5* anschließend in den T-DNA-Vektor pGWB5 (*35S::attR::GFP*, Nakagawa *et al.*, 2007) rekombiniert. Nach *Agrobacterium*-vermittelter transients Transformation in *N. benthamiana* wurde die subzelluläre Lokalisation des LePP5::GFP-Fusionsproteins am LSM untersucht. LePP5::GFP lokalisierte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern von *N. benthamiana*-Zellen (Abbildung 15A). Immunoblotanalysen belegten, dass LePP5::GFP als Fusionsprotein erwarteter Molekülmasse (~82 kDa) exprimiert wurde. Proteinfusionen geringerer Molekülmasse, die mögliche Degradationsprodukte darstellen könnten, wurden ebenfalls detektiert, lieferten jedoch deutlich schwächere Signale (Abbildung 15B). Die Ergebnisse von de la Fuente van Bentem und Koautoren (2003) zur Lokalisation von LePP5 konnten somit bestätigt werden. Da auch GFP-markiertes *Bs4* zytoplasmatisch lokalisiert (Schornack, 2006), war damit eine Voraussetzung, nämlich eine Kolokalisation von *Bs4* und LePP5 im Zytoplasma, für eine physikalische Interaktion gegeben.

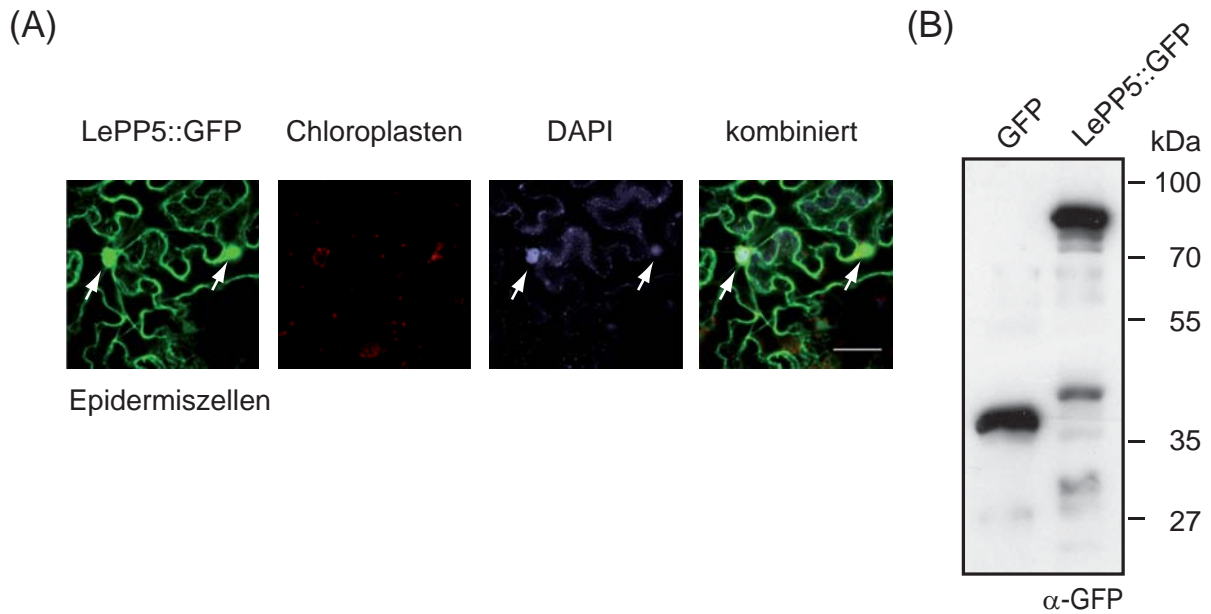


Abbildung 15: LePP5 lokalisiert im Zytoplasma und Zellkern. (A) LSM-Analysen drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *LePP5::GFP* (pGWB5-Konstrukt) in *N. benthamiana*. Die Abbildung zeigt die GFP-Fluoreszenz (grün), die Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot), sowie DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-gefärbte Zellkerne (blau; Pfeile). Maßstab (Balken): 50 μm . (B) Proteinnachweis. Je 20 μl Gesamteinextrakt, isoliert aus *N. benthamiana*-Blättern drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *LePP5::GFP* und *GFP::3xHA* (pGWB14-Konstrukt), wurde mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α -GFP-Antikörpers analysiert.

3.2.3 Koimmunopräzipitation von LePP5 mit Bs4

In Hefe-Dihybrid- und *in vitro* GST-Präzipitationsexperimenten wurde gezeigt, dass LePP5 spezifisch an die LRR-Domäne von I-2 bindet und zwar über die ersten 151 Aminosäuren von LePP5 (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). In diesem Bereich enthält die Serin/Threonin-Phosphatase 5 eine *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne bestehend aus drei TPR-Motiven und einer sich anschließenden AS-Sequenz mit geringer Homologie zu einem TPR-Motiv (Abbildung 16). TPR-Domänen sind häufig in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Blatch und Lassle, 1999; D'Andrea und Regan, 2003). Der C-Terminus von LePP5 umfasst die Phosphatase-Domäne und ein mögliches Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) (Abbildung 16).

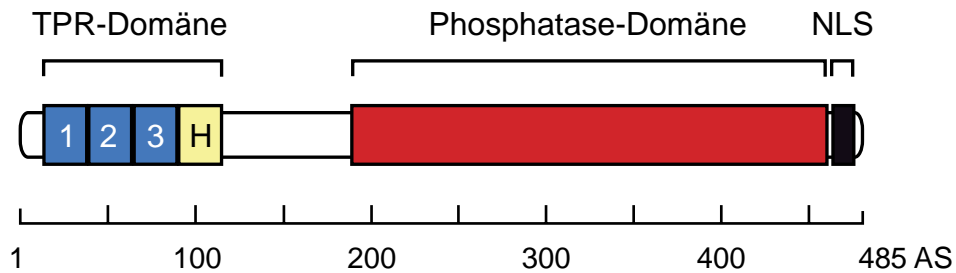


Abbildung 16: Proteindomänen von LePP5. Das LePP5-Protein weist N-terminal eine *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne bestehend aus drei TPR-Motiven und einer Region mit geringerer Homologie (H) zu diesem Motiv auf. C-terminal liegen die Phosphatase-Domäne und eine potentielle Kernlokalisierungssequenz (NLS). Abbildung modifiziert nach de la Fuente van Bentem *et al.* (2005).

Eine Bindung von LePP5 an die LRR-Domäne von Bs4 bzw. an das Volllängenprotein Bs4 wurde zunächst mit Hilfe des GAL4-Hefe-Dihybrid-Systems getestet. Bs4 bzw. Bs4-LRR wurden als GAL4-BD-Fusionsproteine (Köderproteine) und LePP5 als Fusion an GAL4-AD (Beuteprotein) in Hefe koexprimiert. Eine Interaktion zwischen Bs4 bzw. Bs4-LRR und LePP5 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da der fehlende Interaktionsnachweis auf experimentelle Gründe, z.B. auf zu geringe Mengen exprimierten Köderproteins (siehe 3.1.1, Abbildung 8), zurückzuführen sein könnte, wurden im Folgenden KoIP-Experimente unter Verwendung pflanzlicher Proteinextrakte durchgeführt. *LePP5* wurde in den Expressionsvektor pGWB14 (*35S::attR::3xHA*, Nakagawa *et al.*, 2007) und die *Bs4*-cDNA in pGWB20 (*35S::attR::10xc-myc*, Nakagawa *et al.*, 2007) kloniert. *LePP5::3xHA* und *Bs4::10xc-myc* wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* kotransformiert. Drei Tage nach Transformation wurden Gesamtproteinextrakte aus den inokulierten Blättern isoliert und mit Protein G-Agarose und Antikörpern gegen das c-Myc-Epitop inkubiert, um *Bs4::10xc-Myc* zu präzipitieren. Mit der Matrix assoziierte Proteine wurden mit Laemmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (Abbildung 17). Um eine unspezifische Bindung von *LePP5::3xHA* ausschließen zu können, wurde als Kontrolle eine KoIP mit *GFP::10xc-Myc* und *LePP5::3xHA* durchgeführt (Abbildung 17).

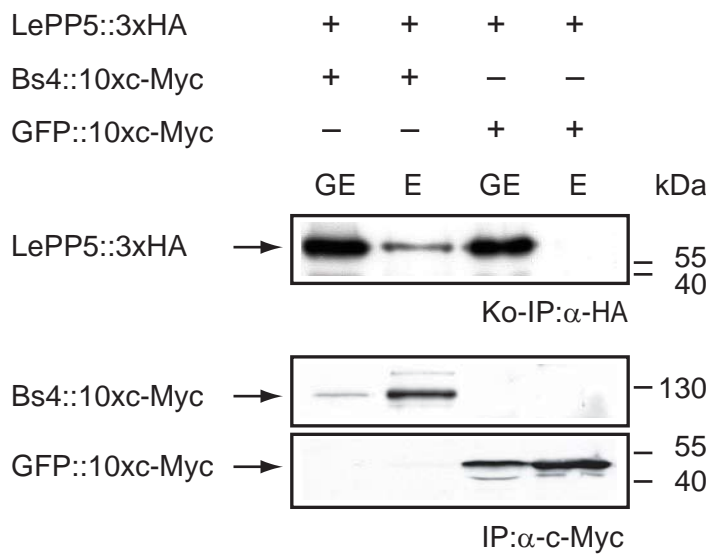


Abbildung 17: LePP5 kopräzipitiert mit Bs4. *LePP5::3xHA* wurde mit *Bs4::10xc-myc* bzw. *GFP::10xc-myc* *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* kotransformiert. *Bs4::10xc-Myc* und *GFP::10xc-Myc* wurden aus Gesamtproteinextrakten immunopräzipitiert. Von der Matrix eluierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α-HA- (KoIP) bzw. α-c-Myc-Antikörpern (IP) analysiert. GE: Gesamtproteinextrakt (je 20 µl geladen), E: Eluat (je 20 µl geladen).

Wie die Abbildung 17 zeigt, wurden *Bs4::10xc-Myc* bzw. *GFP::10xc-Myc* aus Gesamtproteinextrakten präzipitiert (IP). Eine Koimmunopräzipitation der Serin/Threonin-Phosphatase 5 war jedoch ausschließlich mit *Bs4::10xc-Myc* zu detektieren (Abbildung 17, KoIP). Dass *LePP5::3xHA* auch im Kontrollansatz exprimiert wurde, konnte im Immunoblot nachgewiesen werden (Abbildung 17, GE). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *LePP5* spezifisch mit dem Resistenzprotein *Bs4* assoziiert.

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion wurden cDNA-Fragmente kodierend für die TPR- (AS 1-151) und die Phosphatase-Domäne (PP, AS 152-485; Abbildung 16) von *LePP5* amplifiziert und in den Expressionsvektor pGWB14 kloniert. Die resultierenden T-DNA-Konstrukte wurden mit *Bs4::10xc-myc* bzw. *Bs4-LRR::10xc-myc* in *N. benthamiana* kotransformiert. Wie bereits für I-2 gezeigt, wurde auch eine Assoziation zwischen *LePP5* und *Bs4-LRR* bzw. zwischen der TPR-Domäne von *LePP5* und *Bs4* bzw. *Bs4-LRR* geprüft. Drei Tage nach Transformation wurden pflanzliche Gesamtproteinextrakte isoliert. *Bs4::10xc-Myc* bzw. *Bs4-LRR::10xc-Myc* wurden immunopräzipitiert und eine mögliche Koimmunopräzipitation von *LePP5* bzw. der *LePP5*-Domänen wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalysen untersucht (Abbildung 18).

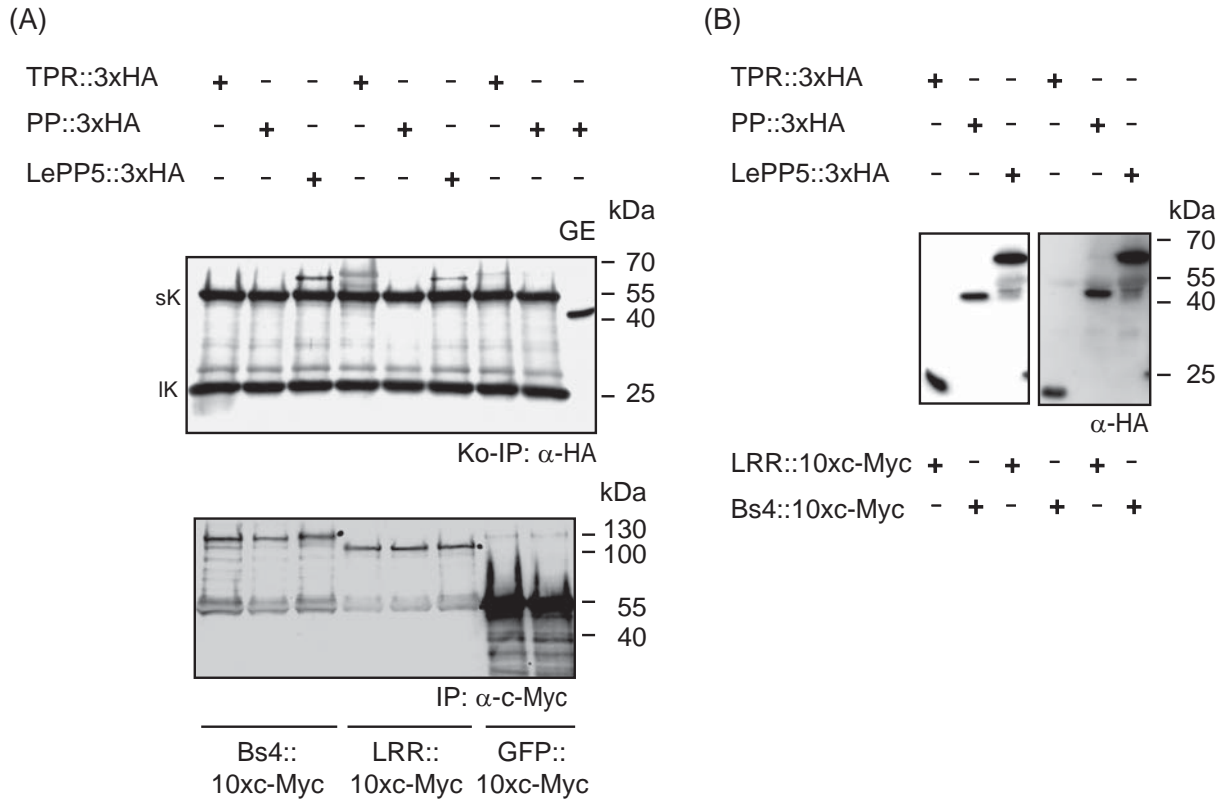


Abbildung 18: LePP5 assoziiert mit der LRR-Domäne von Bs4. (A) *LePP5::3xHA*, *TPR::3xHA* sowie *PP::3xHA* (pGWB14-Konstrukte) wurden mit *Bs4::10xc-myc* bzw. *GFP::10xc-myc* (pGWB20-Konstrukte) *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* kotransformiert. *Bs4::10xc-Myc* und *GFP::10xc-Myc* wurden aus Gesamtproteinextrakten immunopräzipitiert. Von der Matrix eluierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung von α -HA- (KoIP) bzw. α -c-Myc-Antikörpern (IP) analysiert. GE: Gesamtproteinextrakt. sK: schwere Kette und IK: leichte Kette des Immunglobulins G. (B) Die Expression von *LePP5::3xHA*, *TPR::3xHA* und *PP::3xHA* wurden mittels Immunoblotanalyse (10 % Gel) unter Verwendung eines α -HA-Antikörpers untersucht. Es wurden jeweils 20 μ l Gesamtproteinextrakt geladen.

Wie aus der Abbildung 18 hervorgeht, konnte *LePP5* mit der LRR-Domäne von *Bs4* koimmunopräzipitiert werden. Eine KoIP der TPR- bzw. der PP-Domäne von *LePP5* mit *Bs4* oder *Bs4*-LRR konnte indes nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Immunoblotanalysen der Gesamtproteinextrakte belegten, dass die *LePP5*-Domänen als C-terminale HA-Fusionen generell exprimiert wurden (Abbildung 18B).

Zusammengefasst zeigten die KoIP-Experimente, dass die Serin/Threonin-Phosphatase 5 mit der LRR-Domäne des Resistenzproteins *Bs4* assoziiert. Es konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden, dass - wie bei I-2 - die Assoziation von der TPR-Domäne von *LePP5* vermittelt wird.

3.2.4 Interaktionsstudien mit Bs4, LePP5 und Hsp90 in planta

Als Interaktor von LePP5 wurde in einer Hefe-Dihybrid-Sichtung das Hitzeschockprotein Hsp90 isoliert (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Interessanterweise ist Hsp90 als Interaktor zahlreicher NBS-LRR-Proteine bekannt (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003b; Takahashi *et al.*, 2003; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Schornack, 2006). Auch für Bs4 konnte bereits eine physikalische Assoziation mit Hsp90 *in planta* nachgewiesen werden (Schornack, 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion zwischen LePP5 und Hsp90 *in planta* untersucht und die mittels KoIP gezeigte Assoziation von Bs4 und LePP5 (siehe 3.2.3) in einem komplementären Ansatz bestätigt werden. Die Interaktionsstudien erfolgten *in planta* mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC). Die Vollängen-cDNAs von *LePP5*, *Bs4* und *NbHsp90-2* wurden in die T-DNA-Expressionsvektoren pSPYNE-35S-GW bzw. pGWB735.1 rekombiniert (*35S::attR::c-myc-YN* bzw. *35S::3xHA-YC::attR*, Schornack, 2006, S. Schornack und Th. Lahaye, unveröffentlicht). Dies ermöglichte die Expression der Proteine zum einen als Fusion an die N-terminalen 155 AS von YFP (YN) und zum anderen an die 83 AS des YFP-C-Terminus (YC). Alle Kombinationen von YC- und YN-Fusionsproteinen wurden in *N. benthamiana* koexprimiert. Bei einer Interaktion zwischen den Fusionsproteinen kommt es durch die räumliche Nähe der beiden YFP-Hälften zur funktionalen Komplementation von YFP. Das heißt, dass im Falle einer Interaktion eine YFP-Fluoreszenz in transformierten Pflanzenzellen detektiert werden kann.

Drei Tage nach transients Kotransformation der YN- und YC-Konstrukte in *N. benthamiana* wurden Blattscheiben mikroskopisch am LSM untersucht. Dabei konnten sowohl Fluoreszenzsignale nach Koexpression von LePP5 mit NbHsp90-2 als auch für LePP5 mit Bs4 jeweils im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 19A). Die Interaktion von Bs4 mit NbHsp90-2 diente als Positivkontrolle (Schornack, 2006). Die Fluoreszenzsignale, die nach Koexpression von Bs4 als YC- oder YN-Fusion mit den jeweils korrespondierenden Fusionsproteinen von LePP5 bzw. NbHsp90-2 erhalten wurden, waren deutlich schwächer als die YFP-Signale nach Koexpression der LePP5- und NbHsp90-Fusionen (Abbildung 19A). Zudem zeigten signifikant weniger Zellen eine YFP-Fluoreszenz. Es ist anzunehmen, dass eine schwache Expression von Bs4:YN und YC:Bs4 für die geringe Anzahl fluoreszierender Zellen und die relativ schwachen Fluoreszenzintensitäten verantwortlich ist. Die BiFC-Analysen weisen des Weiteren auf eine Dimerisierung von NbHsp90-2- und LePP5-Molekülen hin (Abbildung 19A).

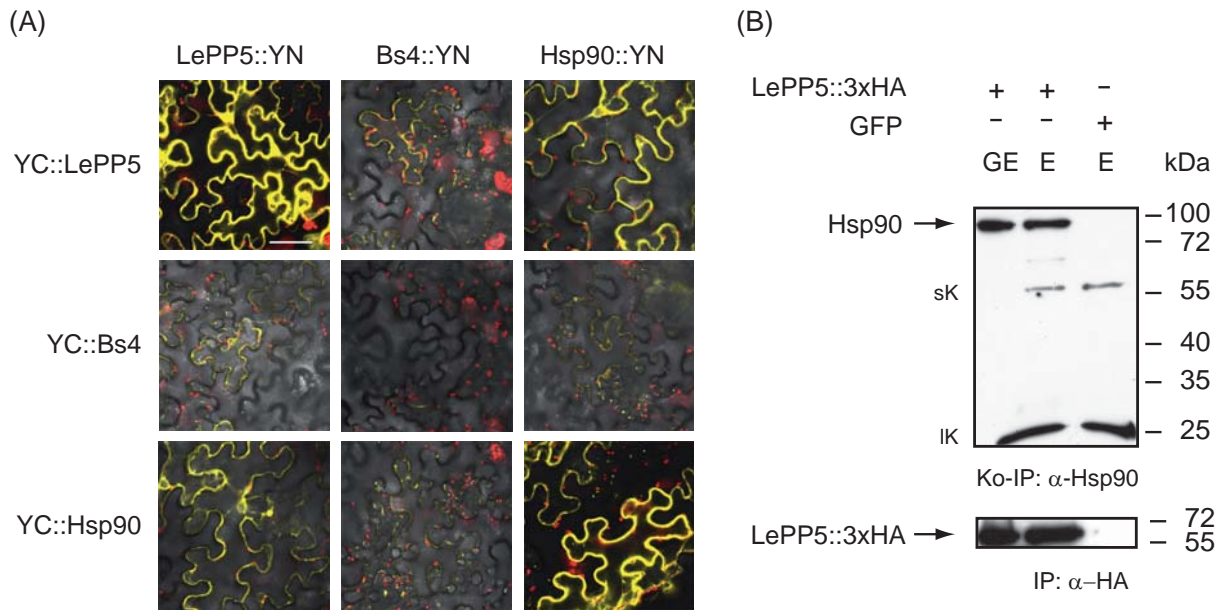


Abbildung 19: LePP5 interagiert mit Bs4 und NbHsp90-2 in planta. (A) BiFC-Analysen mit LePP5, Bs4 und NbHsp90-2. LSM-Analysen drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotretransformation von *LePP5::YN*, *Bs4::YN* und *NbHsp90-2::YN* (pSPYNE-35S-GW-Konstrukte) jeweils mit *YC::LePP5*, *YC::Bs4* und *YC::NbHsp90-2* (pGWB735.1-Konstrukte) in *N. benthamiana*. Maßstab (Balken): 50 µm. Maßstab und Einstellungen am LSM sind für alle Aufnahmen gleich. (B) Koimmunopräzipitation von Hsp90 mit LePP5. *LePP5::3xHA* (pGWB14-Konstrukt) wurde *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. Das Fusionsprotein wurde aus Gesamtproteinextrakten immunopräzipitiert (IP). Eine Kopräzipitation von endogenem Hsp90 wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Hsp90-Antikörpers (KoIP) analysiert. GE: Gesamtproteinextrakt (je 20 µl geladen); E: Eluat (je 20 µl geladen); sK: schwere Kette des Immunglobulins G; IK: leichte Kette des Immunglobulins G.

Eine Assoziation von LePP5 mit Hsp90 wurde parallel in KoIP-Analysen geprüft (Abbildung 19B). Dafür wurde LePP5 als C-terminale Fusion an ein 3xHA-Epitop in *N. benthamiana* exprimiert. Aus Gesamtproteinextrakten wurde das Fusionsprotein präzipitiert. Für den Nachweis von Hsp90 wurde ein spezifischer Hsp90-Antikörper genutzt, der gegen zytosolisches Hsp90 von Tomate generiert wurde (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Wie die Abbildung 19B zeigt, wurde Hsp90 mit LePP5 koimmunopräzipitiert.

Zusammengefasst zeigten die Analysen, dass LePP5 mit Bs4 und Hsp90 *in planta* interagiert.

3.2.5 Koexpression von LePP5 mit Bs4 und AvrBs4

Die physikalischen Assoziationen von Bs4, LePP5 und Hsp90 weisen auf die Existenz eines Bs4/LePP5/Hsp90-Komplexes hin. Ob LePP5 jedoch auch funktional relevant für die Bs4-vermittelte HR ist, sollte in Überexpressions- und *Silencing*-Studien untersucht werden. Für die Überexpressionsanalysen wurde *LePP5* unter transkriptioneller Kontrolle des *35S*-Promotors zusammen mit *Bs4* (pK7T1WG2_*Bs4*) und *avrBs4* (pK7T1WG2_*avrBs4s227R6*) *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* koexprimiert. Als Kontrollen für die Überexpressionsstudien wurden *35S:NbHsp90-2* und *35S:GFP* mit *Bs4* und *avrBs4* kotransformiert. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Überexpression von GFP keinen Effekt auf die Bs4-HR hat, während die Koexpression von NbHsp90-2 in einer reduzierten Bs4-HR resultiert (Schornack, 2006).

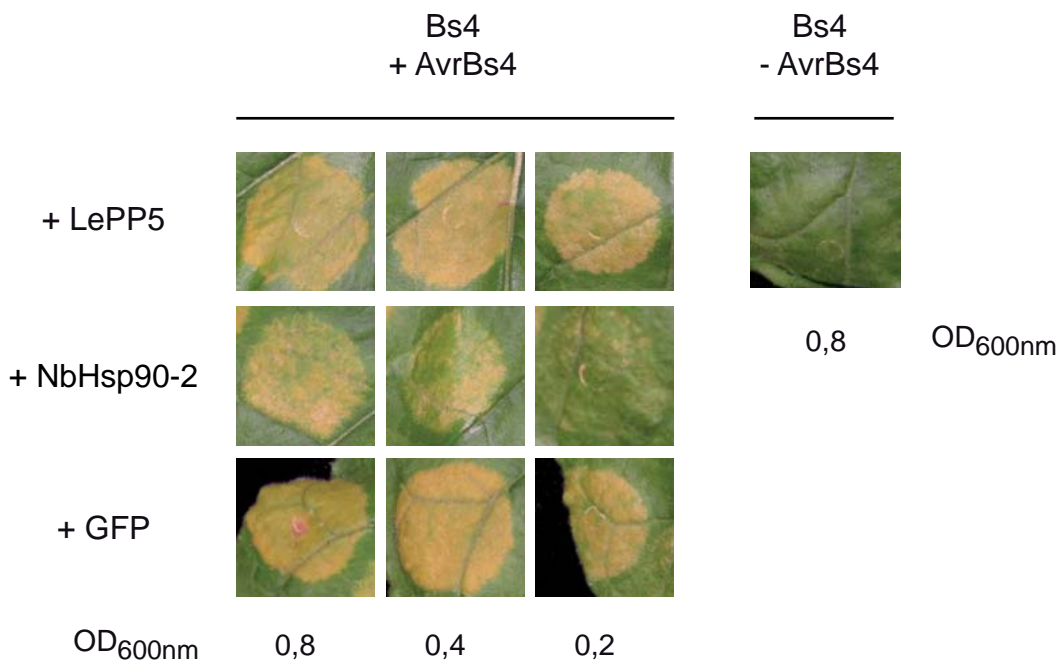


Abbildung 20: Die Koexpression von LePP5 hat keinen detektierbaren Effekt auf die Bs4-HR. Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Koexpression von *35S:LePP5::3xHA*, *35S:GFP::3xHA* bzw. *35S:NbHsp90-2::3xHA* (pGWB14-Konstrukte) zusammen mit *35S:Bs4::TIA1* und *35S:avrBs4s227R6::TIA1* (pK7T1WG2-Konstrukte) in *N. benthamiana*. Die Bakterienstämme wurden in einem Verhältnis von 2:1:1 gemischt und mit einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,2, 0,4 bzw. 0,8 inokuliert. Die Bs4-HRs wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien fotografiert.

Die *Agrobacterium*-Stämme, die das *LePP5*-Überexpressionskonstrukt, das *Bs4*- bzw. *avrBs4s227R6*-Plasmid enthielten, wurden in einem Verhältnis von 2:1:1 gemischt und mit einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,2, 0,4 bzw. 0,8 in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert

(Abbildung 20). Die Sichtung der Phänotypen erfolgte eine Woche nach Inokulation. Für NbHsp90-2 war, wie erwartet, eine reduzierte *Bs4*-HR sichtbar. Makroskopisch waren jedoch keine Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung der *Bs4*-HR nach 35S-Expression von *LePP5* im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle sichtbar (Abbildung 20).

3.2.6 Virus-induziertes Gen-Silencing des *LePP5*-Homologs in *N. benthamiana*

Die *Silencing*-Analysen für *LePP5* erfolgten mit Hilfe des Tabak-Rattlevirus (TRV)-Systems in *N. benthamiana* (siehe 2.30). Dafür wurden drei *LePP5*-Fragmente mit einer Größe von 360 bp, 417 bp bzw. 437 bp amplifiziert (Abbildung 21, Anhang A2). Wie aus der Abbildung 21 hervorgeht, liegen diese Fragmente im Bereich der TPR-Domäne, dem Sequenzabschnitt zwischen TPR- und PP-Domäne bzw. innerhalb der PP-Domäne. Ein Vergleich der publizierten *PP5*-Sequenzen aus Tomate (*LePP5*) und *N. benthamiana* (*NbPP5*) ergab, dass die Sequenzen zu 92,7 % identisch sind und Abschnitte von bis zu 68 bp mit 100%iger Übereinstimmung aufweisen (siehe Anhang A2 und A3). Da bereits gezeigt werden konnte, dass ein Fragment von 23 Nukleotiden, das sequenzidentisch zur Target-mRNA ist, ausreicht, um *in planta* posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) zu induzieren (Thomas *et al.*, 2001), wurde angenommen, dass das *Silencing* von *NbPP5* in *N. benthamiana* mit *LePP5*-Fragmenten möglich sein sollte.

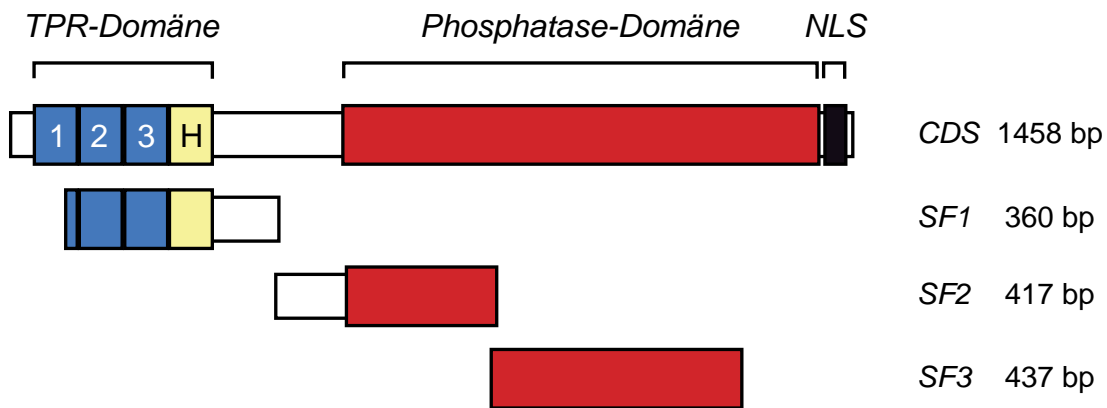


Abbildung 21: Schematische Darstellung der *LePP5*-CDS aus Tomate. Die mit *SF1* (*Silencing*-Fragment 1) bis *SF3* bezeichneten cDNA-Fragmente aus Tomate wurden für das Virus-induzierte *Silencing* von *PP5* in *N. benthamiana* verwendet.

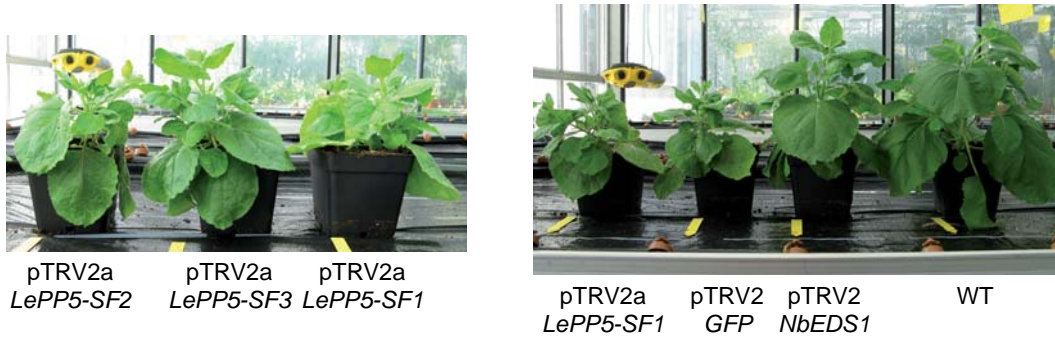
Die *Silencing*-Fragmente (*SF1-SF3*, siehe Abbildung 21) wurden in den Vektor pENTR/D-TOPO kloniert und anschließend in den T-DNA-Vektor pTRV2a (Liu *et al.*, 2002a; P. Römer und Th. Lahaye, unveröffentlicht, Anhang TAB1) rekombiniert. *Agrobacterium*-vermittelt erfolgte eine Transformation der *LePP5-Silencing*-Konstrukte in je vier *N. benthamiana*-Pflanzen (siehe 2.30.1). Parallel wurden weitere *N. benthamiana*-Pflanzen mit einem *PDS*-, einem *GFP*- und einem *EDS1-Silencing*-Konstrukt (pTRV2_*NbPDS*, pTRV2_*GFP* und pTRV2_*NbEDS1*, Anhang TAB1) transformiert. Das *Silencing* von *NbPDS* wurde durchgeführt, um annähernd den Zeitpunkt bestimmen zu können, an dem das *Silencing* von *NbPP5* eintritt. Die VIGS-induzierte Reduktion der *NbPDS*-Transkriptmenge, einer Phytoendesaturase, führt zu einem lichtabhängigen Ausbleichen der Blätter TRV-infizierter Pflanzen (Liu *et al.*, 2002b). Das verwendete *GFP*-Konstrukt diente der Analyse möglicher pleiotroper, virusspezifischer Effekte. Da das *GFP*-Gen aus der Qualle *Aequorea victoria* kein Homolog in *N. benthamiana* hat, kommt es zwar zur Virusassemblierung, nicht jedoch zum *Silencing*. Für *NbEDS1* wurde in vorangegangenen Arbeiten gezeigt, dass eine Reduktion der Transkriptmenge durch VIGS in einer reduzierten oder vollständigen supprimierten *Bs4*-HR resultiert (Schornack *et al.*, 2004). Das *Silencing* von *NbEDS1* diente als Positivkontrolle in den hier durchgeführten Experimenten.

Etwa 14 Tage nach der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation der TRV-Konstrukte wurde beobachtet, dass gegenüber unbehandelten *N. benthamiana*- und *NbEDS1-gesilenceten* Pflanzen alle Pflanzen ein vermindertes Wachstum zeigten. Ansonsten waren makroskopisch

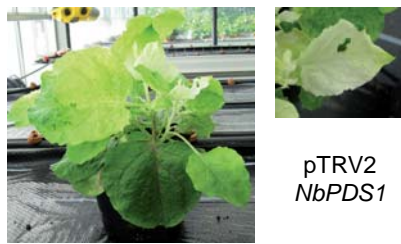
keine morphologischen Veränderungen der *PP5*-, *GFP*- oder *NbEDS1*-*gesilencten* Pflanzen sichtbar (Abbildung 22A). Die jungen Blätter der *PDS*-*gesilencten* Pflanzen zeigten weiße Flecken oder waren bereits nahezu komplett ausgebleicht (Abbildung 22B), was auf ein erfolgreiches *Silencing* der endogenen Phytoendesaturase hinwies. Die *gesilencten* Pflanzen wurden anschließend *Agrobacterium*-vermittelt mit *Bs4* und *avrBs4s227R6* (pK7T1WG2_*Bs4*, pK7T1WG2_*avrBs4s227R6*) bzw. *Bs4* und *GFP* (Haseloff *et al.*, 1997) als Negativkontrolle kotransformiert. Die Koexpression von *Bs4* und *AvrBs4* induzierte in den inokulierten Blättern der unbehandelten, *LePP5*- und *GFP*-*gesilencten* Pflanzen eine HR. Makroskopisch waren dabei keine Unterschiede hinsichtlich der Stärke der *Bs4*-HR festzustellen (Abbildung 22C). Wie erwartet, zeigten die *NbEDS1*-*Silencing*-Pflanzen keine oder eine stark reduzierte HR (Abbildung 22C).

Da keine offensichtlichen Unterschiede in der Ausprägung der *Bs4*-HR zwischen den Kontrollpflanzen und den *PP5*-Pflanzen festgestellt werden konnten, wurde in der Folge überprüft, ob die Transkriptmenge des *PP5*-Homologs in *N. benthamiana* tatsächlich durch VIGS reduziert werden konnte. Dafür wurde Gesamt-RNA aus den unbehandelten und *gesilencten* Pflanzen isoliert und cDNA synthetisiert (siehe 2.10.2 und 2.15). Mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 2.15) wurden die Transkriptmengen von *PP5* und *NbEDS1* bestimmt (Abbildung 23). Zudem wurden für weitere Amplifikationen Oligonukleotide komplementär zu Abschnitten der Virus-RNA1 (pTRV1) verwendet, um die systemische Ausbreitung des TRV in den *Silencing*-Pflanzen nachzuweisen. Der Elongationsfaktor EF-1 α diente als konstitutiver Standard (Abbildung 23).

(A)



(B)



(C)

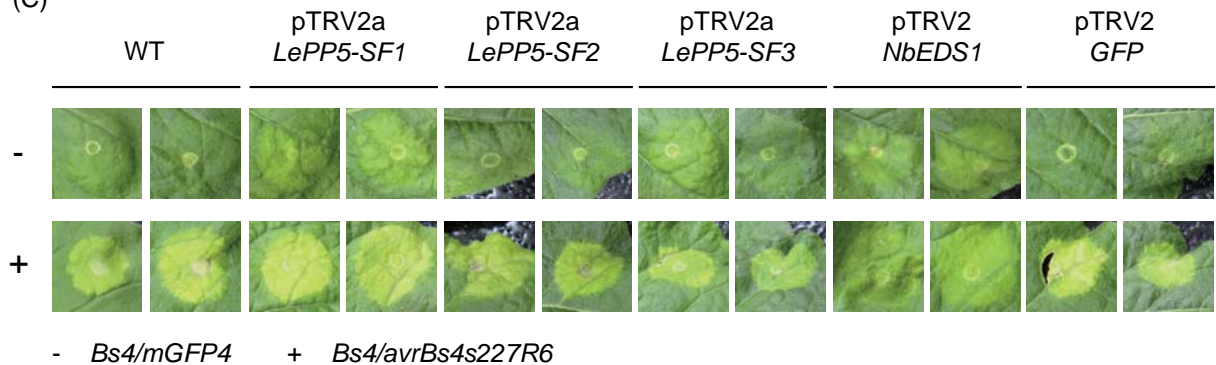


Abbildung 22: Virus-induziertes Gen-Silencing von PP5 in *N. benthamiana*. (A) Phänotypen der PP5-gesilenceten Pflanzen im Vergleich zu einer unbehandelten (Wildtyp, WT), GFP- und EDS1-gesilenceten *N. benthamiana*-Pflanze zwei Wochen nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation von RNA1 (pTRV1) mit *LePP5-SF1*-, *-SF2*-, *-SF3*-, GFP- bzw. *NbEDS1-RNA2* (pTRV2/2a-Konstrukte) (B) Lichtabhängiges Ausbleichen neu gebildeter Blätter einer PDS-gesilenceten Pflanze. (C) Phänotypen der WT- und Silencing-Pflanzen nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation von *Bs4* (*pK7T1WG2_Bs4*) und *avrBs4s227R6* (*pK7T1WG2_avrBs4s227R6*) (+) sowie als Negativkontrolle von *Bs4* und GFP (*35S:mGFP4*, Haseloff *et al.*, 1997) (-). Die Auswertung und fotografische Dokumentation der *Bs4*-HRs erfolgte eine Woche nach Inokulation der Bakterien. Die Abbildung zeigt die Phänotypen von jeweils zwei von insgesamt vier unbehandelten (Wildtyp, WT), *PP5-SF1*-, *-SF2*-, *-SF3*-, GFP- und *NbEDS1*-gesilenceten Pflanzen.

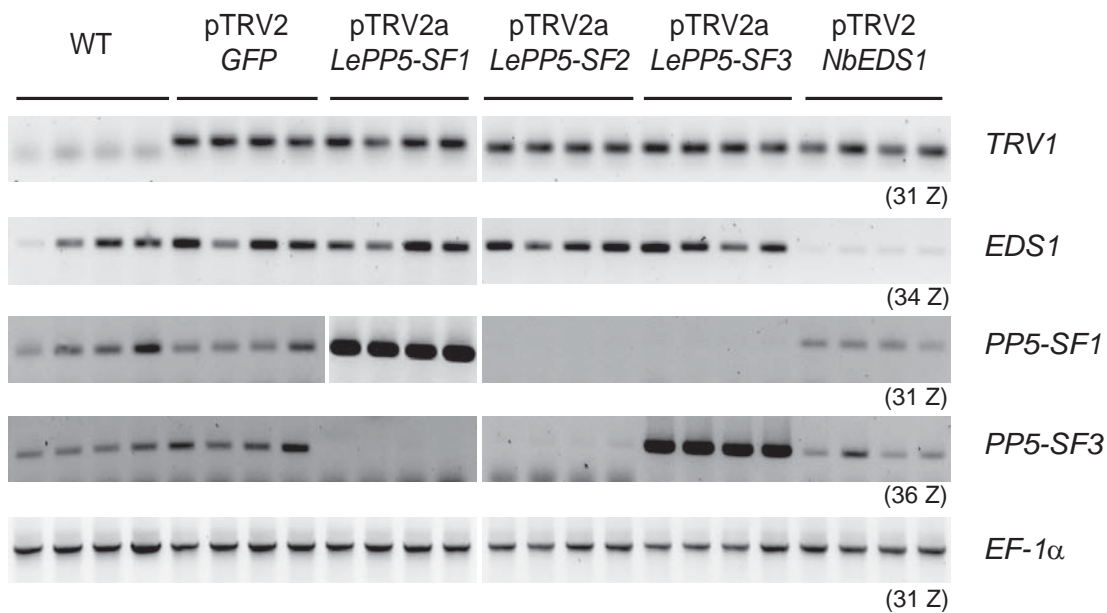


Abbildung 23: Reduktion der Transkriptmenge von *NbPP5* in *PP5*-gesilenceten Pflanzen. Semiquantitative RT-PCR-Analysen zur Bestimmung der Transkriptlevel von *LePP5* und *EDS1* in den WT- und *Silencing*-Pflanzen (je vier Pflanzen) drei Wochen nach Transformation der *Silencing*-Konstrukte *LePP5-SF1*-, *-SF2*-, *-SF3*-, *GFP*- sowie *NbEDS1-RNA2* (pTRV2/2a-Konstrukte) Zur Bestimmung der *NbPP5*-Transkriptlevel wurden Oligonukleotide zur Amplifikation eines 360 bp- (*PP5-SF1*) und eines 437 bp-Fragmentes (*PP5-SF3*), für *NbEDS1* zur Amplifikation eines 385 bp-Fragmentes der 5'-Region der CDS verwendet. Für den Nachweis einer systemischen Ausbreitung des TRV in den *Silencing*-Pflanzen erfolgte die Amplifikation eines 169 bp Fragmentes aus der für das Transportprotein kodierenden Region. Als Kontrolle für den Einsatz annähernd gleicher cDNA-Mengen diente die Amplifikation des Elongationsfaktors *EF-1α*. In Klammern ist jeweils die Zyklenzahl angegeben. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Wie die Abbildung 23 zeigt, konnte der Tabak-Rattlevirus, wie erwartet, in allen *Silencing*-, nicht aber in den unbehandelten Pflanzen nachgewiesen werden. Die semiquantitative RT-PCR-Analysen zeigten zudem, dass die Menge an *NbEDS1*-Transkript in den *EDS1*-gesilenceten Pflanzen reduziert ist (Abbildung 23). Eine deutliche Reduktion der *PP5*-Transkriptmenge war auch für alle *PP5*-gesilenceten Pflanzen sichtbar, unabhängig davon welches Konstrukt für die VIGS-Experimente verwendet wurde. Die starken PCR-Signale, die für die *PP5-SF1*- und *PP5-SF3*-Pflanzen mit den korrespondierenden Oligonukleotidkombinationen erhalten wurden, sind auf die Expression der *Silencing*-Fragmente *SF1* und *SF3* ausgehend vom Tandem-35S-Promotor des verwendeten TRV2a-Konstruktes zurückzuführen (Abbildung 23).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des VIGS-Systems erfolgreich sowohl die *NbPP5*- als auch *NbEDS1*-Transkriptmengen reduziert werden konnte.

Im Gegensatz zu den *EDS1-gesilenceten* Pflanzen zeigten die *PP5*-Pflanzen jedoch keine veränderte *Bs4*-HR. In den *Silencing*-Experimenten konnte somit keine offensichtliche biologische Relevanz von *PP5* für die *Bs4*-vermittelte HR festgestellt werden. Da jedoch kein Antikörper gegen *PP5* zur Verfügung stand, konnte nicht geprüft werden, ob auch die Menge an *PP5*-Protein in den analysierten Pflanzen deutlich reduziert war. Möglich wäre aber auch, dass eine geringe Menge an *PP5* für die Funktion des Proteins in der Zelle noch ausreichend ist.

3.3 Isolierung von Bs4- und AvrBs4-Proteinkomplexen mittels Tandemaffinitätsreinigung

Die Tandemaffinitätsreinigung (*tandem affinity purification*, TAP) in Kombination mit massenspektrometrischen (MS-) Analysen stellt mittlerweile eine weit verbreitete Methode zur Isolierung von Proteinkomplexen und Aufklärung zellulärer Interaktionsnetzwerke dar (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002; Rohila *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2005; Bürckstümmer *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2006; Rohila *et al.*, 2006; Gregan *et al.*, 2007; <http://yeast-complexes.embl.de/>; 09.04.2009). In vorliegender Arbeit wurde angestrebt, Interaktions- bzw. Komplexpartner des Resistenzproteins Bs4 und des bakteriellen Effektorproteins AvrBs4 mittels TAP zu isolieren. Es wurde ein TAP-Epitop (TAPa) verwendet, das aus zwei IgG-Bindedomänen des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD), einer Schnittstelle für die 3C-Protease des humanen Rhinovirus, einem sechsfach Histidin (6xHis)- und neunfach c-Myc (9xc-Myc)-Epitop besteht (Rubio *et al.*, 2005; Abbildung 24).

3.3.1 Funktionale Analyse von Bs4::TAPa in *N. benthamiana*

Für die Erstellung eines Bs4::TAPa-Konstruktes wurde die Bs4-cDNA in den GATEWAY-Vektor pYL436 (Rubio *et al.*, 2005) rekombiniert. Die Funktionalität von Bs4::TAPa wurde durch Koexpression mit einem AvrBs4-Derivat in *N. benthamiana* geprüft. Sieben Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Kotransformation von Bs4::TAPa und *avrBs4Δs227R6::TIA1* (pK7T1WG2_avrBs4Δs227R6) war eine HR im inokulierten Blattgewebe sichtbar (Abbildung 25A). Bs4::TAPa allein induzierte keine HR (Abbildung 25A).

Trotz 35S-Expression konnte Bs4::TAPa in Gesamtproteinextrakten von *N. benthamiana* nicht oder nur in geringen Mengen detektiert werden. Eine Anreicherung von Bs4::TAPa gelang allerdings durch Präzipitation mit IgG-Sepharose-Beads (Abbildung 24B und Abbildung 25B). Im Immunoblot konnte eine Proteinbande erwarteter Molekülmasse (164 kDa: 131 kDa Bs4 + 33 kDa TAPa) detektiert werden. Zusätzliche Banden geringerer Molekülmasse stellen vermutlich Degradationsprodukte dar (Abbildung 25B).

Die Immunoblotanalysen legten nahe, dass Bs4::TAPa nur in geringen Mengen in *N. benthamiana* exprimiert wird.

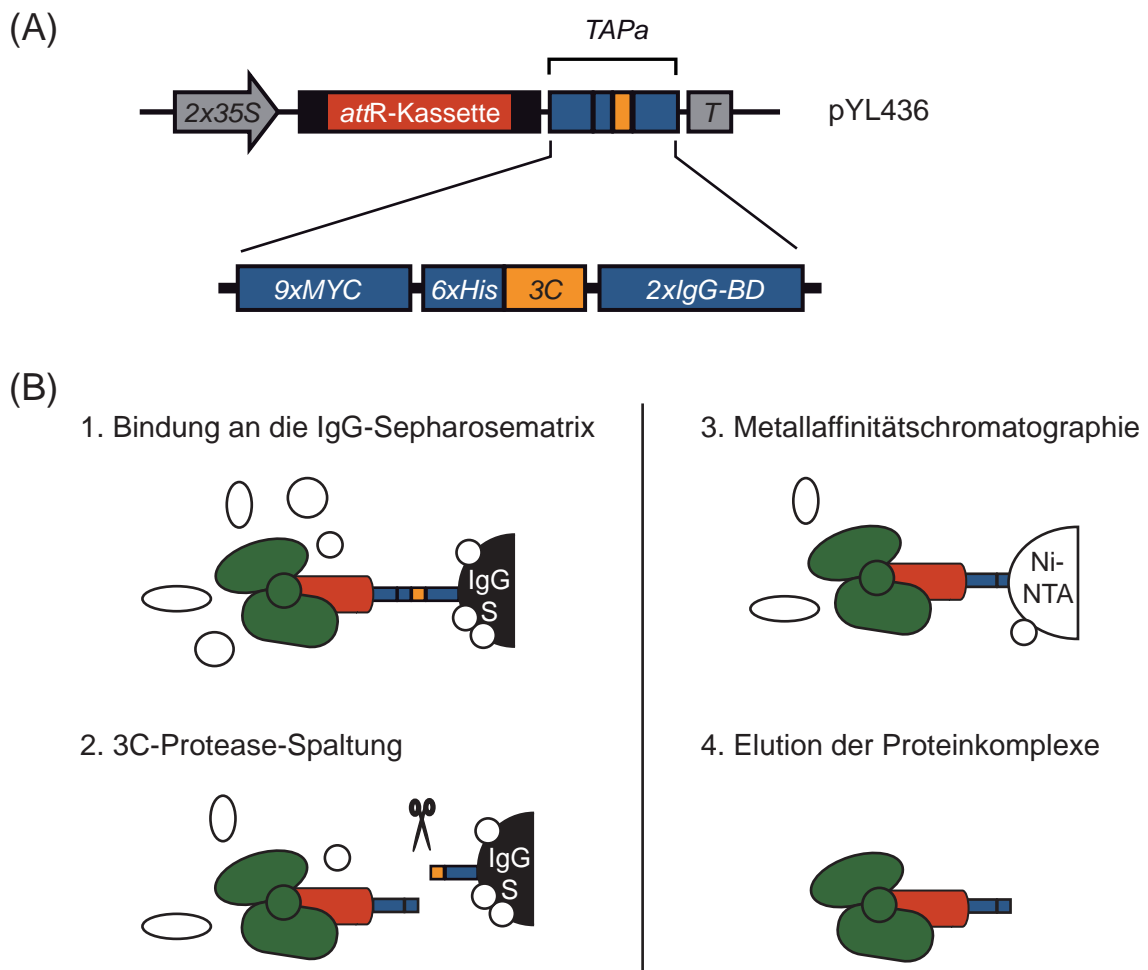


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Tandemaffinitätsreinigung eines TAPa-markierten Proteins. (A) Struktur der TAPa-Expressionskassette. Die Expressionskassette des T-DNA-Vektors pYL436 enthält zwei Kopien des 35S-Promotors (2x35S), eine GATEWAY-attR-Kassette, das TAPa-Epitop und einen Nos-Terminator (T). Das TAPa-Epitop besteht aus einem neunfach c-Myc- (9xc-Myc), einem sechsfach Histidin-Epitop (6xHis), einer 3C-Proteaseschnittstelle (3C) sowie aus zwei Kopien der IgG-Bindedomäne des Proteins A (2xIgG-BD). (B) Die Reinigung des TAPa-markierten Proteins erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt wird der Zellproteinextrakt mit IgG-Sepharose (IgGS) inkubiert. Dabei können Proteine des Zellextraktes u.U. auch unspezifisch mit der Sepharose assoziieren (weiße Kreise) (1). Die Elution TAPa-markierten Proteins erfolgt durch die 3C-Protease (als Schere dargestellt), dabei erfolgt die Spaltung zwischen 2xIgG-BD und 6xHis (2). Das Eluat wird im zweiten Reinigungsschritt mit Ni-NTA-Agarose inkubiert (3). Zielproteine und Komplexpartner werden durch Imidazol von der Matrix eluiert (4). Rot: Zielprotein, blau-orange: TAPa-Epitop, grün: Interaktions- und/oder Komplexpartner des Zielproteins, weiß: nicht interagierende Proteine des Zellextraktes und unspezifisch mit der Matrix assoziierte Proteine.

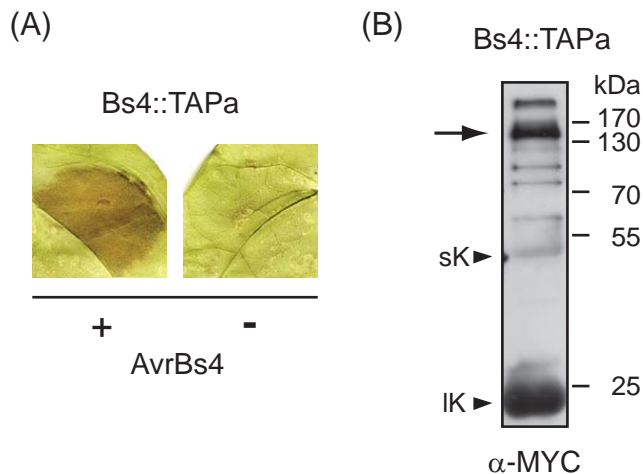


Abbildung 25: Expression von Bs4::TAPa in *N. benthamiana*. (A) Funktionale Analyse. Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *Bs4::TAPa* (pYL436_Bs4) mit (+) und ohne (-) *avrBs4* (pK7T1WG2_avrBs4s227R6) in *N. benthamiana*. Die Blätter wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien in EtOH gebleicht und fotografiert. (B) Proteinnachweis. *Bs4::TAPa* (pYL436_Bs4) wurde nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation aus Gesamtproteinextrakten von *N. benthamiana* präzipitiert und mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α -c-Myc-Antikörpers analysiert. Schwere und leichte Kette (sK und IK) des Immunglobulins G (IgG) sind durch Pfeilspitzen markiert.

3.3.2 Generierung *Bs4::TAPa*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen

Um in Anbetracht des niedrigen Expressionslevels von *Bs4::TAPa* eine größere Menge des Fusionsproteins für eine Tandemaffinitätsreinigung zu erhalten, wurden stabil transgene Pflanzen generiert. *Agrobacterium*-vermittelt wurde *Bs4::TAPa* in *N. benthamiana* transformiert (siehe 2.7). Aus der Transformation gingen 38 potentiell transgene Pflanzen hervor (T₀-Generation). Diese wurden durch Inokulation mit einem *Agrobacterium*-Stamm, der ein *avrBs4*-T-DNA-Konstrukt enthielt (pVS227 (*avrBs4*Δ227), Schornack *et al.*, 2004), auf HR getestet. Reproduzierbar zeigten neun der analysierten Pflanzen eine HR (z.B. *Bs4::TAPa* #8 und *Bs4::TAPa* #13, Abbildung 26).

Aus Zeitgründen konnten diese Pflanzen nicht weiter analysiert werden, stehen jedoch für die Affinitätsreinigung von *Bs4::TAPa* und die Isolierung assoziierter Proteine zur Verfügung.

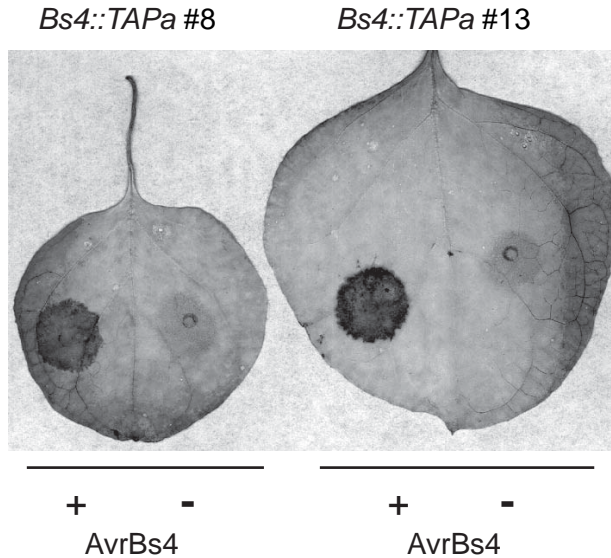


Abbildung 26: Phänotypische Analyse *Bs4::TAPa*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen. Gezeigt sind exemplarisch die Phänotypen der *Bs4::TAPa*-transgenen Pflanzen #8 und #13 (T_0 -Generation) nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation eines (+) *avrBs4*-Derivates (pVS227) bzw. (-) eines leeren T-DNA-Konstruktes (pVB60). Die Blätter wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien in EtOH gebleicht und fotografiert.

3.3.3 Expression von AvrBs4-Derivaten als C-terminale TAPa-Fusionen in *N. benthamiana*

Da pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs4 ebenfalls näheren Aufschluss über die molekularen Mechanismen der *Bs4*-vermittelten Resistenz geben könnten, sollte parallel zur Isolierung von *Bs4*-interagierenden Proteinen eine Identifizierung von AvrBs4-Interaktionspartnern mittels Tandemaffinitätsreinigung versucht werden. Für die Generierung von *avrBs4::TAPa*-Konstrukten wurden die beiden synthetisch erstellten *avrBs4*-Derivate *avrBs4 Δ s227R2* und *avrBs4 Δ s227R6* in den Vektor pYL436 rekombiniert. *avrBs4 Δ s227R2* kodiert nur noch für zwei und *avrBs4 Δ s227R6* für sechs *Repeats* des charakteristischen 34 AS-Motivs von AvrBs4 (S. Schornack und Th. Lahaye, unveröffentlicht). Die synthetischen Derivate haben eine veränderte Nukleotidsequenz, sind jedoch auf Aminosäureebene identisch zu den korrespondierenden Bereichen des bakteriellen AvrBs4-Proteins. *Agrobacterium*-vermittelt wurden die beiden *avrBs4::TAPa*-Konstrukte in *N. benthamiana* mit *Bs4* (pK7T1WG2_*Bs4*) transient kotransformiert. Dies führte in beiden Fällen zur Induktion einer HR im inokulierten Blattgewebe (Abbildung 27A). In Gesamtproteinextrakten konnte jedoch nur AvrBs4 Δ s227R6::TAPa, nicht aber AvrBs4 Δ s227R2::TAPa nachgewiesen werden (Abbildung 27B). Dass AvrBs4 Δ s227R2::TAPa im Immunoblot nicht detektiert werden konnte, kann auf eine schwache Expression zurückzuführen sein, die jedoch ausreichend für die Induktion einer *Bs4*-HR ist.

Basierend auf den Immunoblotanalysen wurde für weiterführende Arbeiten das *avrBs4Δs227R6::TAPa*-Konstrukt gewählt. Ziel war es zunächst, ein Protokoll zur Tandemaffinitätsreinigung des TAPa-Proteins im kleinen Probenmaßstab zu etablieren.

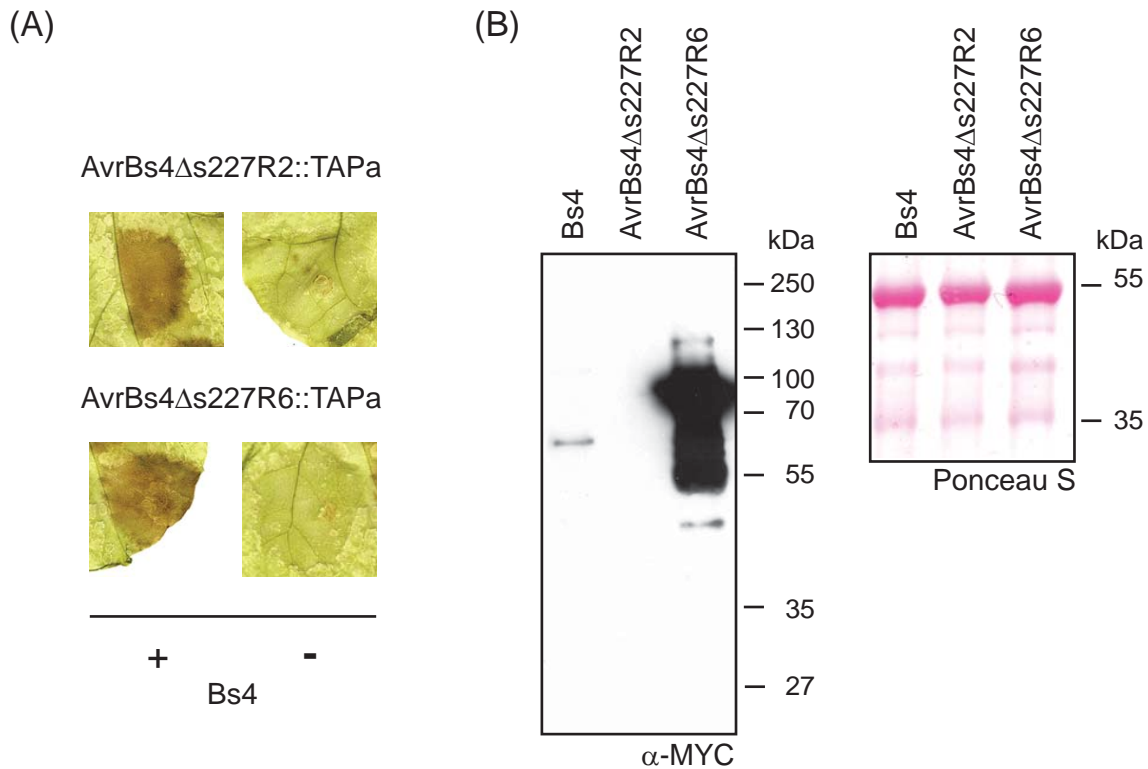


Abbildung 27: Expression von *AvrBs4Δs227R2::TAPa* und *AvrBs4Δs227R6::TAPa* in *N. benthamiana*. (A) Funktionale Analyse. Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *avrBs4Δs227R2::TAPa* bzw. *avrBs4Δs227R6::TAPa* (pYL436-Konstrukte) mit (+) und ohne (-) *Bs4* (pK7T1WG2_ *Bs4*) in *N. benthamiana*. Die Blätter wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien in EtOH gebleicht und fotografiert. (B) Proteinnachweis. Je 20 μ l Gesamtproteinextrakt, isoliert aus *N. benthamiana* drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *avrBs4Δs227R2::TAPa*, *avrBs4Δs227R6::TAPa* bzw. *Bs4::TAPa*, wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α -Myc-Antikörpers analysiert. Erwartete Molekülmassen der TAPa-Fusionsproteine: *Bs4::TAPa* 164 kDa, *AvrBs4Δs227R2::TAPa* 55 kDa und *AvrBs4Δs227R6::TAPa* 69 kDa. Eine Färbung der Blotmembran vor Antikörperinkubation mit Ponceau S zeigt, dass annähernd gleiche Proteinmengen geladen wurden.

3.3.4 Einstufige Reinigung von *AvrBs4Δs227R6::TAPa*

Die Arbeiten von Rubio und Koautoren (2005) dienten als Grundlage für die Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von *AvrBs4Δs227R6::TAPa*. Zunächst wurde die Bindung von *AvrBs4Δs227R6::TAPa* an IgG-Sepharose und die Spaltung des Fusionsproteins geprüft. Dafür wurde drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von *avrBs4Δs227R6::TAPa* Blattmaterial (etwa 41 mg, 450 μ g Gesamtprotein) geerntet,

Gesamtproteinextrakt isoliert und dieser mit IgG-Sepharose inkubiert (siehe 2.24.3, Protokoll 1; Abbildung 24B). Nach Proteolyse und Elution des Fusionsproteins wurden Aliquots des Gesamtproteinextraktes, der IgG-Sepharose und der Elutionsfraktion mittels Immunoblot analysiert (Abbildung 28A). Die Abbildung 28A zeigt, dass AvrBs4 Δ s227R6::TAPa an die IgG-Sepharosematrix adsorbierte (Spur 2) und die proteolytische Spaltung erfolgreich war (Spuren 2 und 3). Allerdings war die Spaltung unvollständig und ein Teil der Spaltprodukte blieb mit der Sepharosematrix assoziiert (Spur 2). Ein Vergleich der Signalstärken zeigt, dass eine nicht unerhebliche Menge an AvrBs4 Δ s227R6::TAPa im ersten Reinigungsschritt verloren ging (Abbildung 28A, Spur 1 und 3). Quantitative Abschätzungen bzgl. des Proteinverlustes sind allerdings schwierig, da der verwendete α -c-Myc-Antikörper (IgG-Antikörper) nicht nur an das c-Myc-Epitop, sondern über sein F_c-Fragment auch an die IgG-Bindedomänen der TAPa-Markierung binden kann. Demnach lässt sich das vollständige AvrBs4 Δ s227R6::TAPa-Protein im Immunoblot vermutlich besser detektieren als das Spaltprodukt. Dies kann zu einer Unterschätzung der eigentlichen Ausbeute an prozessiertem Protein führen.

Neben einer Optimierung des Reinigungsprotokolls hinsichtlich Inkubationszeiten, Proteasemenge oder Elutionsbedingungen erschien die Etablierung einer stabil transgenen Pflanzenlinie sinnvoll (siehe 3.3.5). Verluste an AvrBs4 Δ s227R6::TAPa im ersten Reinigungsschritt könnten durch eine Erhöhung der Ausgangsmengen und der Durchführung mehrerer Reinigungen parallel ausgeglichen werden. Eine transgene Pflanzenlinie ermöglicht dafür die Bearbeitung einer größeren Menge pflanzlichen Ausgangsmaterials.

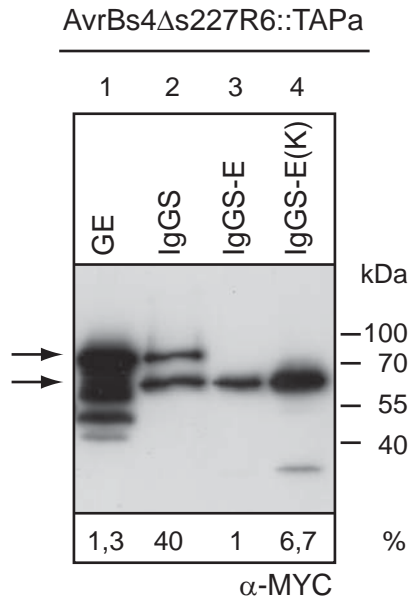


Abbildung 28: Affinitätsreinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab. Einstufige Reinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa aus Gesamtproteinextrakten von *N. benthamiana*. Aliquots des Gesamtproteinextraktes (GE) sowie der Elutionsfraktion vor (IgGS-E) und nach Konzentration der Proteinproben (IgGS-E(K)) wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α-c-Myc-Antikörpers untersucht. Noch mit der Sepharosematrix assoziierte Proteine wurden mit Laemmli-Puffer eluiert (IgGS). Die Menge an geladener Probe in Bezug zur Gesamtmenge der jeweiligen Fraktion ist in % angegeben.

3.3.5 Stabile Transformation einer BY-2-Zellkulturlinie mit *avrBs4Δs227R6::TAPa*

Die stabile Transformation von *avrBs4Δs227R6::TAPa* erfolgte *Agrobacterium*-vermittelt in eine *Nicotiana tabacum*-Suspensionskultur (Bright Yellow No.2, BY-2, Nagata *et al.*, 2004). Die Transformation wurde von Dr. Flora Schuster in Aachen (RWTH Aachen/IME Fraunhofer-Institut; siehe 2.8) durchgeführt. Aus der Transformation gingen 60 potentiell *avrBs4Δs227R6::TAPa*-transgene Kalli hervor, die zunächst mittels PCR auf Anwesenheit des Transgens geprüft wurden. Für 44 der 60 Kalli konnte *avrBs4s227R6* amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Basierend auf Immunoblotanalysen wurden zwei Linien (# 3 und # 4; Abbildung 29A) ausgewählt, für die Suspensionskulturen etabliert wurden. AvrBs4Δs227R6::TAPa konnte mittels Immunoblotanalysen in Gesamtproteinextrakten beider Flüssigkulturen wiederholt detektiert werden.

3.3.6 Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab aus Zellkulturextrakt

Eine Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa aus transgenem Zellkulturmaterial erfolgte zunächst im kleinen Probenmaßstab (siehe 2.24.3, Protokoll 2, 90 mg Zellpellet, etwa 750 µg Gesamtprotein). Nach Bindung und proteolytischer Spaltung von AvrBs4Δs227R6::TAPa von der IgG-Sephrosematrix wurden der Proteinextrakt im zweiten Reinigungsschritt mit Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose inkubiert (Abbildung 24B). Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mittels Immunoblot analysiert (Abbildung 29B). Wie die Abbildung 29B zeigt, konnte eine Bindung des prozessierten AvrBs4Δs227R6::TAPa-Proteins an Ni-NTA detektiert werden (Abbildung 29B, Spur 5). Die Bindung war allerdings nicht quantitativ. Das TAPa-markierte AvrBs4-Derivat war noch im Ni-NTA-Überstand nachweisbar (Abbildung 29B, Spur 4).

Zusammengefasst zeigten die ersten Experimente zur Reinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa, dass sowohl im ersten als auch im zweiten Reinigungsschritt Verluste an AvrBs4Δs227R6::TAPa auftraten. Dennoch könnte die Menge an gereinigtem AvrBs4Δs227R6::TAPa und ko-gereinigter Proteine für eine massenspektrometrische Analyse ausreichend sein. Im Allgemeinen können Proteine, die in mit Coomassie gefärbten Gelen sichtbar sind (Detektionsgrenze 10 – 100 ng), massenspektrometrisch identifiziert werden (Miller *et al.*, 2006). Bislang konnte AvrBs4Δs227R6::TAPa jedoch weder als Vollängenprotein noch als modifiziertes Protein in einem Coomassie gefärbten Gel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies gelang auch nicht, wenn eine größere Menge an transgenem Zellkulturmaterial aufgearbeitet (1,5 g, etwa 12 mg Gesamtprotein; siehe 2.24.3, Protokoll 3) und die Proteine der ersten Elutionsfraktion angereichert wurden (Abbildung 30). Immunoblotanalysen derselben Proben belegten, das AvrBs4Δs227R6::TAPa exprimiert bzw. die Spaltprodukte in den Elutionsfraktionen vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Die Menge an gereinigtem Effektorprotein lag in den bisher untersuchten Proben offenbar noch unter 10 ng.

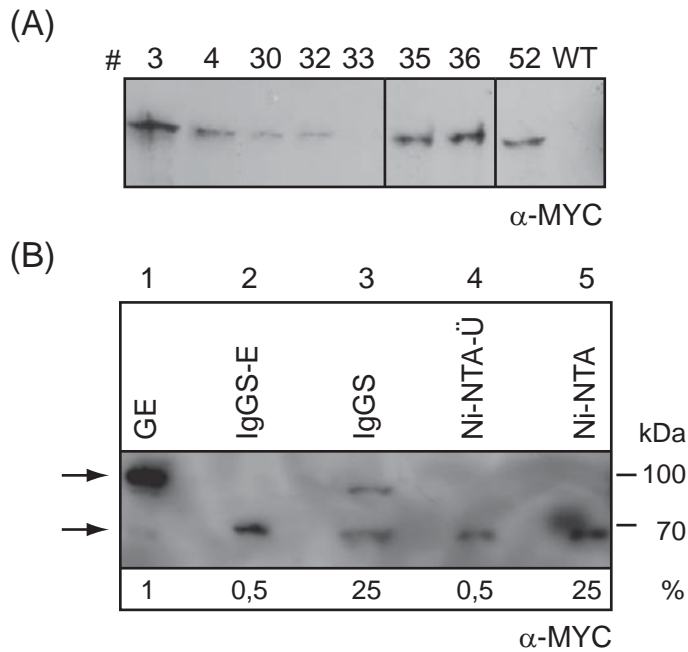


Abbildung 29: Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa im kleinen Probenmaßstab. (A) Expression von AvrBs4Δs227R6::TAPa in transgenen BY-2-Zellkulturen. Gesamtproteinextrakte, isoliert aus Kallusmaterial der *avrBs4Δs227R6::TAPa*-transgenen BY-2-Linien #3, 4, 30, 32, 35, 36 sowie 52, wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α -c-Myc-Antikörpers analysiert. WT: Wildtyp-BY-2-Linie. (B) Tandemaffinitätsreinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa aus Zellkulturextrakt. Aliquots der einzelnen Reinigungs- und Elutionsschritte wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) und Immunoblot unter Verwendung eines α -c-Myc-Antikörpers untersucht: GE: Gesamtproteinextrakt, IgGS-E: durch 3C-Protease-Spaltung von IgG-Sepharosematrix eluierte Proteine, IgGS: IgG-Sepharosematrix und assoziierte Proteine, Ni-NTA-Ü: Überstand nach Inkubation der Proteine mit Ni-NTA, Ni-NTA: Ni-NTA-Agarose und assoziierte Proteine. Die Menge an geladener Probe in Bezug zur Gesamtmenge der jeweiligen Fraktion ist in % angegeben.

Die Analyse der konzentrierten Elutionsproben (Coomassie-Gel) zeigte allerdings, dass offensichtlich hoch abundante Proteine des Gesamtproteinextraktes als Verunreinigungen in die erste Elutionsfraktion verschleppt wurden (Abbildung 30). Auch die schwere und die leichte Kette des Immunglobulins G waren sichtbar (Abbildung 30, Spuren 6 und 7). Diese Verunreinigungen könnten eine Identifizierung spezifischer Interaktions- und/oder Komplexpartner von AvrBs4Δs227R6::TAPa erheblich erschweren. Eine zweistufige Reinigung des TAPa-markierten Effektorproteins sollte daher angestrebt werden. Aus Zeitgründen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Tandemaffinitätsreinigungen von AvrBs4Δs227R6::TAPa durchgeführt werden.

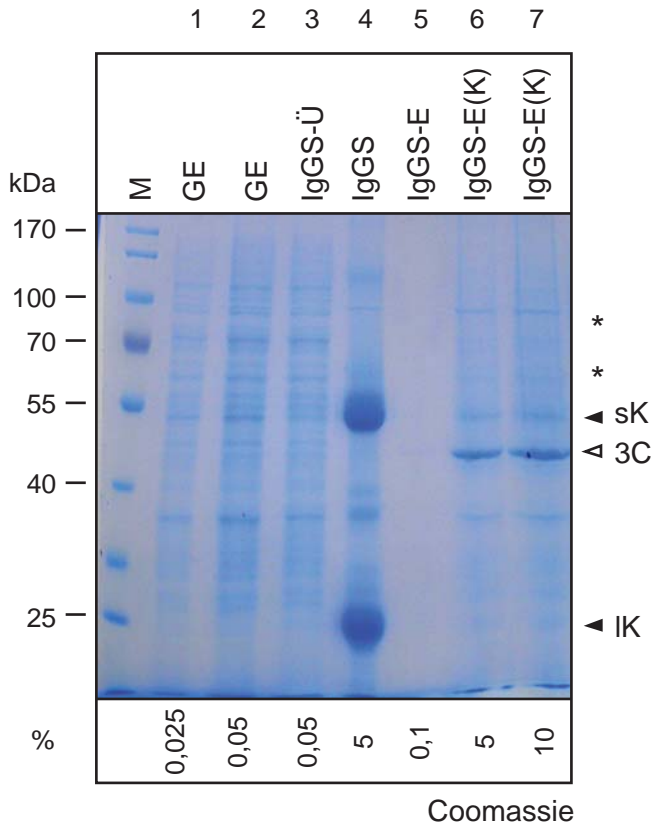


Abbildung 30: Einstufige Reinigung von AvrBs4Δs227R6::TAPa unter Verwendung von transgenem Zellkulturmaterial (BY-2-Linie #4; 1,5 g). Aliquots des Gesamtproteinextraktes (GE), der IgG-Sepharosematrix (IgGS), des Überstandes nach Inkubation des GE mit IgGS (IgGS-Ü) sowie der Elutionsfraktionen vor (IgGS-E) und nach Konzentration (IgGS-E(K)) der Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Schwere (sK) und leichte (lK) Kette des IgG sind mit schwarzen Pfeilen; die 3C-Protease mit einem weißen Pfeil markiert. In Höhe der Sterne wären das Volllängenprotein bzw. das Spaltprodukt von AvrBs4Δs227R6::TAPa zu erwarten. Die Menge an geladener Probe in Bezug zur Gesamtmenge der jeweiligen Fraktion ist in % angegeben.

3.4 Sichtung einer cDNA-Überexpressionsbibliothek *in planta* zur Identifizierung von Signalkomponenten der *Bs4*-vermittelten HR

Analysen zur Funktion des Hitzeschockproteins Hsp90 im Kontext der *Bs4*-vermittelten HR hatten gezeigt, dass eine Überexpression von Hsp90 (*35S:Hsp90*) in einer stark reduzierten *Bs4*-HR resultiert (Schornack, 2006). Möglicherweise könnte auch die Überexpression weiterer regulatorischer Elemente der *Bs4*-Resistenz sichtbare Veränderungen der HR bewirken. Mit dem Ziel solche Elemente zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit cDNA-Fragmente einer Tomaten-Bibliothek unter transkriptioneller Kontrolle des *35S*-Promotors zusammen mit *Bs4* und *avrBs4* in *N. benthamiana* transient koexprimiert (Abbildung 31, Abbildung 32A). cDNAs, deren Expressionen einen Effekt auf die *Bs4*-HR haben, sollten identifiziert werden.

3.4.1 Eine cDNA-Überexpressionsbibliothek aus Tomate

Für den Überexpressionsscreen stand eine Tomaten-cDNA-Bibliothek im GATEWAY-kompatiblen T-DNA-Vektor pK7FWG2 (*35S:attR::GFP*, Karimi *et al.*, 2002) zur Verfügung (A. Strauß und Th. Lahaye, unveröffentlicht; siehe 2.27.1). Die Ausgangsbibliothek (*Entry-cDNA-Bibliothek*), die in pK7FWG2 rekombiniert wurde, wurde aus *Xcv*-infiziertem und nicht infiziertem Blattmaterial des Tomaten-Kultivars Moneymaker (*Bs4*) erstellt, ist normalisiert und für Vollängen-cDNA-Fragmente angereichert (siehe 2.27.1). Für eine Sichtung *in planta* ergeben sich damit zwei wesentliche Vorteile: Zum einen müssen im Vergleich zu nicht normalisierten Bibliotheken weitaus weniger Klone gesichtet werden, um eine bestimmte Anzahl unterschiedlicher Gene zu analysieren, da in der normalisierten Bibliothek die cDNA-Fragmente niedrig exprimierter Gene in ähnlicher Häufigkeit wie die hoch abundanter Transkripte vertreten sein sollten. Zum anderen werden größtenteils Vollängenproteine exprimiert, da die Bibliothek für größere cDNA-Inserts angereichert ist.

Bisher wurden 2210 Plasmide durch Konjugation in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 (pMP90) transferiert und die Klone in Mikrotiterplatten organisiert (siehe 2.27.2). Für 40 zufällig ausgewählte *Agrobacterium*-Klone wurden die cDNA-Insertgrößen mittels Kolonie-PCR bestimmt. Die Amplifikationsprodukte wiesen eine Länge von 300 bp bis 3 kb

auf (Abbildung 31B). Unter Berücksichtigung der Länge der amplifizierten Vektorsequenz (etwa 150 bp) lag die durchschnittliche Insertgröße bei 1,4 kb.

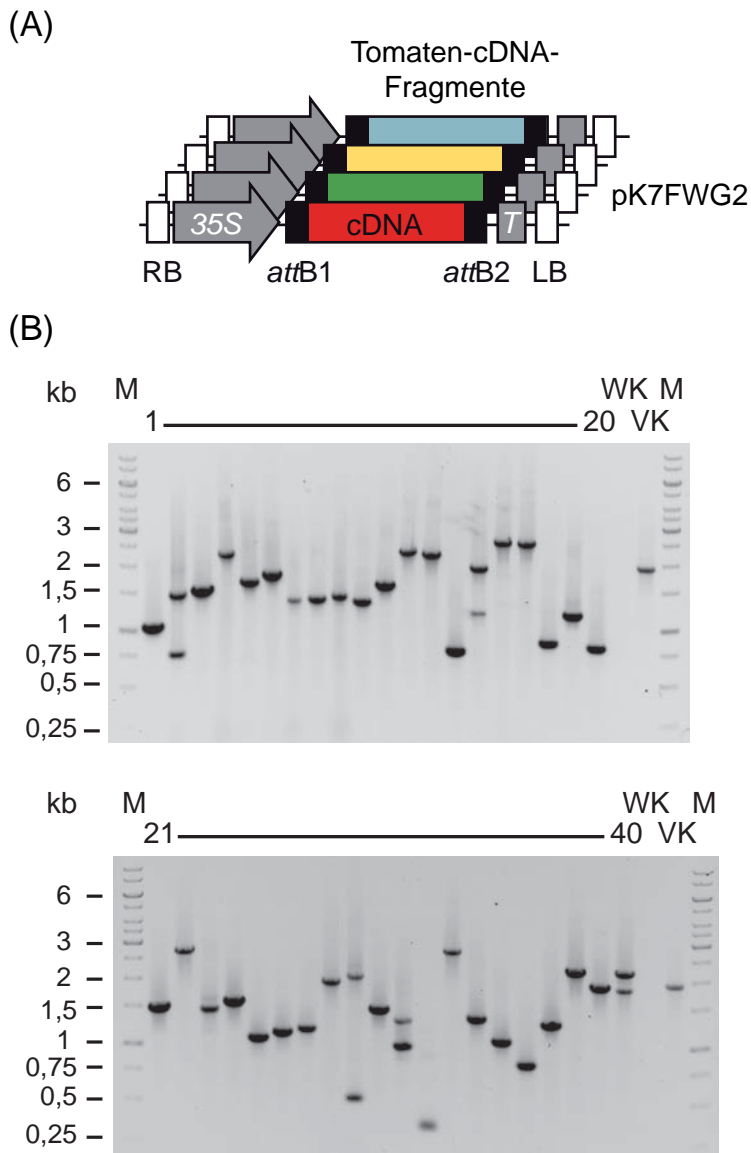


Abbildung 31: PCR-basierte Analyse der Insertgrößen ausgewählter Klone der Überexpressionsbibliothek. (A) Überexpressionsbibliothek. cDNA-Fragmente generiert aus *Xcv*-infiziertem und nicht infiziertem Tomaten-Blattmaterial wurden in den Vektor pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) rekombiniert. Dieser enthält den 35S-Promotor (35S) zur Überexpression der Bibliotheksfragmente *in planta*. RB und LB: *right* und *left border* der T-DNA, attB: *attachment sites B* (25 bp), T: Terminator. (B) PCR-Analyse. Die Amplifikation der Tomaten-cDNA-Fragmente erfolgte mit den Oligonukleotiden pK7FWG2-35S-Fwd und pK7FWG2-Rev, die die attB-Stellen im Vektor flankieren. Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. WK: Wasserkontrolle; VK: Vektorkontrolle (pK7FWG2 mit GATEWAY-attR-Kassette) M: Größenmarker, *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* (Fermentas).

3.4.2 Sichtung der Überexpressionsbibliothek *in planta*

Die Sichtung der Überexpressionsbibliothek erfolgte durch Koexpression der von den Tomaten-cDNA-Fragmenten kodierten Proteine mit Bs4 und AvrBs4 in *N. benthamiana*. Die einzelnen *Agrobacterium*-Klone der Bibliothek wurden dafür mit 35S:Bs4::TIA1- und 35S:avrBs4s227R6::TIA1-enthaltenen *Agrobacterium*-Stämmen (pK7T1WG2_Bs4, pK7T1WG2_avrBs4s227R6) im Verhältnis 2:1:1 gemischt und in *N. benthamiana*-

Pflanzen inokuliert (Abbildung 32A). Die Bibliotheksklone wurden im Überschuss inokuliert, um zu erreichen, dass möglichst alle Zellen, die mit den *Bs4*- und *avrBs4*-Konstrukten kotransformiert wurden, auch das vom jeweiligen Tomaten-cDNA-Fragment kodierte Protein exprimieren. Unter diesen Bedingungen konnte die reduzierte *Bs4*-HR nach Überexpression von NbHsp90-2 (Schornack, 2006) erfolgreich reproduziert werden (Abbildung 32B und C).

Die Inokulationen der Bakterienstämme erfolgten parallel in zwei Pflanzen. Dabei wurden mehrere Bibliotheksklone pro Blatt analysiert (Abbildung 32B, Klone #1944 - 1955). Da die 35S-Expression von GFP keine Auswirkung auf die *Bs4*-HR hat (Schornack, 2006), wurden die Phänotypen nach Überexpression der Bibliotheksklone mit der GFP-Kontrolle verglichen. Im Ergebnis der Sichtung der 2210 Bibliotheksklone konnte für vier Klone (0,18 %) eine verstärkte (Abbildung 32B, z.B. Klon #1946) und für 45 Klone (2 %) eine reduzierte *Bs4*-HR sieben Tage nach Inokulation der Bakterienstämme beobachtet werden. Während die verstärkten HRs reproduziert werden konnten (Abbildung 32C), konnten die reduzierten HRs in wiederholten Experimenten nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Mit vektorspezifischen Oligonukleotiden wurden die cDNA-Inserts der vier Klone (#1946, #2009, #2113 und #2152), die eine verstärkte HR verursachten, amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzanalysen zeigten, dass jeweils zwei der vier Klone (#1946 und #2009 bzw. #2113 und #2152) dieselben cDNA-Inserts enthielten. Vermutlich wurde bei der Organisation der Bibliothek jeweils zweimal derselbe Bakterienklon gepickt.

Zusammengefasst wurden in der Bibliothekssichtung zwei potentielle Komponenten der *Bs4*-vermittelten Resistenz isoliert.

3.4.3 Das cDNA-Insert des Bibliotheksklons #1946 kodiert für den C-Terminus einer Zellulosesynthase (CesA)

BLAST-Analysen ergaben, dass das cDNA-Insert des Klons #1946, das eine Größe von etwa 1,4 kb aufweist, Homologie zu einem Zellulosesynthasegen (im Folgenden bezeichnet als *SlCesA*: *CesA* aus *Solanum lycopersicum*; Nomenklatur nach Delmer, 1999) besitzt. Zellulosesynthasen katalysieren die Synthese von Zellulose aus Uridindiphosphat (UDP)-Glucose und liegen als Hexamerkomplexe (Rosetten) in der Plasmamembran vor. Sie sind essentiell für die Bildung der Primär- und Sekundärwand pflanzlicher Zellen (Arioli *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1999; Somerville *et al.*, 2004; Taylor, 2008; Wang *et al.*, 2008).

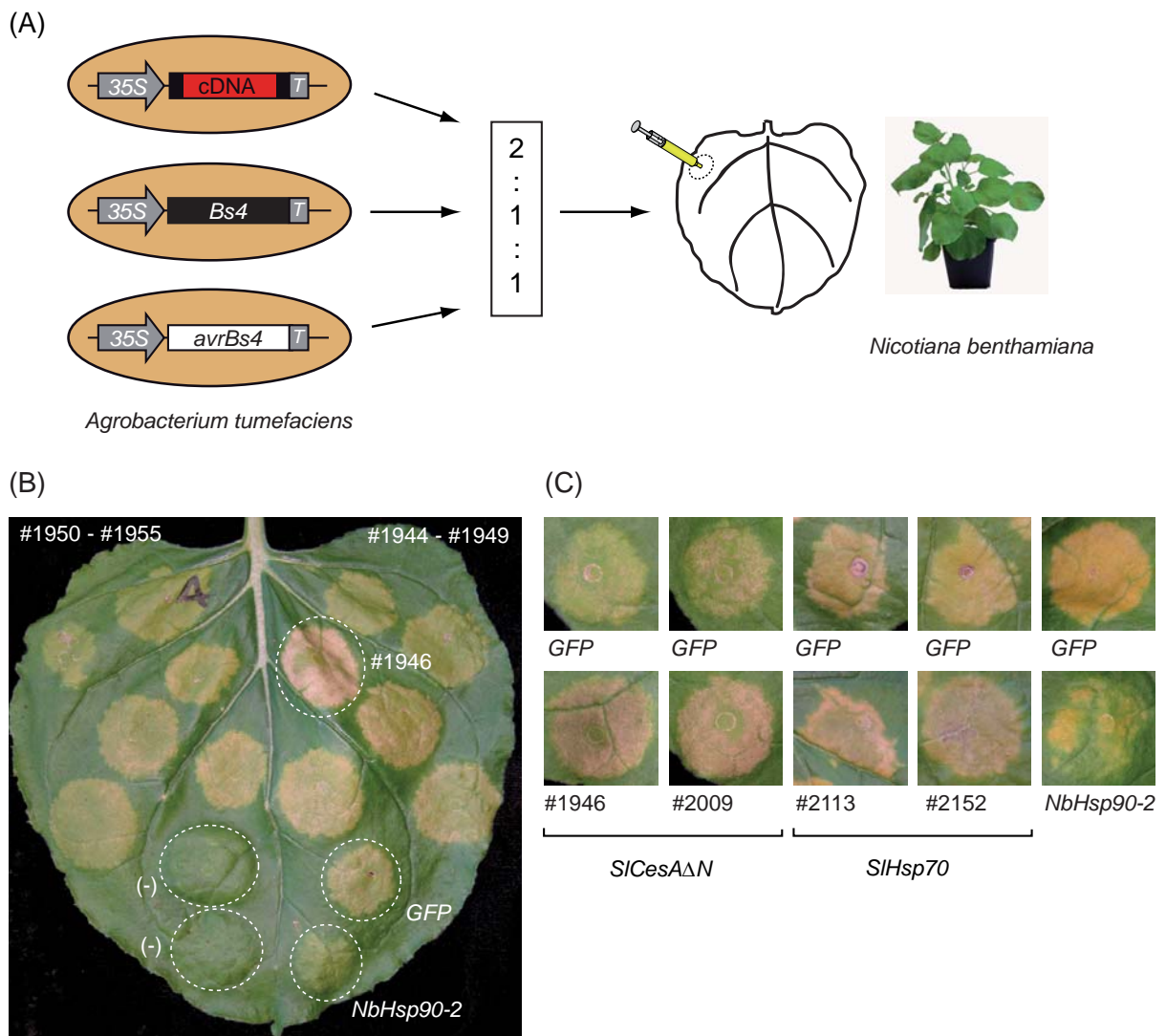


Abbildung 32: Die 35S-Expression von vier Klonen der Tomaten-cDNA-Bibliothek resultiert in einer verstärkten *Bs4*-HR. (A) Schematische Darstellung zur Sichtung der Tomaten-Überexpressionsbibliothek *in planta*. 2210 *Agrobacterium*-Klone wurden jeweils einzeln mit *Bs4*- und *avrBs4*-enthaltenen *Agrobacterium*-Stämmen in *N. benthamiana*-Pflanzen koinokuliert. Vor Inokulation wurden die Bakteriensuspensionen ($OD_{600nm} \sim 0,8$) 2 : 1 : 1 gemischt. (B) Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation der T-DNA-Fragmente der Bibliotheksklone #1944 - #1955 sowie *35S:NbHsp90-2* und *35S:GFP* (pGWB14-Konstrukte) zusammen mit *Bs4* (pK7T1WG2_*Bs4*) und *avrBs4* (pK7T1WG2_*avrBs4s227R6*) in *N. benthamiana*. Die Phänotypen wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien fotografiert. (C) Verstärkte *Bs4*-HRs nach Kotransformation der T-DNA-Fragmente der Klone #1946, #2009, #2113 und #2152. Die *Bs4*-Phänotypen sind im Vergleich zur GFP-Kontrolle des jeweiligen Blattes dargestellt ist. (-): keine HR, Koexpression von je sechs Bibliotheksklonen zusammen mit *Bs4* (ohne *AvrBs4*).

Das isolierte *SICesA*-cDNA-Fragment besitzt unmittelbar nach der *attB1*-Klonierungsstelle ein ATG und im 3'-Bereich ein Stopp-Kodon und eine poly (A)-Sequenz (Abbildung 33A, Anhang A4). In der TIGR- bzw. SGN-Datenbank (www.tigrblast.tigr.org/tgi bzw. www.sgn.cornell.edu/tools/blast) wurden 100 % identische, jedoch zum Teil weitaus längere

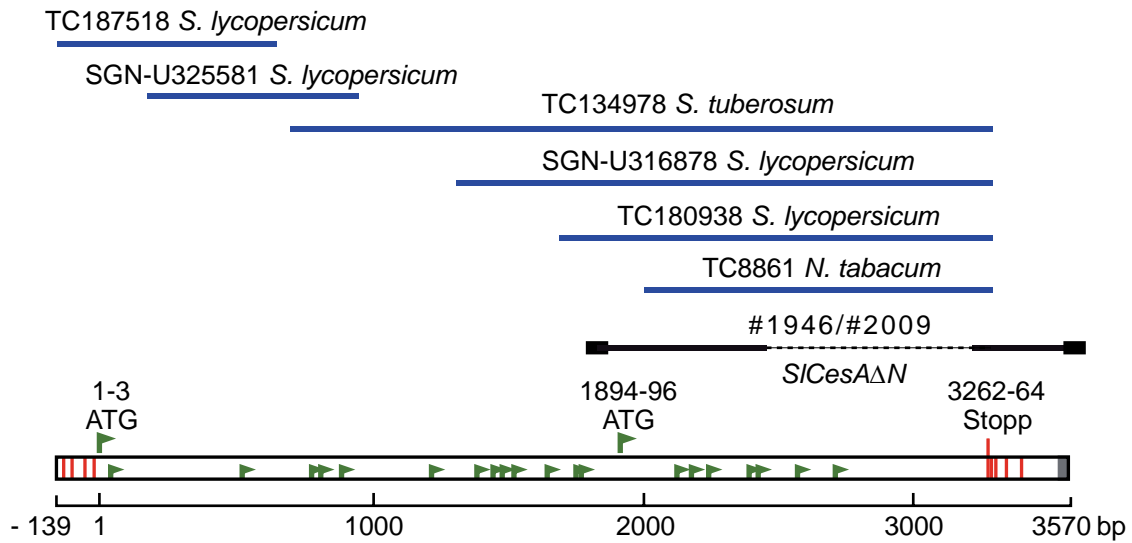
EST-Fragmente aus Tomate (TC180938, SGN-U316878) identifiziert, was darauf hinweist, dass das Bibliotheksfragment nur einen Teil der kodierenden Sequenz von *SICesA* enthält (Abbildung 33A). Des Weiteren wurden Homologe aus *S. tuberosum* (TC134978) und *N. tabacum* (TC8861) und mit der *S. tuberosum*-Sequenz weitere EST-Fragmente für Tomate mit einem möglichen Translationsstart und 5'-UTR gefunden (TC187518, SGN-U325581; Abbildung 33A). Aus den vorliegenden Sequenzen ergibt sich damit für die potentielle, vollständig kodierende Sequenz von *SICesA* aus Tomate eine Länge von 3264 bp (Abbildung 33A). Experimentelle Beweise, dass die 5'-EST-Fragmente aus Tomate (TC187518, SGN-U325581) und das isolierte cDNA-Fragment zu einer gemeinsamen vollständigen kodierenden Sequenz gehören, gibt es bislang jedoch nicht. Das Sequenzalignment legt nahe, dass das isolierte Bibliotheksfragment nur für den C-Terminus einer Zellulosesynthase aus Tomate kodiert. Es wird daher im Folgenden als *SICesA1N* bezeichnet.

3.4.4 Das cDNA-Insert des Bibliotheksklons #2113 kodiert für ein zytoplasmatisches Hsp70-Protein

BLAST-Analysen zeigten, dass das cDNA-Fragment (etwa 2 kb) des Klons #2113 Homologie zu einem Hitzeschockprotein (Hsp70)-kodierenden Gen aufweisen (bezeichnet als *SIHsp70*). In den TIGR- und SGN-Datenbanken wurden zwei Tomaten-EST-Fragmente jeweils mit der vollständigen kodierenden *Hsp70*-Sequenz identifiziert (TC179427, SGN-U312644). Die bisher sequenzierten Regionen der isolierten cDNA (5' etwa 511 bp und 3' 566 bp, siehe Anhang A7) sind 100 % identisch zu den beiden veröffentlichten Sequenzen. Das cDNA-Fragment umfasst zudem flankierende 5'- und 3'-UTR-Bereiche (Anhang A7). Anhand der Sequenzalignments umfasst die vollständige kodierende Sequenz von *SIHsp70* 1950 bp (Abbildung 33B).

Mitglieder der Hsp70-Familie sind involviert in Faltung und Assemblierung neu synthetisierter Proteine, in die Rückfaltung falsch gefalteter und aggregierter Proteine sowie in Translokationsprozesse und in die Regulation von Proteinen. Hsp70-Proteine sind im Zytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in Mitochondrien, Plastiden und Peroxisomen zu finden (Sung *et al.*, 2001; Mayer und Bukau, 2005). Basierend auf einem konserviertem AS-Motiv im C-Terminus (GPKIEEVD-Motiv, siehe Anhang A7; Guy und Li, 1998) des von *SIHsp70* kodierten Hitzeschockproteins ist eine subzelluläre Lokalisation von *SIHsp70* im Zytoplasma wahrscheinlich.

(A) *SICesAΔN*



(B) *SIHsp70*

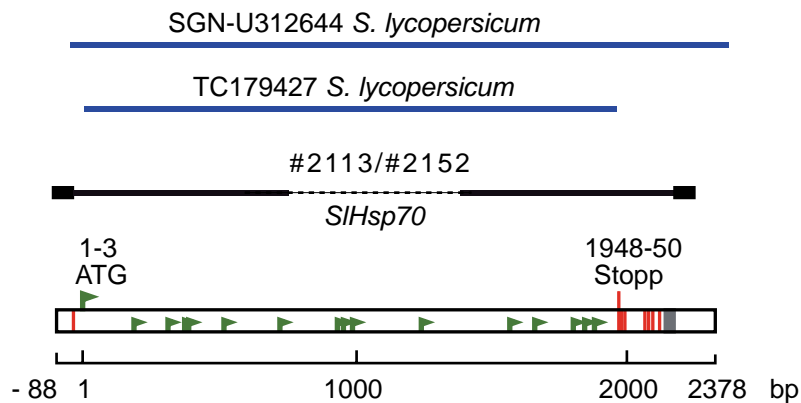


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Sequenzalignments für *SICesAΔN* und *SIHsp70*. (A) Alignment *SICesA*-homologer Gene. Das isolierte cDNA-Fragment (schwarz) der Bibliotheksklone #1946 bzw. #2009 sowie die EST-Fragmente homologer Gene (blau) aus *S. tuberosum*, *N. tabacum* und Tomate (blau) wurden aligniert und sind relativ zueinander dargestellt. (B) Alignment von *Hsp70*-EST-Fragmenten aus Tomate. Das cDNA-Fragment der Bibliotheksklone #2113 und #2152 (schwarz) und die in den Datenbanken identifizierten Tomaten-EST-Fragmente (blau) wurden aligniert und sind relativ zueinander dargestellt. (A) und (B): Grünes Fähnchen: ATG-Kodon, roter Strich: Stopp-Kodon, graues Kästchen: poly (A)-Sequenz, schwarze Kästchen: *attB*-Klonierungsstellen. Bisher nicht sequenzierte Bereiche von *SICesAΔN* und *SIHsp70* sind als gestrichelte Linien dargestellt. Als Referenzen für die in der TIGR- bzw. SGN-Datenbank identifizierten homologen Fragmente sind die TC- bzw. SGN-Bezeichnungen der ESTs angegeben.

3.4.5 Expression von *SICesAΔN* und *SIHsp70* in *N. benthamiana*

Die Überexpression von Genen kann zur Induktion von Zelltodreaktionen führen. In zahlreichen Überexpressionsscreens wurden auf dieser Basis bereits positive und negative Regulatoren pflanzlicher Zelltodreaktionen identifiziert (Karrer *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2004; Nasir *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2007). Um zu prüfen, ob die 35S-Expression von *SICesAΔN* und *SIHsp70* (ohne die Koexpression von *Bs4* und *avrBs4*) zur Induktion von Zelltodreaktionen führt und daraus die beobachteten, verstärkten *Bs4*-HRs resultieren, wurden 35S:*SICesAΔN* (Klon #2009) und 35S:*SIHsp70* (Klon #2152) sowie als Kontrollen 35S:*NbHsp90-2* und 35S:*GFP* *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* transformiert. Sieben Tage nach Transformation des 35S:*SIHsp70*-Konstruktes war eine Nekrose im inokulierten Blattgewebe sichtbar (Abbildung 34A), während die Expression des 35S:*SICesAΔN*-Konstruktes zu morphologischen Veränderungen des Blattes führte (Abbildung 34A). Das inokulierte Gewebe erschien körnig, aufgelockert. Der Phänotyp war allerdings nur im Durchlicht deutlich sichtbar (Abbildung 34A). Die 35S-Expression von *GFP* bzw. *NbHsp90-2* hingegen resultierte in keinen sichtbar veränderten Blattphänotypen (Abbildung 34A). Die Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die beobachteten, verstärkten *Bs4*-HRs (Abbildung 32C) wahrscheinlich auf additive Effekte, im Falle von 35S:*SIHsp70* auf die zusätzliche Induktion von Zelltodreaktionen zurückzuführen ist.

Einige Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von Genen posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) (Hamilton und Baulcombe, 1999) hervorrufen kann. Eine partielle oder vollständige Suppression des PTGS konnte jedoch durch die Koexpression viraler *Silencing*-Inhibitoren wie HcPro und p19 erzielt werden (Voinnet *et al.*, 1998; Johansen und Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2003). Um zu prüfen, ob die beobachteten *Hsp70*- bzw. *CesA*-Phänotypen durch *Silencing*-Effekte bedingt sein könnten, wurden 35S:*SICesAΔN* (Klon #2009) bzw. 35S:*SIHsp70* (Klon #2152) zusammen mit dem *Silencing*-Inhibitor 35S:*p19* (Voinnet *et al.*, 2003) *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* kotransformiert. Sieben Tage nach Inokulation der Bakterienstämme waren weder die morphologischen Veränderungen im Blattgewebe (*SICesAΔN*) noch eine Nekrose (*SIHsp70*) sichtbar (Abbildung 34B). Demnach sind die zuvor beobachteten Phänotypen sehr wahrscheinlich auf das *Silencing* homologer *CesA*- und *Hsp70*-Endogene in *N. benthamiana* zurückzuführen.

Eine weiterführende Analyse von *SICesA* und *SIHsp70* sowie die Sichtung weiterer Klone der Überexpressionsbibliothek konnte aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht fortgesetzt werden.

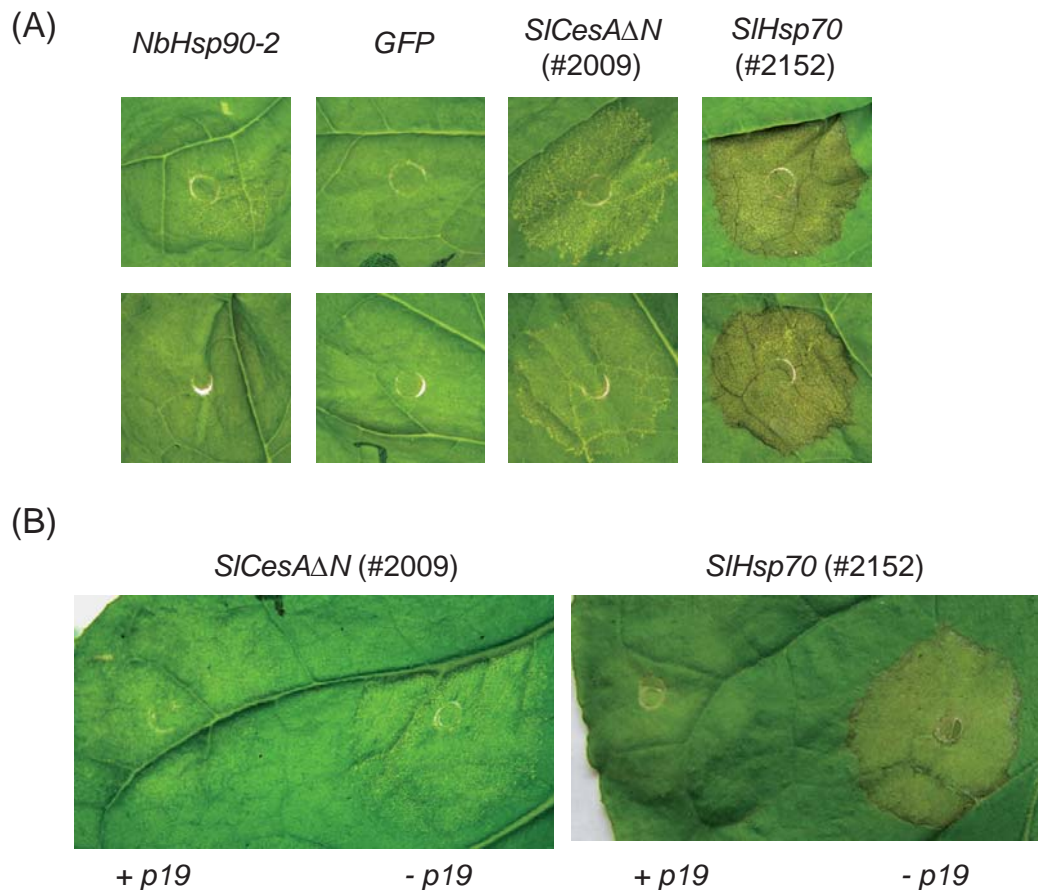


Abbildung 34: Phänotypen nach transientscher Transformation von 35S:*SICesAΔN* und 35S:*SIHsp70* in *N. benthamiana*. (A) Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von 35S:*SICesAΔN*, 35S:*Hsp70* (pK7FWG2-Konstrukte) sowie 35S:*NbHsp90-2* und 35S:*GFP* (pGWB14-Konstrukte) in *N. benthamiana*. Die Phänotypen wurden eine Woche nach Inokulation der Bakterien fotografiert (im Durchlicht). (B) Phänotypen nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation von 35S:*SICesAΔN* und 35S:*Hsp70* (pK7FWG2-Konstrukte) in *N. benthamiana* mit (+) und ohne (-) Kotransformation des *Silencing*-Inhibitors 35S:*p19* (pBin6Ip19). Die Phänotypen wurden eine Woche Inokulation der Bakterien fotografiert (für *SICesAΔN* im Durchlicht).

4. Diskussion

4.1 Identifizierung und Analyse Bs4-assoziiierter Proteine

4.1.1 SlcpHsp70 assoziiert mit dem Resistenzprotein Bs4

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Hsp90 als molekulares Chaperon in die Reifung und Stabilisierung von NBS-LRR-Proteinen involviert ist (Schulze-Lefert, 2004; Seo *et al.*, 2008) (siehe 1.9). Mutationen bzw. *Silencing* von *Hsp90* führten zu reduzierten NBS-LRR-Proteinmengen und zu abgeschwächten Resistenzreaktionen bzw. zum Verlust der HR (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003b; Schornack, 2006). Aktuelle Arbeiten weisen jedoch daraufhin, dass neben Hsp90 auch Hsp70-Proteine in NBS-LRR-Protein-vermittelte Immunantworten involviert sein können (Noël *et al.*, 2007; Shirasu, 2008). So resultiert die Überexpression eines zytoplasmatischen und kernlokalisierten Hsp70-Proteins in *Arabidopsis* in einem partiellen Verlust der *RPM1*- und *RPS4*-vermittelten Resistenz (Noël *et al.*, 2007). Die genaue Funktion von Hsp70 in der NBS-LRR-Protein-vermittelten Immunabwehr ist allerdings noch unbekannt und eine Interaktion zwischen einem NBS-LRR-Protein und Hsp70 wurde bislang nicht gezeigt (Shirasu, 2008). Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit in einer Hefe-Dihybrid-Sichtung ein Hsp70-Protein, SlcpHsp70, als Interaktor der Bs4-TIR-Domäne isoliert werden (Abbildung 9, Tabelle 7). KoIP-Analysen bestätigten eine Assoziation beider Proteinen. SlcpHsp70 konnte mit Bs4 aus pflanzlichen Proteinextrakten koimmunopräzipitiert werden (Abbildung 12).

Allerdings war SlcpHsp70 auch in der Elutionsfraktion der GFP-Kontrolle nachweisbar (Abbildung 12), was auf eine unspezifische Bindung von SlcpHsp70 an GFP hinweist. In der Tat interagieren Hsp70-Proteine unspezifisch mit nahezu allen ungefalteten Proteinen (Erbse *et al.*, 2004). Demnach könnte der Nachweis von SlcpHsp70 in der Bs4-Elutionsfraktion auch auf eine unspezifische Bindung des Hitzeschockproteins an Bs4 zurückzuführen sein. Für eine spezifische Assoziation von SlcpHsp70 und Bs4 spricht jedoch, dass in Anbetracht des deutlich niedrigeren Expressionslevels von Bs4 (im Vergleich zu GFP) ein signifikant stärkeres SlcpHsp70-Signal in der Bs4- als in der GFP-Elutionsfraktion detektiert werden konnte (Abbildung 12).

Um die biologische Relevanz einer Assoziation von Bs4 und SlcpHsp70 zu hinterfragen, wurden in vorliegender Arbeit Überexpressions- und *Silencing*-Analysen in *N. benthamiana* durchgeführt. Doch weder die Überexpression von *SlcpHsp70* noch das Virus-induzierte Gen-*Silencing* (VIGS) des *SlcpHsp70*-Homologen in *N. benthamiana* führte zu sichtbaren Veränderungen der Bs4-HR (Abbildung 13A und B). Demnach spielt SlcpHsp70 keine wesentliche Rolle für die Bs4-HR. Negative Daten haben jedoch grundsätzlich nur eine begrenzte Aussagekraft. So bleibt zu zeigen, dass SlcpHsp70 tatsächlich überexprimiert bzw. die *cpHsp70*-Transkriptmengen mittels VIGS reduziert wurden. Dies kann mit Hilfe von Expressions- bzw. Transkriptanalysen erfolgen (Tabelle 8). Der Phänotyp der *cpHsp70-gesilencten* Pflanzen legte allerdings nahe, dass zumindest das Virus-induzierte *Silencing* des *SlcpHsp70*-Homologen in *N. benthamiana* erfolgreich war. Die jungen Blätter der *cpHsp70-gesilencten* Pflanzen waren nahezu weiß oder zeigten einen grün-weißen Mosaikphänotyp (Abbildung 13C). Ein ganz ähnlicher Phänotyp, allerdings weniger stark ausgeprägt, wurde bereits für *cpHsp70-Silencing*-Pflanzen beschrieben (Krenz, 2007). Vermutlich führt das *Silencing* von *cpHsp70* zu Störungen in der Chlorophyllbiosynthese.

Zahlreiche *Silencing*-Studien weisen daraufhin, dass mittels VIGS das Targettranskript nicht vollständig „eliminiert“ werden kann (Reduktion auf 22-5 % des WT-Levels) (Liu *et al.*, 2002a; Hiriart *et al.*, 2003; R. Szczesny und Th. Lahaye, unveröffentlicht). Es ist daher nicht auszuschließen, dass geringe Mengen an *SlcpHsp70*-Transkript bzw. SlcpHsp70-Protein in den *Silencing*-Pflanzen noch vorhanden und diese für eine Funktion des Hitzeschockproteins im Kontext der Bs4-HR ausreichend waren. Aussagekräftiger wäre in diesem Zusammenhang die Analyse einer *cpHsp70*-Nullmutante. Eine entsprechende Tomatenlinie würde hierbei nicht nur die Analyse von *cpHsp70* im Rahmen der Bs4-HR, sondern auch im Kontext der Bs4-Resistenz ermöglichen (Tabelle 8). Allerdings lässt der Phänotyp der *cpHsp70-gesilencten* Pflanzen vermuten (Abbildung 13C), dass *cpHsp70*-Nullmutanten möglicherweise letal sind.

SlcpHsp70 gehört zur großen Familie der Hsp70-Proteine, deren Mitglieder in pflanzlichen Zellen im Zytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum (ER), in Plastiden oder in den Mitochondrien zu finden sind und eine konservierte Struktur und Funktionsmechanismus aufweisen (Sung *et al.*, 2001; Erbse *et al.*, 2004; Mayer und Bukau, 2005). Interessant ist, dass die interagierende Region in SlcpHsp70 im N-Terminus des Hitzeschockproteins liegt, der die konservierte ATPase-Domäne enthält (Anhang A1) (Erbse *et al.*, 2004). In Anbetracht

der hohen Konservierung zwischen den Familienmitgliedern, des bisher fehlenden Nachweises einer funktionalen Relevanz von SlcpHsp70 für die *Bs4*-HR und der Tatsache, dass *Bs4* im Zytoplasma (Schornack, 2006), SlcpHsp70 hingegen in Chloroplasten lokalisiert (Abbildung 11), stellt sich die Frage, ob *Bs4* nicht mit zytoplasmatischen Mitgliedern der Hsp70-Familie interagiert und ob eventuell diesen eine spezifische Funktion in der *Bs4*-HR zukommt. Mittels KoIP-Analysen könnte eine Interaktion von *Bs4* mit verschiedenen Hsp70-Isoformen und deren Relevanz für die *Bs4*-vermittelte HR in genetischen Analysen (Tabelle 8) geprüft werden. Zudem könnten BiFC-Analysen für den Nachweis einer Interaktion *in planta* durchgeführt werden (Tabelle 9).

4.1.2 Interaktionsstudien und funktionale Analysen lieferten keine Hinweise auf eine Involvierung von SIEP1 und SIPRR in die *Bs4*-vermittelte HR

Mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems wurde als weiterer Interaktor der *Bs4*-TIR-Domäne SIEP1 gesichtet, ein Protein, das Homologie zu COG4, einer Komponente des oligomeren Golgikomplexes (Lupashin und Sztul, 2005) und zu Proteinen mit *pentatricopeptide repeat* (PPR)-ähnlichen Motiven aufweist. Während COG4 an Transportvorgängen zwischen ER und Golgi-Apparat beteiligt ist (Lupashin und Sztul, 2005), wurde für PPR-Proteine gezeigt, dass diese an RNA binden und in posttranskriptionelle Prozesse in Mitochondrien und Chloroplasten involviert sind (Lurin *et al.*, 2004; Delannoy *et al.*, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien zeigten allerdings, dass SIEP1::GFP im Zytoplasma pflanzlicher Zellen lokalisiert (Abbildung 11), was gegen eine Funktion von SIEP1 als COG4-Protein oder als RNA-Bindeprotein in Plastiden oder Mitochondrien spricht. Auch das zu SIEP1 ähnlichste Protein in *Arabidopsis* weist eine COG4-Domäne und Ähnlichkeiten zu PPR-Proteinen auf (At4G01400; Protein F3D13.1). Eine Funktion dieses Proteins ist bislang nicht beschrieben.

Für die *Arabidopsis*-Homologen des *Bs4*-NBS-Interaktors SIPRR hingegen ist bekannt, dass diese in Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Diese sogenannten *Pseudo-Response Regulatoren* sind jedoch bislang nur als Komponenten der circadianen Uhr beschrieben, die an der Transmission von Lichtsignalen und an der Kontrolle circadianer Reaktionen beteiligt sind (Strayer *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2002; Mas *et al.*, 2003; Mizuno, 2004; Farre *et al.*, 2005). C-terminal weisen PRR-Proteine ein sogenanntes CCT (CONSTANS, CONSTANS-*like* und TOC1)-Motiv auf, das ein Kernlokalisierungssignal enthält (Strayer *et al.*, 2000;

Mizuno und Nakamichi, 2005; Anhang A1). In der Tat konnte SIPRR als GFP-Fusionsprotein im Zellkern detektiert werden, während ein Deletionsderivat ohne CCT-Motiv (SIPRR Δ C) ausschließlich im Zytoplasma lokalisierte (Abbildung 11). Auf Basis der Lokalisation wies SIPRR Eigenschaften klassischer PRR-Proteine auf.

Eine Koimmunopräzipitation von SIEP1 bzw. SIPRR Δ C mit Bs4 war allerdings nicht nachweisbar (Abbildung 12). Zudem resultierte weder die Überexpression noch das TRV-vermittelte *Silencing* von *SIEP1* bzw. *SIPRR* in sichtbaren Veränderungen der *Bs4*-HR (Abbildung 13A und B). Dies legt nahe, dass beide Proteine als falsch-positive Interaktoren von Bs4 in den Hefe-Dihybrid-Sichtungen isoliert wurden. Allerdings kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse eine Interaktion bzw. eine funktionale Relevanz beider Proteine für die *Bs4*-Abwehr nicht völlig ausgeschlossen werden. So ist möglich, dass die KoIP-Analysen nicht sensitiv genug waren, um eine schwache bzw. transiente Interaktion zwischen SIEP1 bzw. SIPRR Δ C und Bs4 zu detektieren. Für SIPRR Δ C zeigten die Immunoblotanalysen zudem, dass neben dem Fusionsprotein erwarteter Größe zahlreiche Produkte kleinerer Molekülmasse im Gesamtproteinextrakt auftraten, die möglicherweise Degradationsprodukte darstellen (Abbildung 12). Demnach könnte der fehlende Nachweis einer Koimmunopräzipitation von SIPRR Δ C mit Bs4 auch auf den Abbau des Proteins bzw. auf eine zu geringe Menge an SIPRR Δ C-Volllängenprotein im Reaktionsansatz zurückzuführen sein. Eine Interaktion von Bs4 mit SIEP1 bzw. SIPRR Δ C sollte in weiteren Experimenten, z.B. mittels GST-*pull-down*- oder BiFC-Analysen, geprüft werden (Tabelle 9). Vor allem die BiFC-Analysen sollten es erlauben, mögliche transiente Interaktion nachzuweisen, da hier die Interaktionspartner in einem fluoreszierenden Komplex arretiert werden (Magliery *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2006; Tabelle 9).

Im Zusammenhang mit den funktionalen Analysen bleibt wiederum zu zeigen, dass die *35S*-Expression von *SIEP1* bzw. *SIPRR* in einer Überexpression beider Proteine resultierte bzw. dass die Transkriptmengen der *SIEP1*- bzw. *SIPRR*-Homologen in *N. benthamiana* durch VIGS reduziert werden konnten. Dass in *N. benthamiana* sowohl ein *SIEP1*- als auch ein *SIPRR*-Homolog vorhanden ist, zeigten PCR-Analysen. Mit Oligonukleotiden, abgeleitet aus beiden Tomaten-Genen, konnten homologe Fragmente aus *N. benthamiana* amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Experimente zur Klärung einer möglichen Relevanz von SIEP1 bzw. SIPRR für die *Bs4*-Abwehr sollten angeschlossen werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Weitere notwendige bzw. mögliche Experimente zur Analyse der biologischen Relevanz von Bs4-Interaktoren	
Überexpression	VIGS
Nachweis der Überexpression des pot. Interaktors durch Vergleich der Proteinmengen in <i>N. benthamiana</i> unter WT-Bedingungen und nach 35S-Expression spezifischer Antikörper notwendig	Analyse der Transkriptmenge mittels RT-PCR- oder <i>real time</i> -PCR-Analysen Nachweis der Reduktion der Proteinmengen durch Immunoblotanalyse spezifischer Antikörper notwendig
Weiterführende Experimente für Überexpressions- und VIGS-Analysen	
Quantifizierung der <i>Bs4</i> -HR durch Messung des Elektrolytverlustes, einer physiologischen Reaktion, die mit der HR assoziiert ist (Baker <i>et al.</i> , 1991), im Zeitverlauf Evtl. vorhandene aber makroskopisch nicht sichtbare Unterschiede in der HR (Interaktor vs. GFP-Kontrolle) sollten damit detektiert werden können	
Quantifizierung von möglichen Überexpressions- bzw. <i>Silencing</i> -Effekten auf die <i>Bs4</i> -vermittelte Resistenz mittels Wachstumskurven Etablierung eines geeigneten Pathosystems für <i>N. benthamiana</i> notwendig: in Anlehnung an die Arbeiten von Leister <i>et al.</i> (2005); Sohn <i>et al.</i> (2007) und Rentel <i>et al.</i> (2008) könnte ein AvrBs4-Fusionsprotein generiert werden, das mittels <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> in <i>Bs4</i> -transgene <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen transloziert werden kann	
Analyse von Mutanten	
Sichtung einer TILLING (<i>Targeting Induced Local Lesions</i> ,-)Bibliothek (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. M82) (McCallum <i>et al.</i> , 2000a, b; Menda <i>et al.</i> , 2004) bzw. Transposon-Bibliothek (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom) (Meissner <i>et al.</i> , 1997; Meissner <i>et al.</i> , 2000) nach Tomatenpflanzen mit Punktmutationen, Deletionen bzw. Insertionen im Gen des jeweiligen <i>Bs4</i> -Interaktors Analyse der <i>Bs4</i> -Resistenz: Durchführung von Wachstumskurven unter Verwendung von AvrBs4-translozierenden <i>Xcv</i> -Stämmen <u>Vorteil:</u> Analyse im nativen System möglich <u>Nachteile:</u> Identifizierung der Mutanten aufwendig; Bibliotheken weniger umfangreich im Vergleich zu <i>Arabidopsis</i> -Bibliotheken, weitere Mutationen (TILLING-Bibliothek) im genomischen Hintergrund können Charakterisierung des Interaktors erschweren	
Analyse von Mutanten	
Sichtung von <i>Arabidopsis</i> -Linien mit T-DNA-Insertion im Gen des jeweiligen <i>Bs4</i> -Interaktors Analyse und Quantifizierung der <i>Bs4</i> -HR (s.o.): Etablierung eines transienten bzw. stabil induzierbaren Expressionssystems für <i>Bs4</i> und AvrBs4 notwendig <u>Vorteil:</u> Umfangreiche T-DNA-Bibliotheken/zahlreiche T-DNA-Mutanten sind verfügbar (<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>) <u>Nachteil:</u> Bislang ist ungeklärt, ob die Koexpression von <i>Bs4</i> und AvrBs4 in <i>Arabidopsis</i> eine HR induziert (die <i>Agrobacterium</i> -vermittelte transiente Koexpression lieferte bislang keine aussagekräftigen Ergebnisse)	

Tabelle 9: Komplementäre Ansätze zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen		
Experiment	Vorteile	Nachteile
GST-pull down		
Fusion der potentiellen Interaktionspartner an GST (Glutathion S-Transferase) - bzw. MBP (Maltose-Bindeprotein)-Epitop Reinigung der Fusionsproteine aus <i>E.coli</i> Kopräzipitation der Proteine weist auf Interaktion hin	Reinigung der Proteine in großen Mengen möglich erfolgreicher Interaktionsnachweis weist auf direkte Assoziation zwischen beiden Proteinen hin	<i>in vitro</i> -Ansatz: Nachweis von Interaktionen möglich, die <i>in vivo</i> aufgrund unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation der Proteine nicht stattfinden nur direkte Interaktionen nachweisbar in <i>E.coli</i> translatierte Proteine erhalten evtl. wichtige posttranslationale Modifikationen nicht
BiFC (Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation)		
Fusion der potentiellen Interaktionspartner an N- bzw. C-terminale Hälfte von YFP Koexpression der Fusionsproteine <i>in planta</i> YFP-Fluoreszenz weist auf Interaktion der Proteine hin	<i>in vivo</i> -Analyse Nachweis transienter Interaktionen möglich, da Fusionsproteine bei Interaktion in einem fluoreszierenden Komplex arretiert werden (Magliery <i>et al.</i> , 2005; Bhat <i>et al.</i> , 2006) posttranslationale Modifikation der Proteine unter <i>in vivo</i> -Bedingungen	Interaktionsnachweis abhängig von Expressionslevel der Fusionsproteine <i>in planta</i> keine eindeutigen Rückschlüsse möglich, ob Interaktion direkt oder indirekt erfolgt Position der YFP-Hälften ist kritisch für den Nachweis der Interaktion (Bracha-Drori <i>et al.</i> , 2004) 35S-Expression der Konstrukte kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Caplan <i>et al.</i> , 2008) (Daten nicht gezeigt)

4.1.3 Die Serin/Threonin-Phosphatase 5 interagiert mit Bs4 im Zytoplasma pflanzlicher Zellen

Vorangegangene Arbeiten legten nahe, dass die Serin/Threonin-Phosphatase 5 (PP5) eine generelle Komponente von NBS-LRR-Proteinkomplexen ist, wobei PP5 direkt mit dem R-Protein assoziiert (Liu *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Unter diesem Aspekt wurde in vorliegender Arbeit untersucht, ob PP5 ebenfalls mit Bs4 interagiert. Mittels KoIP konnte gezeigt werden, dass LePP5 mit Bs4 assoziiert, wobei die Interaktion – wie auch

für die NBS-LRR-Proteine I-2 aus Tomate und N aus Tabak – über die LRR-Domäne erfolgt (Abbildung 17, Abbildung 18; Liu *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005).

Für I-2 wurde mittels Hefe-Dihybrid- und GST-*pull down*-Experimenten zudem gezeigt, dass die physikalische Assoziation zwischen der LRR-Domäne und LePP5 über dessen *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne vermittelt wird (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Für Bs4 gelang dieser Nachweis mittels KoIP bislang nicht. Das entsprechende LePP5-TPR-Fusionsprotein (TPR::3xHA) konnte zwar im Gesamtproteinextrakt detektiert werden, im Vergleich zum LePP5-Volllängenprotein war der Expressionslevel jedoch deutlich geringer (Abbildung 18) und damit möglicherweise nicht ausreichend für den Interaktionsnachweis mit Bs4. Für eine weitere Charakterisierung der Bs4-LePP5-Interaktion sollten die TPR-Domäne von LePP5 und Bs4-LRR in *E.coli* exprimiert, gereinigt und GST-*pull down*-Analysen (Tabelle 9) durchgeführt werden.

Die Assoziation von Bs4 und dem Volllängenprotein LePP5 konnte indes in BiFC-Analysen bestätigt werden (Abbildung 19). Die BiFC-Analysen zeigten erstmals, dass die Interaktion zwischen einem NBS-LRR-Protein und der Serin/Threonin-Phosphatase 5 tatsächlich auch *in planta* erfolgt. Bs4 und LePP5 interagierten im Zytoplasma pflanzlicher Zellen (Abbildung 19). Auffällig war allerdings, dass die aus der Interaktion resultierenden YFP-Signale sehr schwach waren (Abbildung 19). In ihrer Intensität waren sie jedoch mit denen vergleichbar, die nach Koexpression von Bs4 und dem Hitzeschockprotein Hsp90, einem bereits bekannten Interaktor von Bs4 (Schornack, 2006), erhalten wurden (Abbildung 19). Die schwachen Fluoreszenzsignale könnten auf eine schwache bzw. transiente Interaktion zwischen Bs4 und seinen Interaktionspartnern LePP5 und Hsp90 hinweisen. Der Nachweis transienter Interaktionen ist in BiFC-Analysen möglich, da es bei Interaktion der an YN- und YC-fusionierten Proteine zu einer irreversiblen Assemblierung des YFP-Chromophors kommt (Magliery *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2006). Die Interaktionspartner werden dadurch in einem fluoreszierenden Komplex arretiert. Allerdings könnten schwache Fluoreszenzsignale auch darauf zurückzuführen sein, dass einer der beiden Interaktionspartner nur in geringer Menge in *N. benthamiana* vorliegt, wodurch nur wenige fluoreszierende Komplexe und damit schwache YFP-Signale erhalten werden. Immunoblotanalysen zeigten, dass im Gegensatz zu den Hsp90- und LePP5-Fusionen YC::Bs4 und Bs4::YN in Gesamtproteinextrakten nicht detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Bs4-Mengen lagen anscheinend unter der Nachweisgrenze des für die Immunodetektion verwendeten Antikörpers. Dass beide Fusionsproteine jedoch prinzipiell exprimiert werden, bestätigten Koexpressionen mit

AvrBs4. Diese resultierten für beide Bs4-Fusionsproteine in der Induktion einer HR in *N. benthamiana*-Pflanzen (Schornack, 2006; Daten nicht gezeigt). Es erscheint nahe liegend, dass die schwachen Fluoreszenzsignale in den BiFC-Analysen durch die geringen Mengen an YC::Bs4 bzw. Bs4::YN bedingt sind und nicht auf eine transiente Interaktion zwischen Bs4 und LePP5 hinweisen.

De la Fuente van Bentem und Koautoren (2005) verwendeten LePP5 als Köderprotein, um in einer Hefe-Dihybrid-Sichtung weitere Komponenten eines I-2-Proteinkomplexes zu identifizieren. Dabei wurde Hsp90 als Interaktionspartner von LePP5 isoliert. GST-pull down-Experimente und die Koreinigung von Hsp90 mit GST-TPR aus Tomaten-Proteinextrakten bestätigten die physikalische Assoziation beider Proteine (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). In vorliegender Arbeit konnte mittels BiFC-Analysen gezeigt werden, dass *in planta* die Interaktion zwischen Hsp90 und LePP5 im Zytoplasma erfolgt (Abbildung 19). Da auch Bs4 und LePP5 bzw. Bs4 und Hsp90 im Zytoplasma miteinander interagieren (Abbildung 19) (Schornack, 2006), ist denkbar, dass Bs4, Hsp90 und LePP5 in einem gemeinsamen Komplex in der Zelle vorliegen. Auch die NBS-LRR-Proteine I-2, N und RPM1 interagieren sowohl mit PP5 als auch mit zytosolischem Hsp90 (Hubert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005), was nahe legt, dass NBS-LRR-Proteine generell in einem Komplex mit der Serin/Threonin-Phosphatase 5 und dem Hitzeschockprotein Hsp90 vorkommen. Der experimentelle Nachweis eines NBS-LRR/Hsp90/PP5-Komplexes steht allerdings noch aus. Es könnte versucht werden, diesen Komplex beispielsweise mittels Affinitätsreinigung zu isolieren und die Komplexpartner mittels Massenspektrometrie zu identifizieren.

Wie bereits beschrieben, zeigten zahlreiche Studien, dass Hsp90 in die Reifung und Stabilisierung von NBS-LRR-Proteine involviert ist und diese in Abwesenheit des Avr-Proteins in einem inaktiven, erkenntnis-kompetenten Zustand hält (Schulze-Lefert, 2004; Seo *et al.*, 2008) (siehe 1.9). Doch welche Rolle spielt PP5 innerhalb eines NBS-LRR-Komplexes?

Aus Säugern ist bekannt, dass PP5 in Hsp90-Heterokomplexen modulierend z.B. in die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors (GR) und von Proteinkinasen eingreift (Wang *et al.*, 2007; Hinds und Sanchez, 2008; Vaughan *et al.*, 2008). Es wurde diskutiert, dass der GR selbst Targetprotein der Serin/Threonin-Phosphatase 5 ist (Wang *et al.*, 2007; Hinds und

Sanchez, 2008), während die Aktivierung der Proteinkinasen durch die reversiblen Phosphorylierungen eines weiteren Komplexpartners, des Hsp90-Ko-Chaperons Cdc37, reguliert wird (Vaughan *et al.*, 2008). Untersuchungen in Hefe zeigten kürzlich, dass auch Hsp90 ein Targetprotein des PP5-Homologen Ppt1 sein kann (Wandinger *et al.*, 2006). In *ppt1*-Nullmutanten ist Hsp90 hyperphosphoryliert und die Reifung und Aktivierung von Hsp90-„Klienten“ (GR-, Luciferasereporter, MAPKKK Ste11) ist beeinträchtigt (Wandinger *et al.*, 2006). In Analogie war denkbar, dass die pflanzliche PP5 eine regulatorische Funktion innerhalb des NBS-LRR/Hsp90/PP5-Komplexes ausübt, indem sie die Aktivität des NBS-LRR-Proteins und/oder des Hsp90-Proteins durch Dephosphorylierung kontrolliert.

Um die biologische Relevanz von PP5 für die *Bs4*-vermittelte Abwehr zu adressieren, wurden Überexpressions- bzw. *Silencing*-Analysen in *N. benthamiana* durchgeführt. Doch weder die 35S-Expression von *PP5* noch die Reduktion des *PP5*-Transkripts durch VIGS führte zu makroskopisch sichtbaren Veränderungen der *Bs4*-HR (Abbildung 20 und Abbildung 22). Für I-2 wurde ähnliches beobachtet. Auch hier hatte die Überexpression von *PP5* keinen Effekt auf die von der Autoaktivatormutante I-2 D495V-induzierte Zelltodreaktion und das *Silencing* von *PP5* resultierte nicht in einer veränderten HR (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005).

Da kein spezifischer Antikörper gegen PP5 zur Verfügung stand, konnten in der vorliegenden Arbeit die *PP5*-Expressionslevel unter WT-Bedingungen und nach 35S-Expression nicht vergleichend analysiert werden, d.h., es konnte bislang nicht gezeigt werden, dass die 35S-Expression von *PP5* auch in einer signifikant erhöhten *PP5*-Gesamtproteinmenge resultierte. Im Rahmen der VIGS-Experimente zeigten RT-PCR-Analysen indes, dass die *PP5*-Transkriptmengen der *PP5-Silencing*-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen deutlich reduziert waren (Abbildung 23; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Geringe Mengen noch vorhandenen *PP5*-Transkripts bzw. *PP5*-Proteins könnten allerdings noch ausreichend für eine Funktion der Phosphatase im Rahmen der *Bs4*- bzw. *I-2*-vermittelten HR gewesen sein.

Interessanterweise konnten de la Fuente van Bentem und Koautoren (2005) eine *pp5*-Nullmutante in einer *Arabidopsis*-T-DNA-Bibliothek identifizieren. Da auch das CC-NBS-LRR-Protein *RPM1* aus *Arabidopsis* mit *PP5* interagiert, untersuchten sie die Effekte des *pp5-knockouts* auf die *RPM1*-vermittelte Resistenz. Dabei zeigte sich, dass T-DNA-Mutante und Wildtyp im gleichen Maße resistent gegenüber einem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*-Stamm sind, der das korrespondierende Effektorprotein *AvrRpm1* exprimiert (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Die *PP5-Silencing*-Studien und die Analyse der *pp5*-

Nullmutante legen nahe, dass PP5 für die *I-2-*, *Bs4-* und für die *RPM1*-vermittelte Abwehr keine wesentliche Rolle spielt.

Interessant ist auch, dass die *Arabidopsis pp5*-Nullmutante keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen aufweist (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005). Auch eine Deletion des *PP5*-Homologen *Ppt1* in Hefe hatte keine phänotypischen Auswirkungen (Chen *et al.*, 1994; Wandinger *et al.*, 2006). Demnach scheinen *PP5* bzw. *Ppt1* unter normalen Bedingungen in Pflanzen- und Hefezellen generell entbehrlich zu sein. Möglich ist, dass funktionale Redundanz vorliegt, d.h., dass eine Deletion von *PP5* oder eine Reduktion des *PP5*-Transkript- bzw. Proteinlevels (z.B. durch VIGS) von anderen Serin/Threonin-Phosphatasen kompensiert wird. Im Falle des NBS-LRR/Hsp90-Komplex sollte dies bedeuten, dass neben *PP5* noch weitere Serin/Threonin-Phosphatasen mit dem Komplex assoziiert sind oder alternativ die Position von *PP5* im Komplex einnehmen können. Allerdings weisen andere bekannte Serin/Threonin-Phosphatasen keine TPR-Domäne auf (Cohen, 1997). Eine Interaktion mit den Komplexpartnern müsste über andere Proteindomänen, über strukturelle oder katalytische Regionen vermittelt werden. In Säugerzellen wurde bereits gezeigt, dass der Östrogenrezeptor ER α nicht nur mit *PP5* sondern auch mit einer weiteren Serin/Threonin-Phosphatase (*PP2A*) der PPP-Familie, zu der auch *PP5* gehört (Cohen, 1997), interagiert (Lu *et al.*, 2003a; Ikeda *et al.*, 2004). Beide Phosphatasen dephosphorylierten den Rezeptor am selben Serin-Rest und die Bindung von *PP2A* erfolgte über die katalytische Untereinheit der Phosphatase (Lu *et al.*, 2003a; Ikeda *et al.*, 2004). Auch Wang und Koautoren (2007) spekulierten, dass neben *PP5* eine weitere Serin/Threonin-Phosphatase an der Dephosphorylierung des Glucocorticoidrezeptors beteiligt ist. Während das *Silencing* von *PP5* in einer verstärkten Phosphorylierung des Rezeptors an den Serin-Resten S203 und S226 resultierte, führte eine pharmakologische Inhibition der Aktivität mehrerer PPP-Phosphatasen zusätzlich zu einer verstärkten basalen Phosphorylierung an S211 (Wang *et al.*, 2007). Um nun zu prüfen, ob NBS-LRR-Proteine wie *Bs4* ebenfalls mit weiteren Serin/Threonin-Phosphatasen im Komplex assoziiert sind, könnten einzelne Mitglieder der PPP-Familie kloniert und z.B. in KoIP-Studien mit *Bs4* getestet werden. Alternativ könnte die Isolierung und Charakterisierung von *Bs4*-Proteinkomplexen aus Tomate oder nach transienter Transformation auch aus *N. benthamiana* mittels Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie zeigen, ob andere Phosphatasen außer *PP5* als Komplexpartner auftreten. Zudem bleibt zu zeigen, welche Proteine des Komplexes Targetproteine der Serin/Threonin-Phosphatase(n) sind. In *in vitro*-Analysen könnten

zunächst z.B. Bs4 und Hsp90 heterolog exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Kinase in Gegenwart von [γ - 32 P]-markiertem ATP phosphoryliert werden. Nach Zugabe von gereinigten PP5 sollte eine Dephosphorylierung der markierten Proteine nachweisbar sein, falls diese Targetproteine der Serin/Threonin-Phosphatase sind.

Aus tierischen Zellen ist bekannt, dass neben PP5 noch weitere Proteine mit TPR-Domäne in Hsp90-Komplexen vorkommen. Diese sogenannten Immunophilinen (FK506-bindende Proteine (FKBP) und Cyclosporin-bindende Proteine (Cyclophiline)) sind Rezeptoren für Immunsuppressiva, die eine Peptidyl-Prolyl-*cis*-/*trans*-Isomeraseaktivität aufweisen (Pratt *et al.*, 2004; Riggs *et al.*, 2004). PP5 selbst bindet FK506 nur mit geringer Affinität und weist eine geringe Sequenzhomologie zur Region der Isomerase-domäne auf, besitzt jedoch keine Isomeraseaktivität (Silverstein *et al.*, 1997; Riggs *et al.*, 2004). Die Immunophilinen und PP5 konkurrieren jedoch miteinander um die Bindung an Hsp90 und damit um den Zugang zu Hsp90-Heterokomplexen (Pratt *et al.*, 2004). Auch in Pflanzen sind Immunophilin-Homologe bekannt, die mit Hsp90 über ihre TPR-Domäne interagieren (Owens-Grillo *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1998; Kamphausen *et al.*, 2002). Denkbar wäre demnach, dass in den *pp5-knockout*-Mutanten bzw. *PP5-Silencing*-Pflanzen Immunophilinen den Verlust bzw. reduzierten PP5-Level kompensieren können und demzufolge keine Effekte auf die *I-2*-vermittelte Resistenz bzw. *I-2*- und *Bs4*-induzierte HR zu beobachten wären. Dies würde aber bedeuten, dass die Phosphataseaktivität von PP5 für die Funktion innerhalb des Komplexes keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

So lange allerdings keine weiteren Phosphatasen oder Immunophilinen als mögliche Komplexpartner von NBS-LRR-Proteinen isoliert oder bekannt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nur PP5 im NBS-LRR/Hsp90-Komplex vorliegt. In diesem Falle kann basierend auf den Analysen der *PP5-Silencing*-Pflanzen und *pp5-knockout*-Mutante geschlossen werden, dass PP5 keine wesentliche Rolle für die Regulation der NBS-LRR-Aktivität und damit für die NBS-LRR-vermittelte Resistenz spielt.

4.2 Tandemaffinitätsreinigung zur Identifizierung Bs4- und AvrBs4-assoziierter Proteine

4.2.1 Expression von Bs4::TAPa in *N. benthamiana*

Kritisch für die TAP-basierte Reinigung eines Proteinkomplexes ist die Abundanz des TAP-markierten Proteins im verwendeten Expressionssystem. In vorliegender Arbeit machten Expressionsanalysen deutlich, dass trotz 35S-Expression die Menge an Bs4::TAPa in *N. benthamiana* sehr gering ist (siehe 3.3.1). Der geringe Expressionslevel ist allerdings kein spezifisches Problem des TAPa-Konstruktes, denn die Expressionsanalysen anderer Bs4-Fusionsproteine zeigten, dass diese ebenfalls nicht oder nur geringen Mengen in pflanzlichen Gesamtproteinextrakten nachweisbar sind (z.B. Bs4::10xc-Myc, Abbildung 12; Schornack, 2006). Da die Expression von *Bs4* unter Kontrolle des 35S-Promotors im Vergleich zur nativen Situation in Tomate in einem 100-fach höheren Transkriptlevel resultiert (Schornack *et al.*, 2004), ist zu vermuten, dass die niedrigen Bs4-Proteinmengen nicht auf posttranskriptionelle sondern auf posttranslationelle Regulationsmechanismen zurückzuführen sind.

In Anbetracht des niedrigen Expressionslevels stellt sich allerdings die Frage, ob eine Isolierung Bs4-assoziierter Proteine mittels Tandemaffinitätsreinigung möglich ist. Aus Zeitgründen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reinigung von Bs4::TAPa nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings zeigt eine aktuelle Publikation, dass es durchaus möglich ist, ein niedrig abundantes NBS-LRR-Protein (RPS2) zusammen mit potentiellen Interaktionspartnern mittels Affinitätsreinigung zu isolieren (Qi und Katagiri, 2009). Mit Hilfe von LC-MS/MS (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)-Analysen wurde dabei RIN4 identifiziert, das bereits als RPS2-Interaktor bekannt ist (Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Qi und Katagiri, 2009; Tabelle 10). Auch das NBS-LRR-Protein Rx konnte aus pflanzlichen Proteinextrakten gereinigt werden - zusammen mit RanGAP2. KoIP-Analysen bestätigten, dass RanGAP2 mit Rx *in planta* interagiert (Sacco *et al.*, 2007; Tameling und Baulcombe, 2007; Tabelle 10). Im Vergleich zur angestrebten zweistufigen Reinigung von Bs4::TAPa erfolgte die Reinigung der NBS-LRR-Proteine RPS2 und Rx allerdings in einstufigen Ansätzen (Sacco *et al.*, 2007; Tameling und Baulcombe, 2007; Qi und Katagiri, 2009). Vorteil dieser ist, dass die Ausbeute an Zielprotein und potentiellen

Komplexpартnern größer ist. Allerdings muss in einer einstufigen Reinigung mit einem höheren Anteil an Verunreinigungen gerechnet werden, d.h. mit einer Koreinigung von Proteinen, die aufgrund ihrer hohen Abundanz oder einer unspezifischen Bindung an die Reinigungsmatrix in die Elutionsfraktion verschleppt werden. Tatsächlich konnten in der Elutionsfraktion nach einstufiger Reinigung von AvrBs4::TAPa hoch abundante Proteine des Gesamtproteinextraktes in der Elutionsfraktion detektiert werden (Abbildung 30). Solche Verunreinigungen könnten die Identifizierung von Interaktoren und Komplexpартnern erschweren oder verhindern. In Anbetracht des niedrigen Expressionslevels von Bs4::TAPa erscheint es jedoch sinnvoll, zunächst eine einstufige Reinigung des Resistenzproteins und assoziierter Proteine zu versuchen. Dabei könnten mögliche Verunreinigungen durch einen Vergleich der Bandenmuster der Bs4::TAPa-Elutionsfraktion mit der Elutionsfraktion einer zweiten, parallel durchgeführten Reinigung (z.B. GFP::TAPa oder AvrBs4::TAPa) identifiziert werden.

4.2.2 Reinigung von AvrBs4::TAPa aus pflanzlichen Proteinextrakten

Aufgrund der vergleichsweise guten Expression des AvrBs4-TAPa-Fusionsproteins (Abbildung 27A) wurde für dieses bereits eine ein- bzw. zweistufige Reinigung aus transient bzw. stabil transformierten Pflanzenmaterial durchgeführt (siehe 3.3.4 und 3.3.6). Dabei zeigte sich, dass sowohl die Bindung als auch die Elution des TAPa-markierten Effektors an bzw. von der IgG-Sepharose- und Ni-Agarosematrix erfolgreich war (Abbildung 28 und Abbildung 29B). In beiden Reinigungsschritten traten allerdings auch Verluste an AvrBs4s227::TAPa-Protein auf. So war die Abspaltung gebundenen Proteins von der IgG-Sepharosematrix unvollständig (Abbildung 28 und Abbildung 29B) und auch die Adsorption des Spaltproduktes an die Ni-NTA-Agarose war nicht quantitativ (Abbildung 29B). Allerdings ist bei Proteinreinigungen immer mit Verlusten zu rechnen. So schätzten die Entwickler der klassischen TAP-Methode, dass etwa 70-80 % an TAP-markiertem Protein in ihren Arbeiten während der Reinigung verloren ging (Seraphin *et al.*, 2002). Mit 95 % noch weitaus höhere Verluste traten bei der Reinigung von IKK γ -TAP aus Säugerzellen auf (Bürckstümmer *et al.*, 2006). Letztendlich ist entscheidend, wie viel (tatsächliche Menge) an TAP-markiertem Protein und möglichen Komplexpартnern im Ansatz isoliert werden. Zur qualitativen Analyse von Proteingemischen mittels Massenspektrometrie in Kombination mit chromatographischen Trennverfahren werden routinemäßig Probenmengen von etwa 10 ng

bis 10 µg eingesetzt (Budzikiewicz und Schäfer, 2005). Demnach sollten TAP-gereinigte Proteine, die in Coomassie gefärbten SDS-Gelen sichtbar sind (Detektionsgrenze 10 ng-100 ng; Miller *et al.*, 2006), in MS-Analysen identifiziert werden können. In erster Stufe gereinigtes AvrBs4s227::TAPa konnte bislang jedoch nicht in Coomassie-Gelen nachgewiesen werden (Abbildung 30), was dafür spricht, dass die Menge gereinigten Effektorproteins unter 10 ng lag und damit vermutlich noch nicht ausreichend für MS-Analysen ist.

Allerdings erfolgte im Vergleich mit anderen Arbeiten die Reinigung des TAPa-markierten AvrBs4-Proteins bislang nur im kleinen Probenmaßstab (max. 1,5 g Zellkulturmaterial, siehe 3.3.6). Für die Tandemaffinitätsreinigung anderer pflanzlicher Proteine wurde etwa 33-60 x mehr Ausgangsmaterial verwendet (50-90 g Pflanzenmaterial; Rubio *et al.*, 2005; Rohila *et al.*, 2006; Schlichting, 2007). Direkte Vergleiche und damit Abschätzungen, wie viel Pflanzenmaterial für die Reinigung eines TAP-markierten Proteins notwendig sind, sind jedoch nur bedingt möglich, da die Expressionslevel und damit die Ausgangsmenge der analysierten Proteine in den Gesamtproteinextrakten sehr unterschiedlich sein können. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen erscheint eine Reinigung von AvrBs4s227::TAPa im größeren Probenmaßstab jedoch unbedingt erforderlich. Zuvor sollte eine Quantifizierung der im Gesamtproteinextrakt enthaltene AvrBs4s227::TAPa-Menge und der auftretenden Verluste während der Reinigung erfolgen. In Anlehnung an die Arbeiten von Bürckstümmer und Koautoren (2006) könnte diese Quantifizierung durch einen Vergleich der Ausgangsmenge bzw. der gereinigten Proteinmengen mit einer Verdünnungsreihe rekombinanten AvrBs4s227::TAPa-Proteins bekannter Konzentration durchgeführt werden. Dies sollte eine Abschätzung der Mindestmenge an Pflanzenmaterial erlauben, die notwendig ist, um AvrBs4s227::TAPa und mögliche Interaktionspartner in für MS-Analysen ausreichenden Mengen isolieren zu können.

Tabelle 10: Interaktoren von NBS-LRR-Proteinen						
Interaktor	NBS-LRR-Protein	Avr-Protein	Interaktor gesichtet in/über	Interagiert mit (Domäne)	Homologie zu/Putative Funktion des Interaktors	Referenzen
Pto	Prf	AvrPto AvrPtoB	direkte Interaktionsstudien (KoIP)	Prf (N-Terminus, ohne bekanntes Motiv)	Serin/Threonin-Kinase/ Direkte Erkennung des Avr-Proteins (Interaktion mit Avr-Protein)	Scotfield <i>et al.</i> , 1996; Tang <i>et al.</i> , 1996; Mucyn <i>et al.</i> , 2006
RIN4	RPM1 RPS2	AvrRpm1 AvrB AvrRpt2	Y2H mit AvrB; direkte Interaktionsstudien (KoIP); Affinitätsreinigung	RPM1 (CC), AvrRpm1, AvrB RPS2, AvrRpt2	Indirekte Erkennung des Avr-Proteins	Mackey <i>et al.</i> , 2002; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey <i>et al.</i> , 2003; Qi und Katagiri, 2009
PBS1	RPS5	AvrPphB	genetischer Ansatz ^{b)}	RPS5 (CC), AvrPphB	Serin/Threonin-Kinase/ Indirekte Erkennung des Avr-Proteins	Warren <i>et al.</i> , 1999; Swiderski und Innes, 2001; Ade <i>et al.</i> , 2007
NRIP1	N	p50	Y2H	N (TIR), p50	Rhodanase (Schwefeltransferase)/ Indirekte Erkennung des Avr-Proteins	Caplan <i>et al.</i> , 2008
RIN13	RPM1	AvrRpm1 AvrB	Y2H	RPM1 (<i>extended</i> NBS)	Positiver Regulator der ETI	Al-Daoude <i>et al.</i> , 2005
CRT1	HRT SSI4 ^{a)} Rx RPS2	CP _{TC} CP _{PVX} AvrRpt2	genetischer Ansatz (HRT) ^{c)} ; direkte Interaktionsstudien (KoIP)	HRT (NBS), SSI4, Rx, RPS2	ATPase (HATPase_C)/ Signaltransduktion	Kang <i>et al.</i> , 2008
<i>Hv</i> WRKY1 <i>Hv</i> WRKY2	MLA	Avr _A	Y2H	MLA (CC)	Transkriptionsfaktoren/Negative transkriptionelle Regulatoren der PTI	Shen <i>et al.</i> , 2007
SPL-like TF	N	p50	Y2H	N	Transkriptionsfaktor/Positiver transkriptioneller Regulator der ETI	Tameling und Takken, 2008
<i>Af</i> TIP49a	RPM1 RPP5 ^{a)}	AvrRpm1 AvrB	Y2H	RPM1 (CC-NBS) RPP5 (TIR-NBS)	DNA-Polymerase II-akzessorisches Protein/Negativer Regulator der ETI	Holt <i>et al.</i> , 2002
RSH1	RPP5 ^{a)}		Y2H	RPP5 (TIR-NBS)	RelA/SpoT-Homolog ^{e)} / Transkriptionsregulation oder Avr-Perzeption	van der Biezen <i>et al.</i> , 2000
RanGAP2	Rx	CP _{PVX}	IP; TAP	Rx (CC)	Vermittlung des Kernimports von Rx	Sacco <i>et al.</i> , 2007; Tameling und Baulcombe, 2007

Tabelle 10: Interaktoren von NBS-LRR-Proteinen						
Interaktor	NBS-LRR-Protein	Avr-Protein	Interaktor gesichtet in/über	Interagiert mit (Domäne)	Homologie zu/Putative Funktion des Interaktors	Referenzen
Hsp90	RPM1 N I-2 ^{a)} Bs4	AvrRpm1 AvrB p50 AvrBs4	genetischer Ansatz ^{d)} ; Y2H; direkte Interaktionsstudien (GST-pull down, KoIP)	RPM1, Bs4 N und I-2 (LRR)	Hitzeschockprotein/Faltung, Stabilisierung der NBS-LRR-Proteine und Regulation der NBS-LRR-Funktion	Hubert <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2004; de la Fuente van Bentem <i>et al.</i> , 2005; Schornack, 2006
PP5	N I-2 ^{a)} Bs4	p50 AvrBs4	Y3H; Y2H und direkte Interaktionsstudien (KoIP, BiFC)	N, I-2, Bs4 (LRR)	Serin/Threonin-Phosphatase/ funktionale Relevanz für NBS-LRR-vermittelte Resistenz ungeklärt	de la Fuente van Bentem <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2004; de la Fuente van Bentem <i>et al.</i> , 2005; diese Arbeit
SGT1	Bs2	AvrBs2	direkte Interaktionsstudien (KoIP)	Bs2 (LRR)	Ko-Chaperon von Hsp90, Proteinabbau (SCF (<i>SKP1-Cullin-F-Box-Protein</i>)-Ubiquitin-Ligase-Komplex-vermittelt)	Leister <i>et al.</i> , 2005
<p>Y2H: Hefe-Dihybrid-Sichtung; Y3H: Hefe-Trihybrid-Sichtung; IP: Immunopräzipitation; KoIP: Koimmunopräzipitation; BiFC: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation; TAP: Tandemaffinitätsreinigung</p> <p>^{a)}: korrespondierendes Avr-Protein noch nicht bekannt/isoliert</p> <p>^{b)}: Sichtung mutagenisierter <i>Arabidopsis</i>-Pflanzen auf Verlust der Resistenz gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>avrPphB</i>)</p> <p>^{c)}: Sichtung transgener (<i>Dex: CP_{TC}</i>) mutagenisierter <i>Arabidopsis</i>-Pflanzen auf <i>survivors</i> nach Dexamethason-Behandlung</p> <p>^{d)}: Sichtung mutagenisierter <i>Arabidopsis</i>-Pflanzen auf verminderte Resistenz gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>avrRpm1</i>)</p> <p>^{e)}: RelA/SpoT: in <i>E.coli</i> - Guanosin-tetra- bzw. -pentaphosphat ((p)ppGpp)-Synthetasen</p>						

4.3 Sichtung einer cDNA-Überexpressionsbibliothek in *N. benthamiana*

4.3.1 Die verstärkte *Bs4*-HR nach Kotransformation von *35S:SlCesAΔN* ist vermutlich auf das *Silencing CesA*-homologer Gene in *N. benthamiana* zurückzuführen

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Klone identifiziert, deren Koexpression mit *Bs4* und *AvrBs4* in einer verstärkten *Bs4*-HR resultierte (Abbildung 32B und C). Es zeigte sich, dass beide Klone dasselbe cDNA-Fragment enthielten, das für ein Protein mit Homologie zu Zellulosesynthasen (*CesA*) kodiert (siehe 3.4.3, Anhang A4 - A6). Zellulosesynthasen sind essentiell für die Bildung der pflanzlicher Zellwand (Arioli *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1999; Somerville *et al.*, 2004; Taylor, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Sequenzanalysen des isolierten cDNA-Fragmentes ließen allerdings vermuten, dass das Fragment nicht die vollständige kodierende Sequenz des *SlCesA*-Gens aus Tomate umfasst (Abbildung 33A). In *Arabidopsis thaliana* sind bislang 10 *CesA*-Gene bekannt (Richmond, 2000). Ein AS-Alignment des isolierten Homologs aus Tomate mit dem nächsten Homolog aus *Arabidopsis* (*AtCesA1*, Anhang A5 und A6) machte deutlich, dass ersteres lediglich die Transmembrandomänen und eine zytoplasmatische Domäne (Domäne B) des C-Terminus funktionaler Zellulosesynthasen umfasst (*SlCesAΔN*, Abbildung 35). *AtCesA1* weist jedoch eine weitere zytoplasmatische Domäne (Domäne A) auf (Richmond, 2000; Abbildung 35). Domäne A und B enthalten die für Glykosyltransferasen charakteristischen, konservierten AS-Reste D-D-D-QxxRW (Saxena *et al.*, 1995), die für die enzymatische Aktivität essentiell sind (Nagahashi *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 2001). Da *SlCesAΔN* N-Terminus und Domäne A fehlen, liegt nahe, dass *SlCesAΔN* keine funktionale Zellulosesynthase ist. Demnach konnte die verstärkte *Bs4*-HR nicht in einer erhöhten Zellulosesynthaseaktivität infolge einer Überexpression des Proteins begründet liegen.

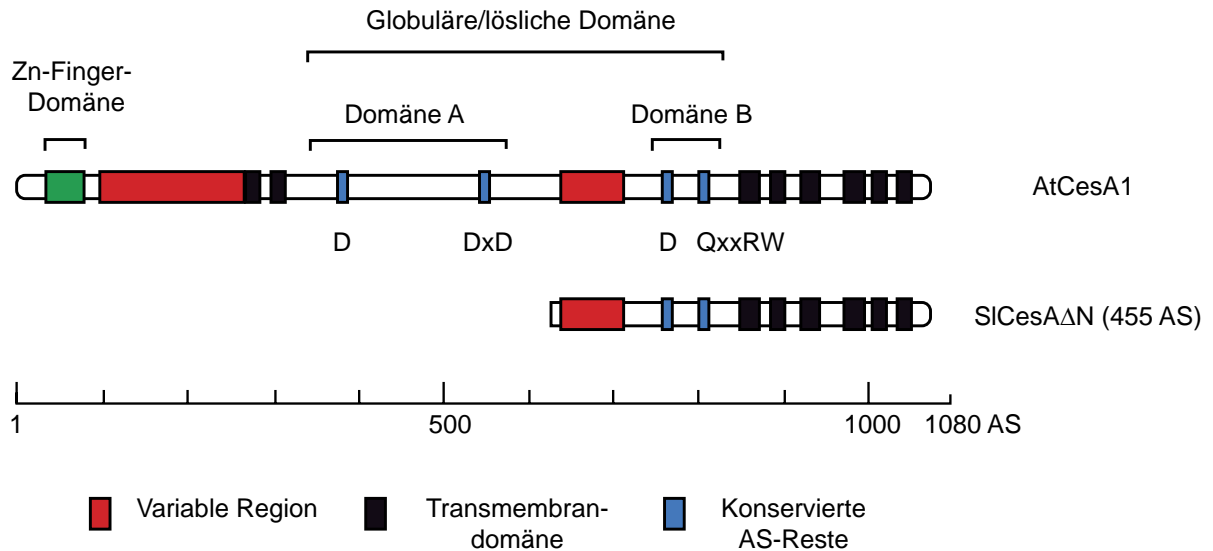


Abbildung 35: Struktureller Vergleich von AtCesA1 und SICesAΔN. AtCesA1 aus *Arabidopsis thaliana* besitzt acht Transmembrandomänen, zwei im N- und sechs im C-Terminus des Proteins. Domäne A und B bilden die sogenannte globuläre oder lösliche Domäne, die konservierte AS-Reste enthält. Im N-Terminus weist AtCesA1 ein Zinkfinger-Motiv auf, das vermutlich Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Das isolierte Bibliotheksprotein SICesAΔN (455 AS) ist homolog zum C-Terminus von AtCesA1 mit Domäne B und den sechs Transmembrandomänen (Anhang A6). Die Sequenzidentität der C-terminalen Regionen beider Proteine beträgt 83 % (Anhang A6). Abbildung modifiziert nach Richmond (2000).

In der Tat wiesen weitere Expressionsanalysen von *SICesAΔN* daraufhin, dass die verstärkte *Bs4*-HR wahrscheinlich auf posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) *SICesAΔN*-homologer Gene in *N. benthamiana* und damit vermutlich auf eine reduzierte Zellulosesynthese bzw. eine gestörte Zellwandbildung zurückzuführen ist.

Arbeiten von Johansen und Carrington (2001) sowie Voinnet und Koautoren (2003) hatten gezeigt, dass nach *Agrobacterium*-vermittelter transients Transformation von 35S-Konstrukten PTGS auftreten kann, dies jedoch effizient durch virale *Silencing*-Suppressoren wie p19 inhibiert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nach transients Transformation des 35S:*SICesAΔN*-Konstruktes (ohne Kotransformation von *Bs4* und *avrBs4*) morphologische Veränderungen im transformierten Blattgewebe beobachtet werden (Abbildung 34A), die jedoch nach Kotransformation des *Silencing*-Suppressors *p19* nicht auftraten (Abbildung 34B). Dies legte nahe, dass die für *SICesAΔN* beobachteten Veränderungen im Blattgewebe durch PTGS eines oder mehrerer *SICesAΔN*-homologer Gene hervorgerufen wurde. Um diese Hypothese experimentell zu prüfen, könnten Transkript- und Northernanalysen durchgeführt werden. In Abwesenheit von p19 sollte eine Reduktion einzelner *CesA*-mRNAs bzw. eine Akkumulation von *CesA*-siRNAs (*small interfering RNAs*), die diagnostisch für PTGS sind (Hamilton und Baulcombe, 1999), nachweisbar sein.

Alternativ könnte das *SICesAΔN*-Fragment in *antisense*-Orientierung unter Kontrolle des *35S*-Promotors in *N. benthamiana* exprimiert werden. Falls das *Silencing* von *CesA*-Homologen die Ursache für die beobachteten Veränderungen im Blattgewebe und die verstärkte *Bs4*-HR ist, sollten diese Phänotypen auch nach Expression des *antisense*-Konstruktes reproduziert werden können.

4.3.2 Die verstärkte *Bs4*-HR nach Kotransformation von *35S:SIHsp70* wird vermutlich durch die Induktion von Zelltodreaktionen durch das *Silencing* mehrerer *Hsp70*-Endogene hervorgerufen

Zwei weitere Bibliotheksklone, die im Zusammenhang mit einer verstärkten *Bs4*-HR isoliert wurden, enthielten ein cDNA-Fragment, das die vollständig kodierende Sequenz eines Hitzeschockproteins der *Hsp70*-Familie umfasste (*SIHsp70*, Abbildung 33B). Ein konserviertes AS-Motiv im C-Terminus lässt vermuten, dass *SIHsp70* im Zytoplasma lokalisiert (siehe 3.4.4, Anhang A7). Wie auch *SICesAΔN* wurde *SIHsp70* ohne *Bs4* und *avrBs4* in *N. benthamiana* transient exprimiert. Dabei trat eine Woche nach Inokulation der Bakterien eine Nekrose im inokulierten Blattgewebe auf (Abbildung 34A). Dies ließ vermuten, dass die verstärkte *Bs4*-HR auf einen pleiotropen Effekt – auf die (zusätzliche) Induktion von Zelltodreaktionen durch *SIHsp70* zurückzuführen ist. Da die Nekrose jedoch nur nach Transformation von *35S:SIHsp70*, nicht aber bei gleichzeitiger Kotransformation von *p19* beobachtet werden konnte (Abbildung 34B), ist auch hier anzunehmen, dass der Phänotyp nicht auf eine Überexpression von *SIHsp70*, sondern auf PTGS zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass aus einer Transformation eines *antisense-HSC70-1*-Konstruktes in *Arabidopsis* keine stabil transgenen Pflanzen erhalten wurden (Sung und Guy, 2003), während T-DNA-Linien für *HSC70-1* durchaus verfügbar sind (Noël *et al.*, 2007). Sung und Guy (2003) postulierten, dass die Transformation des *antisense-HSC70-1*-Konstruktes nicht nur zum *Silencing* von *HSC70-1*, sondern aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den *Hsp70*-Familienmitgliedern (Sung *et al.*, 2001) auch zum *Silencing* weiterer *HSC70*-Homologer führte und dies eine Letalität der Transformanden verursachte. Vermutlich lässt sich die für *SIHsp70* beobachtete Nekrose ebenfalls auf das *Silencing* mehrerer *Hsp70*-Isoformen in *N. benthamiana* zurückführen. Da *Hsp70*-Proteine auch unter Nicht-Stressbedingungen für zelluläre Prozesse wie für die Faltung von neu synthetisierten Proteinen, den Proteinabbau, den Organellimport von Proteinen oder auch für

Signaltransduktionsprozesse wichtig sind (Sung *et al.*, 2001), führt ein stark reduzierter *Hsp70*-Level in der Zelle vermutlich zum Zelltod. Zusammengefasst legen die Expressionsanalysen für *SlHsp70* nahe, dass die verstärkte *Bs4*-HR auf einen pleiotropen Effekt und nicht auf eine spezifische Funktion des Proteins in der *Bs4*-Abwehr zurückzuführen ist.

4.4 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze gewählt, um Komponenten der *Bs4*-vermittelten Abwehr zu isolieren. Dabei wurden die Serin/Threonin-Phosphatase 5 und ein Hitzeschockprotein der *Hsp70*-Familie (*SlcpHsp70*) als Interaktionspartner von *Bs4* identifiziert. Um die Spezifität der *Bs4*-*Hsp70*-Assoziation näher zu hinterfragen (siehe 4.1.1), sollten weitere *Hsp70*-Proteine mittels KoIP und funktionalen Analysen untersucht werden. Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse (siehe 3.4.5 und 4.3.2) sollten *Hsp70*-Überexpressionsanalysen jedoch nur in Anwesenheit des *Silencing*-Inhibitors p19 erfolgen, um eventuell auftretende *Silencing*-Effekte zu unterdrücken und eine Überexpression der Proteine zu erreichen. Parallel könnten VIGS-Analysen durchgeführt werden. Dafür sollten 5'- bzw. 3'-UTR-Sequenzen als *Silencing*-Fragmente verwendet werden, um ein spezifisches *Silencing* einzelner *Hsp70*-Gene zu erreichen. Dies setzt voraus, dass über RACE-Analysen 5'- bzw. 3'-UTR-Sequenzen der *Hsp70*-Endogene aus *N. benthamiana* bestimmt werden. Alternativ könnten *Hsp70*-TILLING-Mutanten von Tomate isoliert und im Kontext der *Bs4*-vermittelten Resistenz charakterisiert werden (siehe Tabelle 8, 4.1.1).

Für die Identifizierung regulatorischer Komponenten der *Bs4*-HR sollte die Sichtung der Überexpressionsbibliothek fortgeführt werden – allerdings nur mit Koexpression des *Silencing*-Inhibitors p19 (Sichtung von mindestens 20000 Klonen). Parallel wurde bereits die Sichtung einer VIGS-Bibliothek initiiert (J. Hausner, S. Schornack, A. Strauß und Th. Lahaye, unveröffentlichte Daten). Um nähere Einblicke in den Mechanismus der AvrBs4-Erkennung zu erhalten, sollten die Arbeiten zur Affinitätsreinigung von *Bs4* und AvrBs4 unter Verwendung der generierten *Bs4*::TAPa- und AvrBs4>::TAPa-transgenen Linien fortgesetzt werden (siehe 4.2).

5. Literatur

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1998). Different requirements for *EDSI* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10306-10311.
- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W.** (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2531-2536.
- Agrios, G.N.** (2005). *Plant Pathology*. (San Diego: Elsevier Academic Press).
- Al-Daoude, A., de Torres Zabala, M., Ko, J.-H., and Grant, M.** (2005). RIN13 is a positive regulator of the plant disease resistance protein RPM1. *Plant Cell* **17**, 1016-1028.
- Albrecht, M., and Takken, F.L.W.** (2006). Update on the domain architectures of NLRs and *R* proteins. *Biochem Bioph Res Co* **339**, 459-462.
- Altenbach, D., and Robatzek, S.** (2007). Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**, 1031-1039.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., and Williamson, R.E.** (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* **279**, 717-720.
- Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol* **49**, 1537-1546.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noël, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., and Shirasu, K.** (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J* **25**, 2007-2016.
- Baker, C.J., Oneill, N.R., Keppler, L.D., and Orlandi, E.W.** (1991). Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell-suspensions. *Phytopathology* **81**, 1504-1507.
- Ballvora, A., Schornack, S., Baker, B.J., Ganal, M., Bonas, U., and Lahaye, T.** (2001a). Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. *Mol Genet Genomics* **266**, 639-645.
- Ballvora, A., Pierre, M., Van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T., and Bonas, U.** (2001b). 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.
- Baulcombe, D.C.** (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 109-113.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D., and Dangl, J.L.** (2004). *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by *RPS2* and *RPM1* downstream or independent of the *NDR1* signal modulator and is not required

- for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* **16**, 2822-2835.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., and Baulcombe, D.C.** (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J* **32**, 195–204.
- Bhat, R.A., Lahaye, T., and Panstruga, R.** (2006). The visible touch: *in planta* visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**, 1-12.
- Blatch, G.L., and Lassel, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939.
- Bonas, U., Stall, R.E., and Staskawicz, B.** (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* **218**, 127-136.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J., and Balbo, I.** (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol Gen Genet* **238**, 261-269.
- Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D.** (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459-472.
- Boyes, D.C., Nam, J., and Dangl, J.L.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* *RPM1* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15849-15854.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., and Ohad, N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 419-427.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Budzikiewicz, H., and Schäfer, M.** (2005). *Massenspektrometrie*. (Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co KGaA).
- Burch-Smith, T.M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2007). The functions of plant TIR domains. *Sci STKE* **2007**, pe46.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Caplan, J.L., Tsao, J., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2007). A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Biol* **5**, e68.
- Bürckstümmer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A.** (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* **3**, 1013-1019.
- Büttner, D., and Bonas, U.** (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9**, 193-200.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2008). Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* **132**, 449-462.
- Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M., and Cohen, P.T.** (1994). A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J* **13**, 4278-4290.
- Chinkers, M.** (2001). Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 28-32.
- Christen, P., and Jaussi, R.** (2005). *Biochemie*. (Berlin - Heidelberg - New York: Springer-Verlag).

- Cohen, P.T.** (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-251.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2004). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**, 115-128.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L.** (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**, 655-662.
- da Cunha, L., Sreerekha, M.V., and Mackey, D.** (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 349-357.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- de la Fuente van Bentem, S., Vossen, J.H., Vermeer, J.E., de Vroomen, M.J., Gadella, T.W., Jr., Haring, M.A., and Cornelissen, B.J.** (2003). The subcellular localization of plant protein phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing. *Plant Physiol* **133**, 702-712.
- de la Fuente van Bentem, S., Vossen, J.H., Vries, K.J., Wees, S., Tameling, W.I.L., Dekker, H.L., Koster, C.G., Haring, M.A., Takken, F.L.W., and Cornelissen, B.J.C.** (2005). Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J* **43**, 284-298.
- de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammounh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M., and Boch, J.** (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 368-382.
- Delannoy, E., Stanley, W.A., Bond, C.S., and Small, I.D.** (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans* **35**, 1643-1647.
- Delmer, D.P.** (1999). Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 245-276.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8024-8029.
- Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.H., and Baker, B.J.** (2000). Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14789-14794.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., and Ellis, J.G.** (2001). Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β -strand/ β -turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* **13**, 163-178.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8888-8893.
- Duan, Y.P., Castaneda, A., Zhao, G., Erdos, G., and Gabriel, D.W.** (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.

- Erbse, A., Mayer, M.P., and Bukau, B.** (2004). Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem Soc Trans* **32**, 617-621.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1999). *EDSI*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3292-3297.
- Farre, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A.** (2005). Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol* **15**, 47-54.
- Fields, S., and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R.** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 1648-1652.
- Flor, H.H.** (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* **8**, 29-54.
- Fritig, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* **10**, 16-22.
- Gabriel, D.W., and Rolfe, B.G.** (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* **28**, 365-391.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B., and Superti-Furga, G.** (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631-636.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- Gerace, L., Blum, A., and Blobel, G.** (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* **79**, 546-566.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87-96.
- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* — 2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 301-308.
- Greenberg, J.T., and Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**, 201-211.
- Gregan, J., Riedel, C.G., Petronczki, M., Cipak, L., Rumpf, C., Poser, I., Buchholz, F., Mechtler, K., and Nasmyth, K.** (2007). Tandem affinity purification of functional TAP-tagged proteins from human cells. *Nat Protoc* **2**, 1145-1151.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z.** (2005). *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**, 1122-1125.

- Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balazs, E., and Richards, K.E.** (1982). Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* **30**, 763-773.
- Gürlebeck, D.** (2007). Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation. Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., and 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.
- Guy, C.L., and Li, Q.B.** (1998). The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell* **10**, 539-556.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., and Hannon, G.J.** (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**, 110-119.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A.** (2000). DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., and Hodge, S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2122-2127.
- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y.** (2003). Identification of a *Pseudomonas syringae* type III effector suppressing cell wall-based plant defense. *EMBO J*.
- He, P., Shan, L., and Sheen, J.** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* **9**, 1385-1396.
- Herbers, K., Conrads-Strauch, J., and Bonas, U.** (1992). Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* **356**, 172-174.
- Heuer, H., Yin, Y.N., Xue, Q.Y., Smalla, K., and Guo, J.H.** (2007). Repeat domain diversity of *avrBs3*-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4379-4384.
- Hinds, T.D., Jr., and Sanchez, E.R.** (2008). Protein phosphatase 5. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2358-2362.
- Hiriart, J.B., Aro, E.M., and Lehto, K.** (2003). Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana ChlH* gene and of the tobacco mosaic virus vector. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**, 99-106.
- Holt, B.F., Boyes, D.C., Ellerstrom, M., Siefers, N., Wiig, A., Kauffman, S., Grant, M.R., and Dangl, J.L.** (2002). An evolutionarily conserved mediator of plant disease resistance gene function is required for normal *Arabidopsis* development. *Dev Cell* **2**, 807-817.
- Holt, B.F., Belkhadir, Y., and Dangl, J.L.** (2005). Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* **309**, 929-932.
- Howles, P., Lawrence, G., Finnegan, J., McFadden, H., Ayliffe, M., Dodds, P., and Ellis, J.** (2005). Autoactive alleles of the flax *L6* rust resistance gene induce non-race-specific rust resistance associated with the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* **18** 570-582.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.

- Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L.** (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J* **22**, 5679-5689.
- Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., and Inoue, S.** (2004). Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* **18**, 1131-1143.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**, 4004-4014.
- Johansen, L.K., and Carrington, J.C.** (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol* **126**, 930-938.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., and Schaad, N.W.** (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**, 755-762.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jordan, T., Römer, P., Meyer, A., Szczesny, R., Pierre, M., Piffanelli, P., Bendahmane, A., Bonas, U., and Lahaye, T.** (2006). Physical delimitation of the pepper *Bs3* resistance gene specifying recognition of the AvrBs3 protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 895-905.
- Kajava, A.V.** (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol* **277**, 519-527.
- Kamphausen, T., Fanghanel, J., Neumann, D., Schulz, B., and Rahfeld, J.U.** (2002). Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J* **32**, 263-276.
- Kang, H.G., Kuhl, J.C., Kachroo, P., and Klessig, D.F.** (2008). CRT1, an *Arabidopsis* ATPase that interacts with diverse resistance proteins and modulates disease resistance to turnip crinkle virus. *Cell Host Microbe* **3**, 48-57.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-195.
- Karrer, E.E., Beachy, R.N., and Holt, C.A.** (1998). Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol Biol* **36**, 681-690.
- Katzen, F.** (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Dis* **2**, 571-589.
- Kay, S., Boch, J., and Bonas, U.** (2005). Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**, 838-848.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648-651.
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet* **24**, 447-463.
- Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R., and Brown, R.M., Jr.** (1999). Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* **11**, 2075-2086.
- Klement, Z., and Goodman, R.N.** (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **5**, 17-44.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J.** (1994). The leucine-rich repeat - a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**, 415-421.

- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Krenz, B.** (2007). Gene Silencing und das Abutilon Mosaik Virus. Dissertation. Biologisches Institut, Universität Stuttgart.
- Lahaye, T.** (2002). The *Arabidopsis* *RRS1-R* disease resistance gene - uncovering the plant's nucleus as new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci* **7**, 425-427.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L.** (2004). STAND, a class of P-Loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol* **343**, 1.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., and Staskawicz, B.J.** (2005). Molecular genetic evidence for the Role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **17**, 1268-1278.
- Lim, M.T., and Kunkel, B.N.** (2004). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 promotes virulence independently of RIN4, a predicted virulence target in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**, 790-798.
- Liu, J., Liu, X., Dai, L., and Wang, G.** (2007). Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *J Genet Genomics* **34**, 765-776.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**, 777-786.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002b). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**, 415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002c). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.
- Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2004). Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem* **279**, 2101-2108.
- Lu, Q., Surks, H.K., Ebling, H., Baur, W.E., Brown, D., Pallas, D.C., and Karas, R.H.** (2003a). Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **278**, 4639-4645.
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.-J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., and Baulcombe, D.C.** (2003b). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* **22**, 5690-5699.
- Lupashin, V., and Sztul, E.** (2005). Golgi tethering factors. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 325-339.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Ret, M.L., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Tacconat, L., and Small, I.** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103.

- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743–754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379–489.
- Magliery, T.J., Wilson, C.G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A.D., and Regan, L.** (2005). Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc* **127**, 146–157.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2002). The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol* **43**, 58–69.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Ng, H.L., Rice, D.W., Yeates, T.O., and Eisenberg, D.** (1999). Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* **285**, 751–753.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U.** (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 637–646.
- Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., and Kay, S.A.** (2003). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 223–236.
- Mayer, M.P., and Bukau, B.** (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670–684.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S.** (2000a). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439–442.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S.** (2000b). Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* **18**, 455–457.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., and Michelmore, R.** (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol* **7**, 212.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., and Levy, A.** (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J* **12**, 1465–1472.
- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y., and Levy, A.A.** (2000). Technical advance: a high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J* **22**, 265–274.
- Meister, G., and Tuschl, T.** (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343–349.
- Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, Y., and Zamir, D.** (2004). *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* **38**, 861–872.
- Meyers, B.C., Shen, K.A., Rohani, P., Gaut, B.S., and Michelmore, R.W.** (1998). Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. *Plant Cell* **10**, 1833–1846.
- Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E.** (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* **6**, 5385–5408.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B.J., and Stall, R.E.** (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**, 41–47.

- Minsavage, G., Jones, J., R., S., Miller, S., and Ritchie, D. (1999). Hypersensitive resistance in *Capsicum pubescens* PI 235047 to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) is elicited by *avrBs3-2*. *Phytopathology* **89**, S53.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.
- Mizuno, T. (2004). Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 499-505.
- Mizuno, T., and Nakamichi, N. (2005). Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant Cell Physiol* **46**, 677-685.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., and Baulcombe, D.C. (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J* **21**, 4511-4519.
- Mucyn, T.S., Clemente, A., Andriotis, V.M., Balmuth, A.L., Oldroyd, G.E., Staskawicz, B.J., and Rathjen, J.P. (2006). The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase *in vivo* to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* **18**, 2792-2806.
- Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1995). Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J Biol Chem* **270**, 13961-13967.
- Nagata, T., Hasezawa, S., and und Inzé, D. (2004). Tobacco BY-2 Cells. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Berlin - Heidelberg - New York: Springer-Verlag).
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Nasir, K.H., Takahashi, Y., Ito, A., Saitoh, H., Matsumura, H., Kanzaki, H., Shimizu, T., Ito, M., Fujisawa, S., Sharma, P.C., Ohme-Takagi, M., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2005). High-throughput *in planta* expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance. *Plant J* **43**, 491-505.
- Noël, L.D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmuller, L., Betsuyaku, S., Witte, C.P., Bhat, R., Pochon, N., Colby, T., and Parker, J.E. (2007). Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Cell* **19**, 4061-4076.
- Nürnbergger, T., and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* **6**, 335-345.
- Nürnbergger, T., and Kemmerling, B. (2006). Receptor protein kinases - pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* **11**, 519-522.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
- Owens-Grillo, J.K., Stancato, L.F., Hoffmann, K., Pratt, W.B., and Krishna, P. (1996). Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants. *Biochemistry* **35**, 15249-15255.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cell Microbiol* **11**, 191-198.
- Parniske, M., Hammond-Kosack, K.E., Golstein, C., Thomas, C.M., Jones, D.A., Harrison, K., Wulff, B.B.H., and Jones, J.D.G. (1997). Novel disease resistance

- specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. *Cell* **91**, 821-832.
- Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schauser, L., Jaggard, D.A.W., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D.G., Shirasu, K., and Baulcombe, D.C.** (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10865-10869.
- Pierre, M., Noël, L., Lahaye, T., Ballvora, A., Veuskens, J., Ganal, M., and Bonas, U.** (2000). High-resolution genetic mapping of the pepper resistance locus *Bs3* governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatora* AvrBs3 protein. *Theor Appl Genet* **101**, 255-263.
- Pokalsky, A.R., Hiatt, W.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C.M., and Shewmaker, C.K.** (1989). Structure and expression of elongation factor 1 α in tomato. *Nucleic Acids Res* **17**, 4661-4673.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., and DeFranco, D.B.** (2004). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* **16**, 857-872.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- Qi, Y., and Katagiri, F.** (2009). Purification of low-abundance *Arabidopsis* plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components. *Plant J* **57**, 932-944.
- Rathjen, J., and Moffett, P.** (2003). Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 300-306.
- Reddy, R.K., Kurek, I., Silverstein, A.M., Chinkers, M., Breiman, A., and Krishna, P.** (1998). High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiol* **118**, 1395-1401.
- Rentel, M.C., Leonelli, L., Dahlbeck, D., Zhao, B., and Staskawicz, B.J.** (2008). Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1091-1096.
- Richmond, T.** (2000). Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol* **1**, REVIEWS3001.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.
- Riggs, D.L., Cox, M.B., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Carrigan, P.E., and Smith, D.F.** (2004). Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 279-295.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., and Fromm, M.E.** (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* **38**, 172-181.
- Rohila, J.S., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R., Dardick, C., Canlas, P., Xu, X., Gribskov, M., Kanrar, S., Zhu, J.K., Ronald, P., and Fromm, M.E.** (2006). Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J* **46**, 1-13.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauß, T., Bonas, U., and Lahaye, T.** (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* **318**, 645-648.

- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S.P., and Deng, X.W. (2005). An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J* **41**, 767-778.
- Sacco, M.A., Mansoor, S., and Moffett, P. (2007). A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *Plant J* **52**, 82-93.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Saxena, I.M., Brown, R.M., Jr., and Dandekar, T. (2001). Structure-function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. *Phytochemistry* **57**, 1135-1148.
- Saxena, I.M., Brown, R.M., Jr., Fevre, M., Geremia, R.A., and Henrissat, B. (1995). Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* **177**, 1419-1424.
- Schlichting, R. (2007). Isolierung von MAP-Kinase-Proteinkomplexen aus *Arabidopsi thaliana*. Dissertation. Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie/Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Schlögelhofer, P., Garzon, M., Kerzendorfer, C., Nizhynska, V., and Bachmair, A. (2006). Expression of the ubiquitin variant ubR48 decreases proteolytic activity in *Arabidopsis* and induces cell death. *Planta* **223**, 684-697.
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Baulcombe, D., Baker, B., Ganal, M., Bonas, U., and Lahaye, T. (2004). The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J* **37**, 46-60.
- Schornack, S., Peter, K., Bonas, U., and Lahaye, T. (2005). Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4* but not in pepper *Bs3* mediated perception. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**, 1215-1225.
- Schornack, S. (2006). Struktur, Erkennungsspezifität und Regulationsmechanismus des Resistenzproteins Bs4 aus Tomate. Dissertation. Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., and Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol* **163**, 256-272.
- Schornack, S., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Jones, J.B., and Lahaye, T. (2008). Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol*.
- Schulze-Lefert, P. (2004). Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol* **14**, R22-24.

- Schwessinger, B., and Zipfel, C.** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 389-395.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., and Staskawicz, B.J.** (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**, 2063-2065.
- Seo, N.S., Lee, S.K., Song, M.Y., Suh, J.P., Hahn, T.R., Ronald, P., and Jeon, J.S.** (2008). The HSP90-SGT1-RAR1 molecular chaperone complex: a core modulator in plant immunity. *J Plant Biol* **51**, 1-10.
- Seraphin, B., Puig, O., Bouveret, E., Rutz, B., and Caspary, F.** (2002). Tandem affinity purification to enhance interacting protein identification. *Protein-Protein-Interactions: A Molecular Cloning Manual*, E. Golemis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp. 313-328.
- Serino, G., and Deng, X.W.** (2003). The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 165-182.
- Shen, Q.H., and Schulze-Lefert, P.** (2007). Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *EMBO J* **26**, 4293-4301.
- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P.** (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**, 1098-1103.
- Shirasu, K.** (2008). The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol*.
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M., and Pratt, W.B.** (1997). Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor-hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* **272**, 16224-16230.
- Small, I.D., and Peeters, N.** (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**, 46-47.
- Sohn, K.H., Lei, R., Nemri, A., and Jones, J.D.** (2007). The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**, 4077-4090.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H.** (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**, 2206-2211.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A., and Kay, S.A.** (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., and Guy, C.L.** (2001). Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol. Plant.* **113**, 443-451.
- Sung, D.Y., and Guy, C.L.** (2003). Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol* **132**, 979-987.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D.W.** (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* **81**, 802-809.
- Swiderski, M.R., and Innes, R.W.** (2001). The *Arabidopsis* *PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J* **26**, 101-112.

- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., and Van den Ackerveken, G.** (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**, 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., and Bonas, U.** (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**, 13-23.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K.** (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1, and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11777-11782.
- Takahashi, Y., Nasir, K.H., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kamoun, S., and Terauchi, R.** (2007). A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J* **49**, 1030-1040.
- Takken, F.L.W., Albrecht, M., and Tameling, W.I.L.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 383-390.
- Tameling, W.I.L., and Baulcombe, D.C.** (2007). Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to potato virus X. *Plant Cell* **19**, 1682-1694.
- Tameling, W.I.L., and Takken, F.L.W.** (2008). Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol* **121**, 243-255.
- Tameling, W.I.L., Elzinga, S.D.J., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L.W., Haring, M.A., and Cornelissen, B.J.C.** (2002). The tomato *R* gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **14**, 2929-2939.
- Tang, W., Luo, X.Y., and Sanmuels, V.** (2001). Gene silencing: double-stranded RNA mediated mRNA degradation and gene inactivation. *Cell Res* **11**, 181-186.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., and Martin, G.B.** (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**, 2060-2063.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M., and Katagiri, F.** (2000). Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *Plant Cell* **12**, 2541-2554.
- Taylor, N.G.** (2008). Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytol* **178**, 239-252.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorholter, F.J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O.** (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**, 7254-7266.
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., and Maule, A.J.** (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* **25**, 417-425.
- Ueda, H., Yamaguchi, Y., and Sano, H.** (2006). Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol Biol* **61**, 31-45.
- Uematsu, S., and Akira, S.** (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-725.

- Ulker, B., and Somssich, I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 491-498.
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y.** (2007). The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**, 658-672.
- van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U.** (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**, 1307-1316.
- van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998a). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-456.
- van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998b). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* **8**, R226-R227.
- van der Biezen, E.A., Sun, J.H., Coleman, M.J., Bibb, M.J., and Jones, J.D.G.** (2000). *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3747-3752.
- van der Hoorn, R.A., and Kamoun, S.** (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., and Schell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-170.
- Vaucheret, H., Kronenberger, J., Lepingle, A., Vilaine, F., Boutin, J.P., and Caboche, M.** (1992). Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J* **2**, 559-569.
- Vaughan, C.K., Mollapour, M., Smith, J.R., Truman, A., Hu, B., Good, V.M., Panaretou, B., Neckers, L., Clarke, P.A., Workman, P., Piper, P.W., Prodromou, C., and Pearl, L.H.** (2008). Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol Cell* **31**, 886-895.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J.** (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* **90**, 677-682.
- Vidal, S., Cabrera, H., Andersson, R.A., Fredriksson, A., and Valkonen, J.P.T.** (2002). Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 717-727.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schuhmacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 428-438.
- Wandinger, S.K., Suhre, M.H., Wegele, H., and Buchner, J.** (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* **25**, 367-376.
- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T., and Garabedian, M.J.** (2007). Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* **21**, 625-634.

- Wang, J., Elliott, J.E., and Williamson, R.E.** (2008). Features of the primary wall CESA complex in wild type and cellulose-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **59**, 2627-2637.
- Warren, F.W., Merritt, P.M., Holub, E., and Innes, R.W.** (1999). Identification of three putative signal transduction genes involved in *R* gene specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* **152**, 401-412.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B.** (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.
- Wichmann, G., and Bergelson, J.** (2004). Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* **166**, 693-706.
- Wu, X.M., Li, Y.R., Zou, L.F., and Chen, G.Y.** (2007). Gene-for-gene relationships between rice and diverse *avrBs3/pthA* avirulence genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathol* **56**, 26-34.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J* **23**, 980-988.
- Yang, B., Zhu, W., Johnson, L.B., and White, F.F.** (2000). The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 9807-9812.
- Yang, B., and White, F.F.** (2004). Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**, 1192-1200.
- Yang, B., Sugio, A., and White, F.F.** (2006). *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 10503-10508.
- Ye, Q., and Worman, H.J.** (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* **219**, 292-298.
- Zhang, Y., Dorey, S., Swiderski, M., and Jones, J.D.G.** (2004). Expression of *RPS4* in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J* **40**, 213-224.
- Zhou, J.M., and Chai, J.** (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* **11**, 179-185.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

ANHANG

A1

Nukleotidsequenzen (TIM, NiR, EP2 und RB, siehe Tabelle 7) bzw. vollständige, kodierende Sequenzen und Proteinsequenzen (SlcpHsp70, SIEP1, SlPRR) der im Hefe-Dihybrid-System isolierten Interaktoren der Bs4-TIR- und Bs4-NBS-Domäne

TIM (Klone TI15, TI54, TI58, TI99 und TI143) – Triosephosphat-Isomerase

(homolog zu SGN-U312987: 100 % Sequenzidentität auf AS-Ebene (146 AS im Vergleich))

Konsensus-Sequenz: 658 bp

GTTTGTGGAGACAAGGTAGCATATGCTCTTTCTCAAGGTTTGAAGGTAATTGCATGTGTTG
GGGAGACTCTTGAGCAAAGAGAATCAGGATCCACCATGGCTGTTGTTGCAGCACAAACAAAGG
CTATTGCAGACCGAGTAAAAGATTGGTCAAATGTGGTGATAGCTTATGAGCCTGTTGGGCTATT
GGTACTGGAAAGGTTGCAACCCCTGCACAAGCCCAGGAAGTACATGCTGAATTGAGGAAATGG
CTCAAGCAAATGTTAGCGCTGAAGTTGCTGCTTCAACCAGGATCATCTATGGAGGATCTGTAAG
CGGTGCCAACTGCAAGGAGTTGGCTGGACAGCCAGATGTTGACGGTTTTCTGTAGGTGGAGC
TTCGTTGAAGCCGGAGTTCATTGACATCATCAAGGCTGCTGAGGTGAAGAAAAGCGCCTAAGGT
CTTGACGCTATTGGAATTTGCAGTTTTTGATCTAGGACTTCCAATGCAGTAGACTTGTATCAA
GTCAATGTCTTGTGACTCTTTATTGCAGTTTGAATTTAAGTAACATGTACAATAAAATTGACAAA
CATTGCACTACCCTACTTCTTTTTGGCTGCAACAATATTGTTAATAAAATTAATAATGTGCATCTA
ATGACATACCCACC

Gesamtsequenz: TI99 (658 bp)

Unterstrichen: cDNA-Insert der Klone TI15, TI58 und TI143 (556 bp)

Kursiv: cDNA-Insert des Klons TI54 (613 bp)

NiR (Klone TI18, TI26 und TI34) – Nitritreduktase

(homolog zu SGN-U316477: 100 % Sequenzidentität auf AS-Ebene (172 AS – N-terminaler Bereich))

5'-Konsensus-Sequenz: für die Klone TI18 und TI34 (517 bp); cDNA-Fragmente der Klone TI18 und TI34 nicht vollständig sequenziert

GTTGTTTCATGGAAAATGGTATTGAGGAGTTAGCTAAGATTCCAATTGAAGAGATAGATCA
ATCAAAGCTTACTAAGGATGACATTGATGTTAGGCTCAAGTGGCTTGGCCTCTTCCATAG
GAGAAAGAATCAATATGGGAGATTCATGATGAGGTTGAAACTTCCAATGGAGTAACAA
CAAGTGCTCAGACTCGATATTTGGCGAGTGTGATAAGGAAATATGGAGAGGAAGGATGT
GCTGATATTACGACAAGGCAAATTTGGCAGATTCGTGGAGTAGTGCTGCCTGATGTGCCT
GAGATTCTAAAGGGACTTGAAGAAGTTGGCTTGACTAGTTTGCAGAGTGGCATGGATAAT
GTCAGGAATCCAGTTGGAAATCCTCTGGCTGGAATTGATCCTGAAGAAATAGTTGACACA
AGACCTTACACTAATTTGCTCTCCCAATTTATCACTGGTAATTCACGAGGCAATCCGGCTG
TTTCTAACTTGCCAAGGAAGTGAATCCGTGTGTAGTA

Unterstrichen: 5'-Ende des cDNA-Inserts des Klons TI34

3'-Konsensus-Sequenz: für die Klone TI18, TI26 und TI34

ATAGCTTTATTGGTCTTCACATTCCAGTGGGTCGTGTCCAAGCAGACGACATGATGATCTA
GCTCGTTTGGCTGATGAGTACGGCTCAGGAGAGCTACGGCTGACTGGGGAACAGAACATT
ATTATTTCCAACATTGAGAATCAAAGATTGACGCACTGCTAAAAGAGCCTATTTTGAGC
AAATTTTACCTGATCCACCTATTCTCATGAAAGGTTTAGTGGCTTGTACTGGTAACCAGT
TTTGTGGACAAGCCATTATTGAAACGAAAGCTCGTTCCTGAAGATCACCGAAGAGGTTCAAAG
GCAAGTATCTCTAACGAGGCCAGTAAGGATGCACTGGACAGGCTGCCCAAATACGTGTGCACA

AGTTCAAGTTGCAGACATTGGATTTCATGGGATGCCTGACTAGAGATAAAGACAAGAAGACTGTG
GAAGGCGCCGATGTTTTCTTAGGAGGCAGAATAGGGAGTACTCACATTTGGGTGAAGTATACA
AGAAGGCAGTTCCTTGTGATGAATTAGTACCATTATTGTGGACTTACTTATTAAGAAGCTTTGGTG
CAGTTCACGAGAAAGAGAAGAAAACAGAAGATTAATAAAAATTTGGATTAGATCATAATGAT
GGAATGTGCAATTATGTTTATGTGATTATGGAGGTATATAGCTAA:GAGCTGGTTTGAATAA
TCAGAAATATGTTGTGTTTCATATCATTTATTGTACGATAAATCAACACAAACATTCCTACT
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC

Gesamtsequenz: TI34 (768 bp)

Kursiv: cDNA-Insert des Klons TI26 (348 bp)

Durch Fettdruck hervorgehoben: 3'-Ende des cDNA-Inserts des Klons TI18

**EP2 (Klone TI14, TI87, TI89, TI106, TI122, TI132, TI136, TI156, gleiches Insert) –
Exprimiertes Protein**

(homolog zu SGN-U327744: 100 % Sequenzidentität auf AS-Ebene (189 AS im Vergleich))

Konsensus-Sequenz: 1006 bp

GAAAATCCCAATTGGTTGGAAGCAGCTTAGCTTCTGGGGCTCCCAAATCAATTCTGTGT
ATCGAAGTTTACTGTAAGGACATGATTTGGCTGAGATGACTGACCGGTTTACTGAGGAAG
GTATTAGGTCAGTAATAGAGAGATTATTCATGGCTGTGAAAGATATTATGAGTGTGCAAA
ATGATATTGCTGAATTTGGTCAAAGGATATGAAAGCTGCTATAGCAAGTCTGCAGAAAG
AACTTCAGGACAAAGATGTTTCATAGAGAGAAAATATGTGCAGAACTTGTTAATCAGATTA
AGGAAGCTGAATCTATTTCAAAGAGTTATTTACAAGAGCTTCAGATAGCAAAAATCTGAGA
TGGATGATTTACACAGGAAGGTGAAACTGATGGAGAAGGAACGAGATTCTCTGACACAC
AGGATAAAAGAAGCTGCAAGATCAGGAATCTAACTTTGCTGACTTACAGTTAAGAGTTAAA
TCACTTGAAGACATGCTAGAGGCCAAAGGAACAAGAAAACGAGGCACTGATGCAAGCACT
TGAGGAGGAGGAAGCTCAAATGGAAGACAAAACAAAAAAGATTGAGGAATGGAGAGA
CTCCTGCTTCAAAAAAATAAAGATATGGAGAACCTTGAAGTTTCCCGTGGAAAGACCATG
AAGAAGCTTTCTGTTACAGTAAGCAAATTTGATGAACTTCATCAACTATCTGAAAG:CCTT
CTGTCCGAGGTTGAGAATCTTCAGTCACAATTACAAGAGCGAGATACAGAGATTTCTTTC
TTGAGGCAAGAAGTTACAAGATGCACTAATGATGCAATAGCTTCTGCTCAGATGAGTAGC
AAAAGAGATGGTGTGAAATCCATGACATTTTGACATGGATAGACAAGATGATTTCTCGA
GTCCAGGCTCATGATATGGATTATGATGATGGAAAAGTCAACCAGATTTCATGATTATAAA
GAAATGATAGAGAAACAGGTGGTGGCTGTAATATCTGAGTTGGAGGACC

RB (Klon TI7) – RNA-Bindeprotein

(homolog zu TC181690: 94 % AS-Sequenzidentität (168 AS im Vergleich))

Gesamtsequenz: 768 bp

AAGGAGGAGATCGTGGAGGTAGTGGTGGATACCAAGGAGGAGATCGCGGAGGTCCGCGG
CGGCGGTCGTGGTGGAGGAAGTGGTAAGGAAGGTGATTGGCGTTGCCCTAACCCAAGTT
GTGGAAATTTGAACTTTGCTAGAAGAGTTGAATGTAACAAATGTGGTGCACCTTCACCTG
CTGGTTCTGATGATCGTGGTGGCAGAGGTGGTAGCAGTTATAACAGACGTGGAAGTGATG
GCGGCTATGGAAATAGTCCAGGGGGAAGAGGTGACAACATGAAAGCAGAAATGCTGGA
GGTGGTAGAACTGGTTCTTATGGTGGTAGTCAGGGAAGAGATGGTGGTGGTTATGCCCAA
GGTCTCCTCATGCTCCTCCATCTTATGGGGCTGCTGATAGCAACTATCCACCACCTTCTA
ATACTTACGGTGGAAACCCCGATGCAGTTCCCCCGCCTGCGAGTTATGTTGGTGGACCTG
CATCTTATCCCCCTTCGTATGGTGGCCCTGGTGGCTATGGTGGGGATACACCAGCTGATGC
TCGTGGGGGTGGACGGGGTGGTCCACCAGGTGGATATGATGGGGGATATGGCGGTGGTG
CCCGGAATACAGGAGGTGGTTATGGTAGTTCTCCAGCTGAGGCTCCGGTAAAGGTCAAGC
AATGCGATGAGAATTGTGGAGATCTCTGTGACAACGCAAGAATATATATCTCAAATTTGC
CTCCTGATGTGACCGTCAAGAAGCTTAGAGAAGCTTTTGGGAGCATTGGAC

***SlcpHsp70* (Klone TI30, 37, 39, 50) – chloroplastidär lokalisiertes Hsp70-Protein**

(korrespondierende CDS in SGN-Datenbank: SGN-U313975: 99 % Sequenzidentität)

Vollständige, kodierende Sequenz: 2112 bp

ATGGCGTCTTCAACTGCTCAAATTCATGCTCTTGGAGCTACATATTTTCGCTAATTCATCTT
 CTTCCACTAGAAAACCTTTAAAGTCTGTGTTTTGGGCCAGAACTGAACAATAGAACCC
 TAGCTTTTGGATTGAAGCAGAAGAAGAGCCGGGGGAATAACGGTGGTTATGCACCGATG
 CGTGTGGTGGCGGAGAAGGTGGTGGGAATTGACTTGGGGACTACTAATTCTGCTGTGGCT
 GCTATGGAAGGAGGGAAGCCTACCATAGTGACGAATGCTGAAGGACAGAGGACAACCTCC
 TTCAGTGGTCGCTTATACTAANAGTGGGGATAGGCTTGTGGTCAAATTGCTAAGCGTCA
 GGCTGTGGTGAACCCGGAGAATACCTTCTTTTCAGTGAAGAGATTTCATTGGAAGGAAGAT
 GAATGAGGTGGATGAGGAGTCGAAGCAGGTGTCCTACAATGTCATCAGAGATGAGAATG
 GAAATGTCAAGCTTGATTGCCCTGCCATTGGCAAATCATTGCTGCTGAAGAAATTTGAG
 CTCAGGTCCTGAGGAAGTTGGTGGATGATGCATCCAAATTTTTGAATGACAAGGTTTCCA
 AGGCTGTTGTCACGGTTCCTGCATACTTCAATGATTCTCAGAGGACAGCAACTAAGGATG
 CAGGTCGCATTGCTGGATTAGAAGTTCTTCGGATAATTAATGAACCCACTGCTGCCTCCTT
 GGCTTATGGTTTTGAAAAGAAAAGTAACGAAACAATTTGGTTTTGATCTTGGAGGTGG
 TACTTTTGATGTATCAGTTCTTGAGGTTGGTGACGGTGTCTTTGAGGTGTTGTCAACTTCT
 GGTGACACCCATCTTGGTGGTGTGATTTTTGACAAGAGGATTGTTGATTGGCTTGTGCA
 AGTTTCAAAGAGATGAAGGTATTGATCTTCTAAAGGACAAACAAGCTCTTCAACGTCTG
 ACTGAGACTGCTGAGAAAGCTAAGATGGAAGTGCATCGCTGACCCAGACTAACATCAGT
 TTACCATTCAATACGGCTACTGCTGATGGTCTAAACACATTGAGACCACTATCACACGTG
 GGAAATTTGAAGAAGTATGCTCAGATCTGCTTGACAGGCTTAAACTCCTGTTTCAAGATT
 CCTTGAGAGATGCCAAGCTCTCCTTCAGCGATATTGATGAGGTCATCCTTGTGGTGGTTC
 TACACGTATCCCAGCTGTTTCAAGAACTTGTAAAGAAATTGACTGGAAAGGACCCCAATGT
 TACAGTTAATCCCGATGAAGTCGTTGCTCTTGGTGTGTCAGTGCAGGCTGGAGTTTTGGCC
 GGAGATGTCAGCGATATTGTCCTTTTAGATGTCACACCATTGTCCATTGGTTTTGAAACAC
 TTGGTGGTGTGATGACAAAGATCATTCCAAGAAATACAACATTGCCTACCTCCAAATCAG
 AAGTGTCTCTACCGCTGCTGATGGTTCAGACAAGTGTAGAAATTAATGTCCTCCAAGGAG
 AGCGAGAATTTGTTAGGGACAACAATCTTTAGGTAGCTTCCGGNTTGTGGAATTCCTC
 CTGCCCCAAGAGGGGTTCCACAAATTGAAGTGAAATTTGACATTGATGCCAATGGTATTC
 TTTCCGTGACTGCTATTGACAAGGGTACTGGGAAGAAGCAAGACATCACCATTACAGGTG
 CCAGCACATTGCCTGGTGTGAGGTCGAGAGAATGGTTAAAGAAGCTGAAAGATTTGCC
 CAGGAAGACAAAGAGAAGAGAGACGCCATAGACACAAAGAACCAGGCCGATTCTGTTGT
 CTACCAGACAGAGAAGCAGTTGAAGGAACTTGGAGACAAAGTACCAGGGCCAGTGAAG
 AAAAGGTTGAGGCTAACTTGGAGAGCTTAAAGAAGCAATCTCAGGAGGGTCAACTCAN
 ACCATGAAGGATGCTATGGCTGCCCTTAACCAANAAGTAATGCAGCTTGGTTCAGTCACTC
 TACAACCAGCCTGGTGTGTCACCAGGTGCTGGTCCAGCACCTGGCGGTGCTGATGGACCT
 TCAGAATCATCATCTGGGAAGGGACCTGATGAAATGACGTAATTGATGCTGATTTACC
 GACAGCAAGTGA

Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifizierte Beutefragmente (Konsensussequenz der isolierten cDNA-Fragmente der Klone TI30, TI37, TI39, TI50)

Unterstrichen: *Silencing*-Fragment (320 bp)

***SlcpHsp70* (74,9 kDa)**

MASSTAQIHALGATYFANSSSSSTRKPLKSVFLGQKLNRTLAFGLKQKKSARGNNGGYAP
 MRVVAEKVVIGIDLTNSAVAAMEGGKPTIVTNAEGQRTTPSVVAYTXSGDRLVGQIAKRQ
 AVVNPENTFFSVKRFGRKMNEVDEESKQVSYNVIRDENGNVCLDCPAIGKSFAAEEISAQVL
 RKLVD DASKFLNDKVS KAVVTPA YFNDSQRTATK DAGRIAGLEVLRIINEPTAASL AYGFE
 KKSNETILVFDLGGGTFDVS VLEVGDGVFEVLSTSGDTHLGGDDFDKRIVDWLAASF KRDEGI
 DLLKDKQALQRLTETA EKAKMELSSLTQTNISLPFITATADGPKHIETTITRGKFEELCSDLLDR
 LKTPVQNSLRDAKLSFS DIDEVILVGGSTRIPAVQELVKKLTGKDPNVTVPNPDEVVALGAAVQ
 AGVLAGDVSDIVLLDVTPLSIGLET LGGVMTKIIPRNTTLPTS KSEVFSTAADGQTSVEINVLQ
 GEREFVRDNKSLGSFRXDGIPAPRGVPQIEVKFDIDANGILSVTAIDKGTGKKQDITITGASTL

PGDEVERMVKEAERFAQEDKEKRDAIDTKNQADSVVYQTEKQLKELGDKVPGPVKEKVEA
 KLKELKEAISGGSTXTMKDAMAALNXXVMQLGQSLYNQPGAAPGAGPAPGGADGPSSESSG
 KGPDPNDVIDADFTDSK

Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziertes Beuteprotein (Konsensus, siehe oben); die interagierende Region umfasst dabei Abschnitte der ATPase-Domäne, die etwa 45 kDA im N-terminalen Bereich des Proteins ausmacht (Mayer und Bukau, 2005)

Durch Fettdruck hervorgehoben: vorhergesagtes Transitpeptid von SlcpHsp70

Fettdruck und kursiv: konserviertes AS-Motiv stromaler Hsp70-Proteine (Guy und Li, 1998)

***SIEP1* (Klon TI52) - Exprimiertes Protein mit COG4-Domäne und Homologie zu *pentatricopeptide-repeat* (PPR)-Proteinen**

(homologer EST in SGN-Datenbank: SGN-U326605: 99 % Sequenzidentität)

Vollständige, kodierende Sequenz: 2211 bp

ATGGCTTCCGACGAAGGAACCAATTTAGATTCATCTCGGTTGAAATTTGGGACACCGGAG
 GCGTTGGAAGAGGTGCGGAATCTCACTGACGTTGGAGACATGACTAGACTTCTCCACGAG
 TGCATTGCATATCAACGAGCCCTAGATCTAGAAGTGGATACTATCCTTTCACATAGATCTG
 ACCTTGACAAGCAGCTTTCGGCCTTCAAAAATCCGCTCAAGTTCTCGACATTGTTAAAG
 CTGACGCGGATCACTTATTCTCCAACATCAGTTCAACTTCTCCTTGCTGATCAGGTAAG
 CGCAAAGTCCGTCAGCTCGATCTAGGTCAGTCGCGTGTAAACGACACTCTCCTTCGAAT
AGATGCTATCGTTGATCGCTCTAATTGTTTAGACGGTGTACGTAAGGCACTTGCATCTGAG
GACTTTGAATCTGCTGCTAATTATGTTTCAGACGTTTCAACTTGACGCTAAGTACAAGG
ATTCAGCTGCTTCTGACCAGAGAGACCAGCTCCTTGCCTCTAAGAAGCAGCTTGAAGGGA
TTGTCCGGCGTAAATTGGCAGAAGCAGTTGATCAGCGTGATCACTCCACCGTTCTGCGGT
TCATAAGGCTGTATCCTCCGTTGGCATTGGAGGAGGAGGGACTGCAAGTGTACGTGATGT
ATTTGAAGAAGGTAATTGCCATGAGATCGCGCCTTGAGTATGAGCAATTGGTTGAAATGA
TGAGTGATCAGCAGGGATCCAGCCAGAACCAGCTTAATTTTGTATCCTGTTTGACTAATTT
ATTCAAAGATATCGTCTTGGCTATTGAAGAGAATGATGAAACTTTAAGGAGCTTGTGTGG
AGAGGATGGCATTGTTTATGCAATATGTGAAGTCAAGAAGAGTGTGATTCTCGTGGTTC
TACTATTATAAAGAAGTACATGGAGTACAGGAACTAGCGAAAGTGACTTCTGAGATTA
ATTCTTACAAGAGCGATTGCTGTCTGTTGGAATCGAAGGACCAGACCCAGAGATATCG
AAGTATATTTGGAGGAGATCTTGTCTTTGACACAGTTGGGTGAGGATTACACGGGGTATA
TGATATCGAAGATTAGGGGTTTGAAGTTCTGTTGATCCCGAATTAGGTCCCGTGCCACAA
AGGCTTTTAGGAGTGGAATTTAGTAAAGTTGTGCAAGACATTACCGGTTATTATGTGA
TATTGGAAGGATACTTCATGGTTGAGAATGTGAGAAAAGCTATAAAAATTGATGAACTCG
TGTTTCGATAGTCTCACAACCTTCCATGGTGGACGATGTCTTCTATGTTCTGCAGAGCTGTTG
TCGAAGGTCCATTTCCAATTCAAATATCAACTCTGTGATTGCAGTTTAAAGCAGTGCTGTA
AGTCTATTAGGCGGTGAGTTCAATGAGGCTTTGCAACAGAAAGTCAGAGAGCCTAATCTT
GGAGCCAAGCTGTTCTCTGGCGGCGTTGCTGTACAAAAGAATGGTACAGAGATTGCCACG
GCTTTGAATAATATGGATGTGAGTGGTGAAGTATGCATTGAAATTACGGCATGAGATTGAA
GAACAATGTGCTGAGGTGTTTTCTGCACCAGCAGATAGAGAGAGGGTCAAATCATGTTTA
TCTGAATTAATGAGACAAGCAATGGTTTCAAGAAGGCCTTGAACATTGGCTTGGAAACAA
CTAGTGGCTACTGTGACGCCTCGAATTCGGCCAGTGTGGATACTGTTGCAACAATCAGT
TATGAGCTGTCTGAATCTGAATATGCTGACAATGAGGTAATGACCCATGGGTTCAAAGG
CTTCTCCATGCGGTAGAGACCAATGTGGCTTGGCTTCAACCATTAATGGCTGCTAACAATT
ATGACTCGTTTGTACATCTGGTCATTGACTTTGTTGTTAAGAGGCTTGAGGTTATCATGAT
GCAAAGAGATTCAAGTCAACTTGGTGGTCTTCAACTTGACAGAGATATTCGAGCACTTGT
GAGCTACTTCTCCAACATGACCCAGAGGACTGTTAGGGACAAGTTTGCTCGTCTAACCCA
AATGGCTACAATATTAACCTTGGAGAAGGTCTCTGAGATTCTGGATTTCTGGGGTGAGAA
CTCAGGACCCATGACCTGGCGACTTACTCCAGCTGAGGTTAGAAGAGTGTGAGTTTGAG
GGTTGACTTCAAATCTGAGGCAATATCGGCTCTAAGTTGTAA

Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziertes Beutefragment (TI52)

Unterstrichen: *Silencing*-Fragment (415 bp)

Grün: COG4-Domäne

SIEP1 (82,6 kDa)

MASDEGNTLDSSRLKFGTPEALEEVRNLTDVGD MTRLLHECIA YQRALDLELDTILSHRS DLD
 KQLSGLQKSAQVLDIVKADADHLFSNISSTSLADQVSAKVRQLDLGQSRVNDTLRIDAIVD
 RSNCLDGVRKALASEDFESAANYVQTFLQLDAKYKDSAASDQRDQLLASKKQLEGIVRRKL
 AEAVDQRDHSTVLRFIRLYPPLALEEEGLQVYVMYLKKVIAMRSRLEYEQLVEMMSDQQGS
 SQNQLNFV SCLTNLFKDIVLAIENDET LRSLCGEDGIVY AICELQE ECDSRGSTIIKKYMEYRK
 LAKVTSEINSYKSDLLSVGIEGPDPRDIEVYLEEILSLTQLGEDYTYMISKIRGLSSVDP ELGPR
 ATKAFRSGNF SKVVQDITGYVILEGYFMVENVRKA IKIDELVFDSLTTSMVDDVFYVLQSCC
 RRSISTSNNINSVIAVLSSAVSLLGGEFNEALQQKVREPNLGAKLFSGGVA VQKNGTEIATALNN
 MDVSGEYALKLRHEIEEQCAEVFSAPADRERVK SCLSELNETSNGFKKALNIGLEQLVATVTP
 RIRPVLDTVATISYELSESEYADNEVNDPWPVQRLLHAVETNVAWLQPLMAANNYDSFVHLVI
 DFVVKRLEVIMMQKRFSQLGGLQLDRDIRALVS YFSNMTQRTVRDKFARLTQMATILNLEKV
 SEILDFWGENSGPMTWRLTPAEVRRVLSLRVDFKSE AISALKL

Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziertes Beuteprotein

Grün: COG4-Domäne

Das zu SIEP1 nächste Homolog in *Arabidopsis* weist ebenfalls eine COG4-Domäne und Ähnlichkeiten zu PPR-Proteinen auf (At4G01400; TAIR: *The Arabidopsis Information Resource*-Datenbank; Protein F3D13.1). Eine Funktion dieses Proteins ist bislang nicht beschrieben.

SIPRR (Klone NI4, NI71) – *Pseudo-Response Regulator*

(homologer CDS in SGN-Datenbank: SGN-U317075; 99 % Sequenzidentität)

Vollständige, kodierende Sequenz: 2373 bp

ATGAGGAGCGTTCGGATGGACTCAATTGGTCCCCCACTAAAAGGTTGGTGGAACTCAAC
 CGTCATAGCATA CAGGATGGTCAG AATGGTGTAAGGGATGGGATTACTGGTGATGGACA
 GGGGCTTTCAGAAGAAGATGAGTCAAGGATTAATGAGGATGTCGAAGGTGGGAATGAAA
 CACAGAGGGATTTGTTACAAGTGCAGGNTGTTTTACAGACACAGCAGCAACAGCCCCA
 GGGCCTTTGGTTAGGTGGGAGCGTTTTCTTCCTCTTAGATCCCTCAAGGTTCTGCTGGTAG
 AAAATGATGATTCAACTCGTCATGTTGTCAGTGCATTGCTGCGAACTGCAGTTATGAAG
 TTATAGCTGTGGGATATGCCCTTGAAGCATGGAGGATTTTAGAAGATCTAACTAACCATG
 TTGATCTTGTCTGACGGAGGTGGCCATGCCATTTTTGTCTGGTGTGGTCTTTTGTCAA
 GATTATGAACCACAAA ACTCTCAAGAATGTCCAGTGATTATGATGTCTGCTAATGACTC
 TATGGGTATAGCTTTAAGTGTGTGCA AAGGGCGCAGTTGACTTTTTAGTGAAGCCTATT
 CGAAAGAATGAGCTTAAA AATCTGTGGCAGCATGTTTGGAGGAAATGCCATAGTTCAAG
 CGGAAGTGGAAGTGAAAGTGGTATACAACTCAAAGTTCGACGAAATCTAAAAGTGTG
 AAATGTCGGGAAACAACACTGATAGCAATGATGAAGCTGAGAATGGAAGCTTNGATCTG
 GACGACAGGGACGGAAGTGACAATGGAAGTGGCACTCAGAGTTCGTGGTCTAAAAGGGC
 CATTGAAGTCGACAGCCCCAACCCATGTCACCATGGAATGAATTGGCAGATCCCCCTGA
 TAGCACTTGTGCCAGGTTATCCATTCAAGACCAGAAGCACTTAGTGCTACCTGGGTGCC
 TGCAAATGCCACAAGAAGATGTCTCAATGAGAAGGATGAACTGGGAAATGTTAGAACGG
 TAAAGATTTGAACATGGGCGTTGCTAATGTTCCAGAGCTCGAAGGCCTATCAGGTAAAG
 TTATGGATGGTTTAGCAGCTTCTATGAAGGACAAACATTTGGAGTTAGATCCTAAAGATA
 ATGAGAATATGGGTAGAAACCTAAAGCTGAACAAGGAAACACGGGAAGATGACCTGAA
 GGACAAGGATGTTGGTTATATGGGTGACATAACCAACACATGTACGCCTCAAGTAGAAA
 GTACTGCCAATGAAGTCCAAATGATCCTTCCAAGATCACAAACATCAAAGAAATTGCCA
 CCTATGACAGTAAAGACATGCCTTCACTTGA ACTTAGTTTGAAGCAACTTCGAGATGTTG
 GAGAGAATGGGACTGGTGTGCAAGAGCGAAATATACTCAGGCATTCAGATCTGT CAGCG
 TTCTCTAGGTATAATGCTGCTTCAACTGCTAATCAGGCTCCA ACTGGAAACGTGGGCAGC
 TGTTCAACAGTTAATAATAGTT CAGAAGTTGCAAAAAGCAGAATCAATTCACAACTTGCAA
 TCCAAGTCGAGCAGTACCCTAATCAGCGCTCAAATGGAAGTAGTAACAACAATGACAT
 GGGCTCGTCGACAAATAATTTCTTCATCAAACCAGACACATTAATTGACAAACCAATAAA
 CAAACCTGCAGTCAATGCCATTCTGTTCTGCATTTCAACCAGTGCAACATGGACATACT
 TCTTCTTCAAGCAATGGTTCAGGAACACAAGATACTGCAAAGGCAGCCGTGGGCCAA

GCAAGAGCAATGCACCAGAAGTTCCAAGTTCAGCACCACCATCATCACTACCATCACCAT
CACCACCATGTGCTTAGCTTGCAGCAGCGACAACAGCTGCTTAATGCTGATGCTTCGTCTT
TGCGAAATGCTGTTGAAACTGCTCCCGATTGTGGAACATCTGACATGGTAGGTACTCCTG
TTGAAGGAAATGCTGCTAATTATGGAAGTGCATCAGGAAGTAACAATGGAAGCAATGGG
CAAAATGGAAGCAGTGGCCAAAATGGGAGCAGCACTGCTGTAGTTGCTGAAGGAACCAA
TTTGGTTGCTGAAAATGAAACTGGTGAAAAATGTGAAATTGGAAGTGGGAGTGGAAGTG
CAACTAGAAGTGGTGATCACTCGGCTCAACGAGAGGGCTGCTCTGATTA AATTCGGCAA
AGAGGAAGGAGAGATGCTTTGAGAAGAAGGTCCGGTACCAGAGTAGAAAGAGACTTGCA
GAACAAAGGCCACGCATGCGAGGGCAATTTGTGCGTCAAGATGCAGACAAAAGTAAAAG
CAACAATACAAATTCCTCACCCCTACCGTTTGAATTGGATGGTTGA

Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziertes Beutefragment (beide isolierte Klone (NI4, NI71) enthielten cDNA-Fragment identischer Sequenz)

Unterstrichen: *Silencing*-Fragment (459 bp)

Rot: *Pseudo-Receiver*-Domäne

Blau: CCT-Motiv des *Pseudo-Response Regulators*

SIPRR (86,2 kDa)

MRSVRMDSIGPPTKRLVELNRHSIQDQNGNVRDGITGDGQGLSEEDSRINEDVEGGNETQR
DLLQVQXVLQTQQQPPGPLVRWERFLPLRSLKVLVENDDSTRHVVSALLRNCSEYEVIAVG
YALEAWRILEDLTNHVDLVLETVAMPFLSGVGLLSKIMNHKTLKNVPVIMMSANDSMGIVFK
CLSKGAVDFLVKPIRKNELKNLWQHVVWRKCHSSSGSGSESGIQTQKSTKSKSVEMSGNNTDS
NDEAENGXDLDDRDGSDNGSGTQSSWSKRAIEVDSPQPMSPWNEADPPDSTCAQVIHSRP
EALSATWVPANATRCLNEKDELGNVRTVKDLNMGVANVPELEGLSGKVM DGLAASMKD
KHLELDPKDNENMGRNLKLNKETREDDLKDKDVGYMGDITNTCTPQVESTANEVPNDPSKI
TNIKEIATYDSKDMPSLELSLKQLRDVGENGTGVQERNILRHSDL S AFSRYNAASTANQAPTG
NVGSCSPVNNSEVAKAESIHNLSKSSSTPNQRSNGSSNNNDMGSSSTNFFIKPDTLIDKPIN
KPAVNAHSCSAFQPVQHGHTSSLQAMVPGTQDTAKAAVGQARAMHQKFQVQH HHHHHYHH
HHHHVLSLQQRQQLNADASSLRNAVETAPDCGTSDMVGTPVEGNAANYGSASGSNNGSN
GQNGSSGQNGSSTA VVAEGTNLVAENETGEKCEIGSGSGSATRSGDHS AQREALIKFRQKR
KERCFEKKVRYQSRKRLAEQRPRMRGQFVRQDADKSKSNNTNSSPLPFELDG

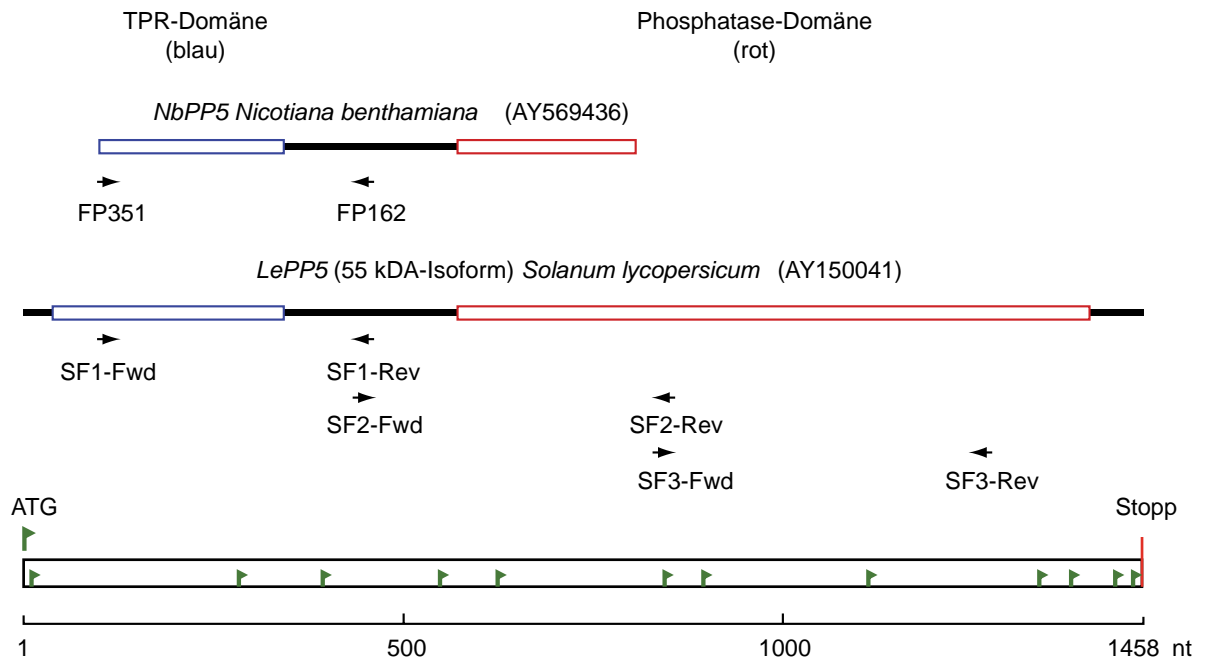
Grau unterlegt: in Hefe-Dihybrid-Sichtung identifiziertes Beuteprotein

Rot: *Pseudo-Receiver*-Domäne

Blau: CCT-Motiv des *Pseudo-Response Regulators*

A2

Sequenzcontig erstellt für die homologen *PP5*-EST-Fragmente aus Tomate (AY150041) und *Nicotiana benthamiana* (AY569436).



Die Pfeile kennzeichnen die Oligonukleotide, mit denen die *Silencing*-Fragmente *SF1* bis *SF3* amplifiziert wurden (siehe TAB2).

A3

Sequenzalignment für *LePP5* (AY150041, CDS: 1458 bp) aus Tomate und *NbPP5* (AY569436, CDS: 698 bp; unvollständig) aus *Nicotiana benthamiana*.

Vergleich der homologen Sequenzabschnitte:

LePP5_Fragment	97	GCTATTGATCTGTACACACAAGCGATTGAGTTGAACCGTGAGAATGCGGTGTACTATGCT
NbPP5_Fragment	1	GCTATTGATCTGTACACACAAGCGATTGAGTTGAACAGTGAGAATGCGGTGTACTGGGCT
LePP5_Fragment	157	AACCGTGCCTTTGCTCACACCAAATTGGAGGAATATGGAAGCGCAATACAGGATGGA
NbPP5_Fragment	61	AATCGTGCCTTTGCTCACATACCAAATTGGAGGAATATGGCAGCGCAATACAGGATGCAGCT
LePP5_Fragment	217	AGAGCTATTGAAATGTACCCTAGATATTCAAAGGGTATTATAGGACAGGAGCTGCATAT
NbPP5_Fragment	121	AAGGCTATTGAAACTGTACCCTAAATATTCGAAGGGTATTATAGGCCAGGGGCTGCATAT
LePP5_Fragment	277	TTGGCAATGGGCAAGTTCAAAGATGCCTCAAGGATTTTCAACAGGTCAAGAAATTATGT
NbPP5_Fragment	181	TTGGCAATGGGTAAGTTCAAAGATGCCCTCAAGGATTTTCAACGGTCAAGAACTTATGT
LePP5_Fragment	337	CCAAACGACCCAGATGCTACCAAAAAATGAAGGAATGTGAGAAAGCTGTCATGAAGCTA
NbPP5_Fragment	241	CCAAACGATCCAGATGCTACCAAGAAATGAAGGAATGTGAAAAAGCTGTCATGAAGCTA
LePP5_Fragment	397	AAATTTGAAGAAGCTATTTCTGTCCCAGAATCTCAGAGCGTTCAGTAGCTGACTCTATT
NbPP5_Fragment	301	AACTTTGAAGAAGCTATTTCTGTCCCAGAATCTCAGAGACGTTCAGTAGCTGACTCTATT
LePP5_Fragment	457	GATTATCGTTCTGTAGAGGTGGAGCCTCAATATGCTGGTGCAAGATAGAGGGAGATGTT
NbPP5_Fragment	361	GATTATCTCACCGTAGAAGTGGAGCCTCAGTATACTGGTGCAAGATAGAGGGAGATGTT
LePP5_Fragment	517	GTAACATTAGATTTTGTGAAGAAGATGCTGGATGACTTCAAAAACCAGAAGAACTTGCAT
NbPP5_Fragment	421	GTAACATTAGATTTTGTGAAGAAGATGCTGGATGACTTCAAAAACCAGAAGAAATTACAT
LePP5_Fragment	577	AAGAGGTATGCCTACCAATAGTACTGCAACAAGAGAAATGTTGCGAGCCTGCCTCC
NbPP5_Fragment	481	AAAAGATATGCCTACCAAGTAGTTCTGCAACAAGAGAAATGCTGCGAGCATTGCCTCC
LePP5_Fragment	637	CTTGTGACATCTGTGTTCCGAAGGGAAACACTTCACTGTATGTGGTGATGTACATGGT
NbPP5_Fragment	541	CTCGTGGATATCATTTGTTCCGAAGGGAAAACACTTCACTGTATGTGGTGATGTACATGGT
LePP5_Fragment	697	CAGTTTATGACCTCTAAATATTTTCGACCTCAATGGGCTTCCATCAGAAGACAATCCG
NbPP5_Fragment	601	CAGTTTATGACCTCTAAATATTTTCGACCTCAATGGGCTTCCATCAGAAGACAATCCG
LePP5_Fragment	757	TATCTGTTCAATGGTGATTTTGTGATAGAGGGTCTTT
NbPP5_Fragment	661	TATCTGTTCAATGGTGACTTTGTTGATAGAGGGTCTTT

Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe von CLUSTALW2 und BOXSHADE3.21 erstellt. Identische Nukleotide sind schwarz hinterlegt.

A4

Sequenzierte Abschnitte der *SICesA*-cDNA-Inserts der Klone #1946 und #2009 (Konsensussequenz). Die beiden Klone wurden im Überexpressionsscreen basierend auf einer verstärkten *Bs4*-HR gesichtet. Die cDNA-Inserts sind identisch (im sequenzierten Bereich) und weisen Homologie zu einer Zellulosesynthase auf.

1946/2009_pK7FWG2-35S-Fwd-Sequenz (394 bp)

TGAAAGGGTTGGATGGCCTTCAGGGTCCTATGTATGTGGGAACTGGGTGTTGTTTTAACA
 GGCAGGCCCTTTACGGGTATGATCCTGTATTAACTGAGGCTGATTTGGAGCCAAACATCA
 TTGTTAAGAGCTGTTGTGGTGGGTCAAGGAAGAAGGGAAGGAGTGGAACAAGAAATAC
 ATTGATAAGAAGAGGGCAGTAAAAAGAACAGAATCCACTGTCCCAATTTTCAATATGGA
 AGACATTGAAGAAGGCGTAGAAGGATATGATGAGGAGAAGTCACTGCTTATGTCACAGA
 GGAGCTTGGAGAAGCGATTTGGTCAATCACCAGTGTATTATTGCTGCCACATTTATGGAAC
 AAGGAGGCATTCCTGCATCCACTAATCCTGCATCTCT...

Unterstrichen: erstes ATG nach *attB1*-Klonierungsstelle

1946/2009_pK7FWG2-Rev-Sequenz (402 bp, 100 bp bis Stopp-Kodon)

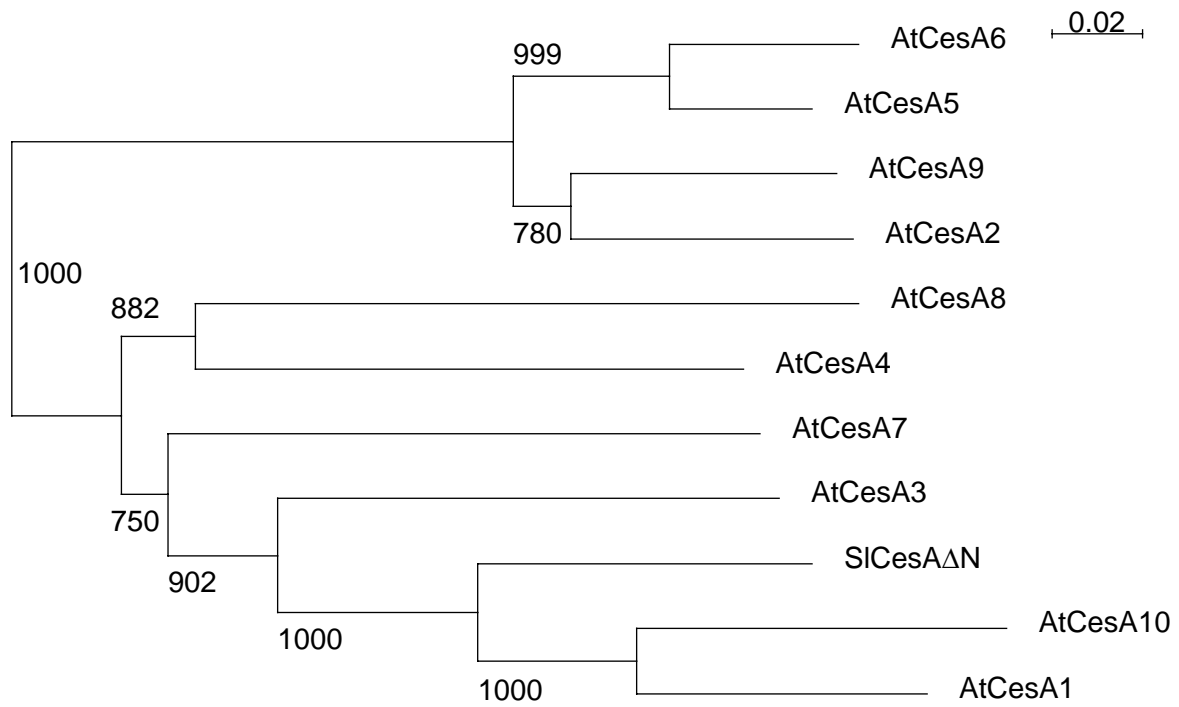
...CCTTGCATCCATATTCTCATTGCTTTGGGTGCGTATCGACCCCTTCACATCAGACGCGTC
 AAAGACTGCTGCAAGAGGTCAATGTGGTATCAACTGTTAGTGAGAAAGTTTATTTATTTTA
 AGGTAAGATGTTTGCTTATCCATTCCCATGTTGTATATAAAAAAACTATGCCGGTTCGGTT
 AAGTCCTGTAGTCATTTTGTACCAATGTTGTAAGTCGGAAGGAGTGTGATGCATGAAAGA
 CATCAAACTCATGGATTTACGCCTTTTTGTTGTATACCTTTTGCCCTATCTCACATGTTCA
 TGCAAAAACTGTGACTTATGATGTGAAAAATTTAAATTTAATTTTGTTTTCTTAAAAAAA
AA

Unterstrichen: potentielles Stopp-Kodon

Schwarz unterlegt: poly (A)-Sequenz

A5

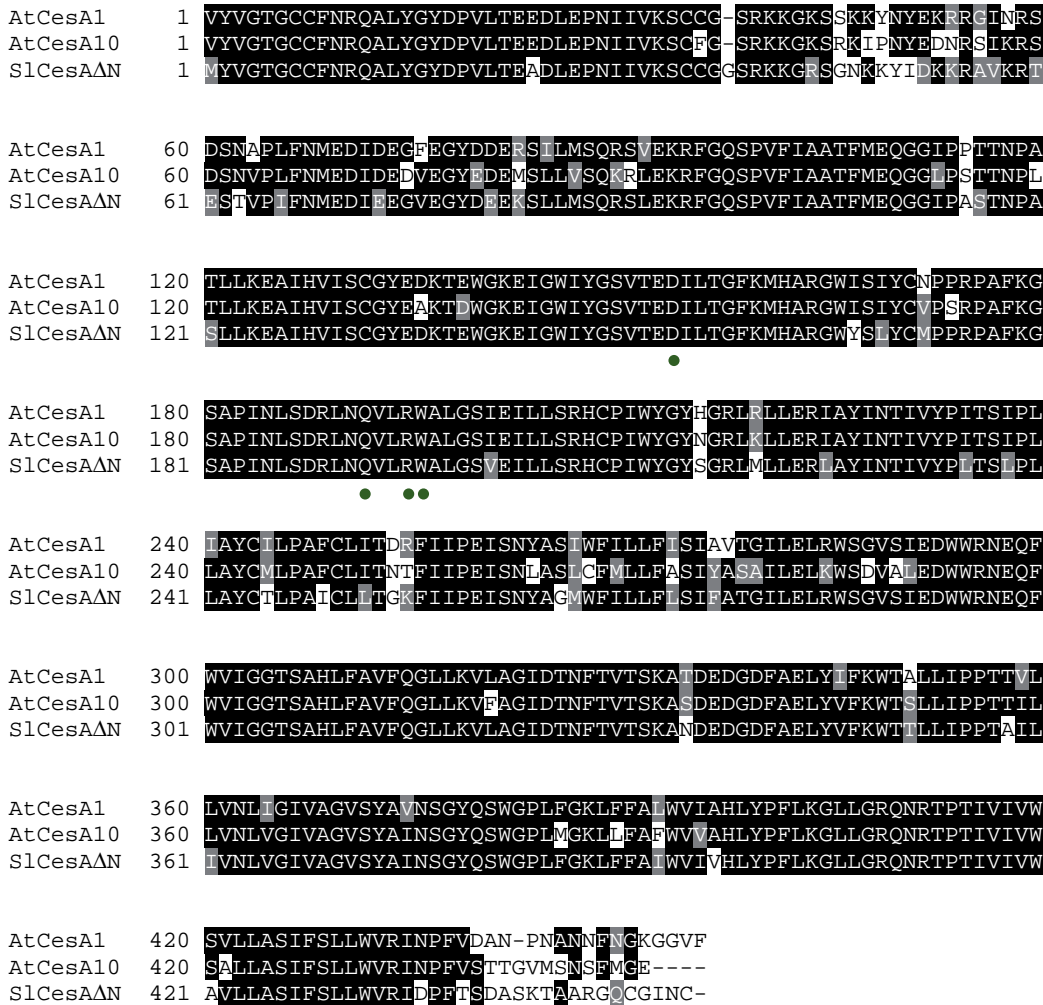
Phylogramm von SICesAΔN und den 10 bekannten CesA-Proteinen aus *Arabidopsis* (Vergleich über den homologen C-terminalen Bereich; je etwa 450 AS; siehe Sequenzalignment A6).



Das Phylogramm wurde erstellt unter Verwendung von CLUSTALW2 und NJ-Plot. Die *bootstrap values* sind angegeben.

A6

Sequenzalignment von SlCesAΔN und den beiden nächsten CesA-Homologen, AtCesA1 und AtCesA10, aus *Arabidopsis* (Vergleich über den homologen C-terminalen Bereich).



Paarweises Sequenzalignment

Sequenz 1: AtCesA1	454 AS	Sequenzen 1:2	84%
Sequenz 2: AtCesA10	451 AS	Sequenzen 1:3	83%
Sequenz 3: SlCesAΔN	455 AS	Sequenzen 2:3	80%

Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe von CLUSTALW2 und BOXSHADE3.21 erstellt. Identische AS-Reste sind schwarz hinterlegt. Konservierte AS-Reste der Domäne B (D-QxxRW; x – beliebige AS; Arioli *et al.*, 1998) sind mit einem grünen Punkt markiert.

AtCesA1 (TAIR: At4g32410)
 AtCesA10 (TAIR: At2g25540)

A7

Sequenzierte Abschnitte der *SIHsp70*-cDNA-Inserts der Klone #2113 und #2152 (Konsensussequenz). Die beiden Klone wurden im Überexpressionsscreen basierend auf einer verstärkten *Bs4*-HR gesichtet. Die cDNA-Inserts sind identisch (im sequenzierten Bereich) und kodieren für ein Hsp70-Protein, das vermutlich im Zytoplasma lokalisiert.

2113/2152_pK7FWG2-35S-Fwd-Sequenz (552 bp)

CATTCATTTGATACATTTTTTTTTGGTTTTTCCGTCGTCATGGCCGGGAAAGGTGAAGG
 TCCGGCGATCGGTATAGATCTAGGAACTACTTACTCTTGCCTGGAGTTTGGCAGCATGA
 TCGTGTTGAGATTATTGCTAATGACCAAGGGAACAGGACGACTCCTTCTTACGTTGGTTTT
 ACTGATTCTGAGCGTCTCATTGGCGATGCTGCTAAGAATCAAGTCGCCATGAATCCTATT
 AACACCGTGTGGTATGCCAAGCGTCTTATTGGAAGGAGGTTCAAGTATGCCTCTGTACAG
 AGTGACATCAAAGTGTGGCCTTTTAAGGTTACTCCTGGACCTGGTGACAAGCCAATGATT
 GTTGTAACTACAAGGGAGAAGAGAAACAGTTTTCTGCTGAAGAAATCTCTTCCATGGTT
 CTTATTAAGATGAAGGAAATTGCCGAGGCCTTCCTGGGTCAACAGTGAAGAATGCTGTG
 GTTACTGTGCCTGCATACTTCAATGACTCGCAACGTCAGGCTACTAAGGATGCTGGTGTC
 ATATCTGGCT...

Unterstrichen: erstes ATG nach *attB1*-Klonierungsstelle

2113/2152_pK7FWG2-35S-Rev-Sequenz (764 bp, 563 bp bis Stopp-Kodon)

...TGGGTAAATTTGAGCTCTCTGGTATTCCTCCTGCTCCTAGGGGTGTGCCTCAGATCACG
 GTCTGCTTTGACATTGATGCCAATGGCCTCCTGAACGTCTCAGCTGAAGACAAGACCACT
 GGACAGAAGAACAAGATCACTATTACCAATGACAAGGGTAGGTTATCAAAGGAAGAAAT
 TGAGAAGATGGTCCAGGAAGCAGAGAGGTACAAGGCAGAGGATGAAGAGCACAAGAAA
 AAGGTTGAGGCCAAGAATGCACTTGAGAACTATGCCTACAACATGAGGAACACTATAAA
 GGATGATAAGATTAGTTCTAAGCTTAGTGCAGACGACAAGAAAAAGATTGAGGATGCCA
 TTGATCAGGCAATTTTCATGGCTTGATAGCAACCAGCTTGCTGAAGCTGATGAGTTTGAAG
 ATAAGATGAAGGAAGTGGAGAGCCTATGTAATCCCATAATTGCAAAGATGTACCAGGGT
 GCTGGTGGTGAGGCAGGTGCACCTATGGATGATGATGATGCTCCTCCAGCTGGTTCTACC
 GGTGCAGGCCCAAGATTGAGGAGGTCGATTAAGTGTGAACAGTTCTAGTTTTATTCTCA
 GTATAAACTATTCTATTATATTTGGTACTTTTTTATGTTTTTGGCTATATCGGTTTTGTCTATT
 TATTAAGCTGTTGAATGTTGATGGCTCTTTATATGAGTTCCATCGATTTTGAATTTTAAAT
 GACTATCCGTTGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Unterstrichen: potentielles STOPP-Kodon

Schwarz unterlegt: poly (A)-Sequenz

C-Terminus:

..GKFELSGIPPAPRGVVPQITVCFDIDANGILNVS AEDKTTGQKNKITITNDKGRLSKEEIEKMQ
 EAERYKAEDEEHKKKVEAKNALENYAYNMRNTIKDDKISSKLSADDKKKIEDAIDQAISWLD
 SNQLAEAEDEFEDKMKELSLCNPIIAKMYQGAGGEAGAPMDDDDAPPAGSTGAG**GPKIEVD**

Fettdruck und kursiv: konserviertes AS-Motiv zytoplasmatischer Hsp70-Proteine (Guy und Li, 1998).

TABELLE – TAB1: Verwendete Vektoren, Plasmide und Binärvektorkonstrukte			
Vektoren/Plasmide	Resistenz	Beschreibung/Insert	Referenz
pENTR/D-TOPO	Kan	Entry-Vektor, zur Klonierung von PCR-Produkten (<i>attL</i> flankiert)	Invitrogen
pENTR/D-TOPO_LePP5	Kan	<i>attL1-LePP5</i> (CDS)- <i>attL2</i>	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_TPR	Kan	<i>attL1-TPR-attL2</i> (TPR-Domäne (1.-151. AS) von LePP5)	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_PP	Kan	<i>attL1-PP-attL2</i> (Phosphatase-Domäne (152.-485. AS) von LePP5)	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_SlcpHsp70	Kan	<i>attL1-SlcpHsp70</i> (CDS)- <i>attL2</i>	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_SIEP1	Kan	<i>attL1-SIEP1</i> (CDS)- <i>attL2</i>	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_SIPRR	Kan	<i>attL1-SIPRR</i> (CDS)- <i>attL2</i>	diese Arbeit
pENTR/D-TOPO_SIPRRΔC	Kan	<i>attL1-SIPRRΔC</i> (Deletion der letzten 45 AS)- <i>attL2</i>	diese Arbeit
pGBKT7	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::MCS</i>	Clontech
pGBKT7_Bs4	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::Bs4</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Bs4-TIR	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::Bs4-TIR</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Bs4-NBS	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::Bs4-NBA</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Bs4-LRR	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::Bs4-LRR</i>	diese Arbeit
pGBKT7_LamC	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::LamC</i>	Clontech
pGBKT7_avrBs3Δ2	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::avrBs3Δ2</i> (Δ2.-152.AS)	Gürlebeck, 2007
pGBKT7_avrBs4Δ2	Kan	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::avrBs4Δ2</i> (Δ2.-152.AS; Δ34 AS vor <i>repeat</i> -Region)	Gürlebeck, 2007
pGBKT7_avrBs4Δ2N	Amp	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::avrBs4Δ2N</i> (Δ2.-152.AS)	M. Egler und Th. Lahaye, unveröffentlicht
pGBKT7_avrBs4Δ2Δ227	Amp	<i>ADHI:GAL4-BD-c-myc::avrBs4Δ227Δ2</i> (Δ2.-152.AS; <i>avrBs4</i> -Derivat mit 5,5 <i>repeats</i>)	Gürlebeck, 2007
pGADT7-Rec	Amp	Y2H-Bibliotheksvektor, <i>ADHI:GAL4-AD-HA</i>	Clontech
pGADT7-Rec_TI7	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: RNA-Bindeprotein	diese Arbeit
pGADT7-Rec_TI18/TI26/TI34	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: NiR (Nitritreduktase)	diese Arbeit
pGADT7-Rec_TI37/TI39/TI50	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: <i>SlcpHsp70</i>	diese Arbeit
pGADT7-Rec_TI52	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: <i>SIEP1</i>	diese Arbeit

TABELLE – TAB1: Verwendete Vektoren, Plasmide und Binärvektorkonstrukte			
Vektoren/Plasmide	Resistenz	Beschreibung/Insert	Referenz
pGADT7-Rec_ TI106/TI122/TI136	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: EP2 (exprimiertes Protein)	diese Arbeit
pGADT7-Rec_ TI54/TI99/TI143	Amp	Bibliotheksklon, TIR-Int., Insert: TIM (Triosephosphat- Isomerase)	diese Arbeit
pGADT7-Rec_NI4/NI71	Amp	Bibliotheksklon, NBS-Int., Insert: <i>SIPRR</i>	diese Arbeit
pGADT7	Amp	<i>ADHI:GAL4-AD-HA</i>	Clontech
pGWB5	Kan, Hyg, Cm	<i>35S:attR::GFP</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB5_ <i>LePP5</i>	Kan, Hyg	<i>35S:LePP5::GFP</i>	diese Arbeit
pGWB5_ <i>SlcpHsp70</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SlcpHsp70::GFP</i>	diese Arbeit
pGWB5_ <i>SIEP1</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SIEP1::GFP</i>	diese Arbeit
pGWB5_ <i>SIPRR</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SIPRR::GFP</i>	diese Arbeit
pGWB5_ <i>SIPRRΔC</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SIPRRΔC::GFP</i>	diese Arbeit
pGWB6	Kan, Hyg, Cm	<i>35S:GFP::attR</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB14	Kan, Hyg, Cm	<i>35S:attR::3xHA</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB14_ <i>LePP5</i>	Kan, Hyg	<i>35S:LePP5::3xHA</i>	diese Arbeit
pGWB14_ <i>TPR</i>	Kan, Hyg	<i>35S:TPR::3xHA</i> (TPR- Domäne (1.-151. AS) von <i>LePP5</i>)	diese Arbeit
pGWB14_ <i>PP</i>	Kan, Hyg	<i>35S:PP::3xHA</i> (Phosphatase-Domäne (152.- 485. AS) von <i>LePP5</i>)	diese Arbeit
pGWB14_ <i>SlcpHsp70</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SlcpHsp70::3xHA</i>	diese Arbeit
pGWB14_ <i>SIEP1</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SIEP1::3xHA</i>	diese Arbeit
pGWB14_ <i>SIPRRΔC</i>	Kan, Hyg	<i>35S:SIPRRΔC::3xHA</i>	diese Arbeit
pGWB14_ <i>GFP</i>	Kan, Hyg	<i>35S:GFP::3xHA</i>	Schornack, 2006
pGWB14_ <i>NbHsp90-2</i>	Kan, Hyg	<i>35S:NbHsp90-2::3xHA</i>	S.P. Dinesh-Kumar; Schornack, 2006;
pGWB20	Kan, Hyg, Cm	<i>35S:attR::10xc-myc</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB20_ <i>GFP</i>	Kan, Hyg	<i>35S:GFP::10xc-myc</i>	Schornack, 2006
pGWB20_ <i>Bs4</i>	Kan, Hyg	<i>35S:Bs4::10xc-myc</i>	Schornack, 2006
pGWB20_ <i>Bs4-LRR</i>	Kan, Hyg	<i>35S:Bs4-LRR::10xc-myc</i>	Schornack, 2006
pSPYNE-35S-GW	Kan, Cm	<i>35S:attR::c-myc-YN</i> (<i>attR</i> kloniert <i>XbaI/XhoI</i> in MCS von pSPYNE (Walter <i>et al.</i> , 2004)	Schornack, 2006
pSPYNE-35S-GW_ <i>LePP5</i>	Kan	<i>35S:LePP5::c-myc-YN</i>	diese Arbeit
pSPYNE-35S-GW_ <i>Bs4</i>	Kan	<i>35S:Bs4::c-myc-YN</i>	Schornack, 2006
pSPYNE-35S- GW_ <i>NbHsp90-2</i>	Kan	<i>35S:NbHsp90-2::c-myc-YN</i>	Schornack, 2006
pGWB735.1	Kan, Hyg, Cm	<i>35S:HA-YC::attR</i> in <i>HindIII/SacI</i> von pGWB1 (Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)	Schornack, 2006
pGWB735.1_ <i>LePP5</i>	Kan, Hyg	<i>35S:HA-YC::LePP5</i>	diese Arbeit
pGWB735.1_ <i>Bs4</i>	Kan, Hyg	<i>35S:HA-YC::Bs4</i>	Schornack, 2006

TABELLE – TAB1: Verwendete Vektoren, Plasmide und Binärvektorkonstrukte			
Vektoren/Plasmide	Resistenz	Beschreibung/Insert	Referenz
pGWB735.1_ <i>NbHsp90-2</i>	Kan, Hyg	<i>35S:HA-YC::NbHsp90-2</i>	Schornack, 2006
pK7T1WG2	Spec, Cm	<i>35S:attR::TIA1</i> (TIA1: 4xc-Myc-6xHis-3C-3xHA-Strep) in <i>HindIII/BamHI</i> von pK7FWG2 (Karimi <i>et al.</i> , 2002)	R. Morbitzer und Th. Lahaye, unveröffentlicht
pK7T1WG2_ <i>Bs4</i>	Spec	<i>35S:Bs4::TIA1</i>	R. Morbitzer
pK7T1WG2_ <i>avrBs4Δs227R6</i>	Spec	<i>35S: avrBs4s227R6::TIA1</i> (synthetisches <i>avrBs4</i> -Derivat mit 6 <i>repeats</i>)	R. Morbitzer, S. Schornack und Th. Lahaye, unveröffentlicht
pVS227	Kan	<i>35S:avrBs4Δ227</i> (C-terminales Deletionsderivat von <i>avrBs4</i> , mit 5,5 <i>Repeats</i> ; Vektor: pVB60-Derivat)	Schornack <i>et al.</i> , 2004
pTRV1	Kan	<i>Silencing</i> -Vektor mit <i>RNA1</i> des Tabak-Rattlevirus (TRV)	Liu <i>et al.</i> , 2002a
pTRV2 (pYL279)	Kan, Cm	<i>Silencing</i> -Vektor mit <i>RNA2</i> des Tabak-Rattlevirus (TRV); enthält <i>attR</i> -Kassette	Liu <i>et al.</i> , 2002a
pTRV2_ <i>NbEDS1</i>	Kan	<i>Silencing</i> -Fragment <i>NbEDS1</i>	S. Schornack
pTRV2_ <i>GFP</i>	Kan	<i>Silencing</i> -Fragment <i>GFP</i>	S. Schornack
pTRV2_ <i>NbPDS1</i>	Kan	<i>Silencing</i> -Fragment <i>NbPDS1</i>	S. Schornack
pTRV2a (pYL279a)	Kan, Amp, Cm	<i>Silencing</i> -Vektor mit <i>RNA2</i> des Tabak-Rattlevirus (TRV); enthält <i>attR</i> -Kassette und Amp-Kassette	P. Römer und Th. Lahaye, unveröffentlicht
pTRV2a_ <i>LePP5-SF1</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment 1 (<i>LePP5-SF1</i> ; 360 bp)	diese Arbeit
pTRV2a_ <i>LePP5-SF2</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment 2 (<i>LePP5-SF2</i> ; 417 bp)	diese Arbeit
pTRV2a_ <i>LePP5-SF3</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment 3 (<i>LePP5-SF3</i> ; 437 bp)	diese Arbeit
pTRV2a_ <i>SlcpHsp70_sil</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment <i>SlcpHsp70</i>	diese Arbeit
pTRV2a_ <i>SIEP1_sil</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment <i>SIEP1</i>	diese Arbeit
pTRV2a_ <i>SIPRR_sil</i>	Kan, Amp	<i>Silencing</i> -Fragment <i>SIPRR</i>	diese Arbeit
pYL436	Spec, Cm	<i>35S:attR::TAPa</i>	Rubio <i>et al.</i> , 2005
pYL436_ <i>Bs4</i>	Spec	<i>35S:Bs4::TAPa</i>	diese Arbeit
pYL436_ <i>avrBs4Δ227R2</i>	Spec	<i>35S:avrBs4Δ227R2::TAPa</i> (synthetisches <i>avrBs4</i> -Derivat mit 2 <i>repeats</i>)	diese Arbeit
pYL436_ <i>avrBs4Δ227R6</i>	Spec	<i>35S:avrBs4Δ227R6::TAPa</i> (synthetisches <i>avrBs4</i> -Derivat mit 6 <i>repeats</i>)	diese Arbeit

Vektoren/Plasmide	Resistenz	Beschreibung/Insert	Referenz
pDONR222 TM .F1	Kan	Bibliotheksausgangsvektor; mit <i>attP</i> -Kassette (<i>attP1-ccdB-Cm-attP2</i>)	Invitrogen
pK7FWG2	Spec, Cm	<i>35S:attR::GFP</i>	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pK7FWG2_#1946	Spec	Bibliotheksklon #1946, Insert: <i>SlCesAΔN</i>	diese Arbeit
pK7FWG2_#2009	Spec	Bibliotheksklon #2009, Insert: <i>SlCesAΔN</i>	diese Arbeit
pK7FWG2_#2113	Spec	Bibliotheksklon #2113, Insert: <i>SlHsp70</i>	diese Arbeit
pK7FWG2_#2152	Spec	Bibliotheksklon #2152, Insert: <i>SlHsp70</i>	diese Arbeit
p19 (pBin6Ip19)	Kan	<i>35S:p19</i>	Voinnet <i>et al.</i> , 2003

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Referenz
M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAG	Kolonie-PCRs, Sequenzierungen von <i>Entry</i> -Plasmiden	Invitrogen
M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGAC		Invitrogen
<i>T7-Sequencing Primer</i>	GTAATACGACTCACTATAGGGCG A	Kolonie-PCRs, Sequenzierungen von pGADT7- bzw. pGBKT7-Konstrukten	Clontech
<i>3'-AD-Sequencing Primer</i>	AGATGGTGCACGATGCACAG		Clontech
<i>3'-DNA-BD-Sequencing Primer</i>	TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT AC		Clontech
UPM (<i>universal primer -long</i>)	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE-Analysen	Clontech
NUP (<i>nested universal primer</i>)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		Clontech
LePP5-Y2H-Fwd/ <i>EcoRI</i>	CACCGAATTCATGCCCGGTATGG AAGCTGAG	Amplifikation der <i>LePP5</i> -CDS aus Tomaten-cDNA für Klonierung in pGADT7 (über <i>EcoRI/SalI</i>) und in pENTR/D-TOPO; RT-PCR-Analysen	diese Arbeit
LePP5-Y2H-Rev/ <i>SalI</i> (ohne Stopp)	GGGGTCGACAGAAAACATGCGAA GGAAG		
LePP5-TPR-Rev	AATAGAGTCAGCTACTGAACGCC TC	Amplifikation der <i>TPR</i> -kodierenden Region	diese Arbeit
LePP5-PP-Fwd	CACCATGAGGCGTTCAGTAGCTG ACTCTATTG	Amplifikation der Phosphatase (<i>PP</i>)-kodierenden Region	diese Arbeit
LePP5-SF1-Fwd	CACCGCTATTGATCTGTACACAC AAGCG	Amplifikation von <i>LePP5</i> - <i>Silencing</i> -Fragmenten, RT-PCR-Analysen	diese Arbeit
LePP5-SF1-Rev	AATAGAGTCAGCTACTGAACGCC TC		

TABELLE – TAB2: Verwendete Oligonukleotide			
Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Referenz
LePP5-SF2-Fwd	CACCGAGGCGTTCAGTAGCTGAC TCTATTG	von <i>LePP5-Silencing-Fragmenten</i> , RT-PCR-Analysen	diese Arbeit
LePP5-SF2-Rev	GCTGATGGACACATGCACTTGAA GGC		
LePP5-SF3-Fwd	CACCGCCTTCAAGTGCATGTGTCC ATCAGC		
LePP5-SF3-Rev	CCTTCATCCTTCACTTCATGAGAT CGC		
TRV2-Fwd	CATTGTTACTCAAGGAAGCACGA TGAG	Kolonie-PCRs, Überprüfung von pTRV2a- Konstrukten mittels PCR	S. Hahn
TRV2-Rev	CAAGATCAGTCGAGAATGTCAAT CTCGTAG		
RT-TRV1-Fwd1	AACTAGTTGTAACATCACATCTA CCTGCAG	RT-PCR-Analysen (<i>TRV1</i>)	R. Szczesny
RT-TRV1-Rev1	ATACTGTATTCAACCTTGTACTGC GC		
RT-CaElo-A01	ATTCACATCAGCATTGTGGTCATT GGCCAC	RT-PCR-Analysen (<i>EF-1a</i>)	R. Szczesny
RT-CaElo-B01	CTGGGCAGCCTTGGTGACCTTGG CACCAG		
RT-EDS1-Fwd	ATGGTGAGAATTGAAGAGGGGAG AGAAG	RT-PCR-Analysen (<i>EDS1</i>)	diese Arbeit
RT-EDS1-Rev	CAATAGGGCCACCCGACGAGTGC CCTGC		
SlcpHsp70_RACE-R2	CATCTTCCTTCCAATGAATCTCTT CACTG	RACE-Analysen	diese Arbeit
SIEP1_RACE-R1	GTCGTTAACACGCGACTGACCTA G	RACE-Analysen	diese Arbeit
SIEP1_RACE-R4	CAGATGCAAGTGCCTTACGTACA CCGTC		
SIEP1_RACE-R7	GTATCCAGTTCTAGATCTAGGGCT CGTTG		
SIEP1_RACE-F3	GCAGAGCTGTTGTGCGAAGGTCCA TTTC		
SIEP1_RACE-F4	CGTGTTTCGATAGTATCACAACCTT C		
SIPRR_RACE-R3	CTACCAGCAGAACCTTGAGGGAT CTAAG	RACE-Analysen	diese Arbeit
SlcpHsp70-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTCATGGCGTCTTCAACTG CTCAAATTC	Amplifikation der <i>SlcpHsp70</i> -CDS aus Tomaten- cDNA; Klonierung über BP- Rekombination	diese Arbeit
SlcpHsp70-attB2- w/o Stopp	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCCTTGCTGTGCGGTGAAAT CAGCATC		
SlcpHsp70_sil-Fwd	CACCTCAGTGAAGAGATTCATTG GAAGGAAGATG	Amplifikation des <i>Silencing-Fragmentes</i>	diese Arbeit
SlcpHsp70_sil-Rev	GCAGTGGGTCATTAATTATCCG AAG		

TABELLE – TAB2: Verwendete Oligonukleotide			
Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Referenz
SIEP1-ATG-Fwd	CACCATGGCTTCCGACGAAGGAA CCAATTTAG	Amplifikation der <i>SIEP1</i> -CDS aus Tomaten-cDNA für Klonierung in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
SIEP1-w/oSTOPP- Rev	CAACTTAAGAGCCGATATTGCCT CAG		
SIEP1_sil-Fwd	CACCGATCTAGGTCAGTCGCGTG TTAACGAC	Amplifikation des <i>Silencing</i> - Fragmentes	diese Arbeit
SIEP1_sil-Rev	GCTGATCACTCATCATTTCAACCA ATTGC		
SIPRR-ATG-Fwd	CACCATGAGGAGCGTTCGGATGG ACTCAATTG	Amplifikation der <i>SIPRR</i> -CDS aus Tomaten-cDNA für Klonierung in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
SIPRR-w/oSTOPP- Rev	GATCACTCGGCTCAACGAGAGGC TG		
SIPRRΔCCT w/oSTOPP-Rev	AATCAGAGCAGCCTCTCGTTGAG CCGAG	Amplifikation des <i>SIPRRΔCCT</i> – Derivates für Klonierung in pENTR/D-TOPO	diese Arbeit
SIPRR_sil-Fwd	CACCAGGGATGGGATTACTGGTG ATGGACAG	Amplifikation des <i>Silencing</i> - Fragmentes	diese Arbeit
SIPRR_sil-Rev	GACTATACCCATAGAGTCATTAG CAGAC		
Y2H-TIR-Fwd (<i>MunI</i>)	GGCAATTGGCATCTTCTTCTTCTT CTTCTGCAAG	Amplifikation <i>Bs4</i> - <i>TIR</i> -kodierende Domäne, <i>MunI</i> - und <i>SalI</i> -flankiert	diese Arbeit
Y2H-TIR-Rev (<i>SalI</i>)	GGGTGACCCGTTACGGATATCA TATCCTTTTAG		
Y2H-NBS-Fwd (<i>MunI</i>)	GGCAATTGCTAAAAGGATATGAT ATCCGTAACG	Amplifikation <i>Bs4</i> - <i>NBS</i> -kodierende Domäne, <i>MunI</i> - und <i>SalI</i> -flankiert	S. Schornack
Y2H-NBS-Rev (<i>SalI</i>)	GGGTGACCCCCGTATAGTCTAT CATCACTTC		diese Arbeit
Y2H-LRR-Fwd (<i>MunI</i>)	GGCAATTGGTTGAAGATTTCAA GAAGTGATG	Amplifikation <i>Bs4</i> - <i>LRR</i> -kodierende Domäne, <i>MunI</i> - und <i>SalI</i> -flankiert	diese Arbeit
Y2H-LRR-STOP- Rev (<i>SalI</i>)	GGGTGACTTATGATCTTTGTTTC TTAGAAGAGG		S. Schornack
pK7FWG2-35S-Fwd	CATTCATTTGGAGAGGACTGCA GGACG	Amplifikation und Sequenzierung der cDNA-Inserts der Überexpressions- bibliothek	S. Schornack
pK7FWG2-GFP- Rev	GACACGCTGAACTTGTGGCCGTT TACG		

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, für Ihre Betreuung und die Begutachtung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Lahaye. Vielen Dank für deine Unterstützung bei zahlreichen praktischen und theoretischen Fragen, dein Engagement und die vielen hilfreichen Diskussionsrunden.

Patrick, Jana, Tina (S), Robert (M), Sabine, Tom, Andrea sowie Kristin, Tina (J) und Sebastian möchte ich für die vielen schönen Labortage und die zahlreichen Hilfen im Laboralltag danken. Jens, vielen Dank für deine Hilfe im letzten Abschnitt dieser Arbeit. Es hat viel Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten.

Bei Carola, Marina und Hannelore möchte ich mich für die Unterstützung im Laboralltag, für die zahlreichen Sequenzierarbeiten und die Hilfe bei Hochdurchsatz-Experimenten bedanken. Außerdem möchte ich Bianca für die Anzucht und Pflege unzähliger Pflanzen danken. Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für ihre Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre. Dankeschön!

Bei Prof. Dr. Christoph Peterhänsel und Dr. Flora Schuster möchte ich mich für die Vermittlung theoretischer und praktischer Kenntnisse für die Erstellung transgener Pflanzen bzw. für die Generierung einer transgenen BY-2-Zellkulturlinie bedanken. Dr. Jörg Fuchs und Dr. Kenneth Berendzen danke ich für ihre Kooperation im Rahmen der Arbeiten des Graduiertenprogramms.

Robert (S) danke ich für seine zahlreichen Hilfen am Computer und im Labor und für seine aufmunternden Worte zwischendurch. Sabine, Kristin und Martin möchte ich für die vielen abwechslungsreichen Stunden nach der Arbeit danken.

Meiner Familie danke ich für ihre stete Unterstützung. Ganz besonders danke ich Axel für seine Geduld und Unterstützung.

Vielen Dank!

Veröffentlichungen

Jordan, T., Römer, P., Meyer, A., Szczesny, R., Pierre, M., Piffanelli, P., Bendahmane, A., Bonas, U. and Lahaye, T. (2006) Physical delimitation of the pepper *Bs3* resistance gene specifying recognition of the AvrBs3 protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Theor Appl Genet **113**, 895-905.

Review:

Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T. and Lahaye, T. (2006) Gene-for-gene mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. J Plant Physiol **163**, 256-272.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Annett Strauß (geb. Meyer)
Anschrift: Siegfriedstraße 56
38106 Braunschweig
Geburtsdatum: 07.03.1978
Geburtsort: Greiz

AUSBILDUNG

1984 – 1992 Karl-Marx-Oberschule (Realschule Zaschberg) Greiz
1992 – 1996 Pestalozzigymnasium Greiz
1996 – 1997 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
1997 – 2002 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
2002 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas
Thema: „Markersichtung am Paprika-*Bs3*-Locus mittels subtraktiver Hybridisierung“
Abschluss: Diplom-Biologin
2003 – 2009 Promotion am Institut für Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas, Forschungsgruppe Dr. Th. Lahaye
Thema: „Identifizierung und funktionale Charakterisierung von Komponenten der *Bs4*-vermittelten Resistenz“
2005 – 2008 Stipendium des Graduiertenprogramms „Pflanzliche Proteinkomplexe – Struktur, Funktion und Evolution“
seit 05/2009 Mutterschutz und Elternzeit

Braunschweig, den 11.11.2009

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.

Braunschweig, den 11.11.2009

Annett Strauß