

Molekulare und funktionelle Charakterisierung der
Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ aus
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Herrn Robert Szczesny

geb. am: 29.07.1977 in der: Lutherstadt Eisleben

Gutachter /in:

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Dierk Scheel
3. Prof. Dr. Michael Göttfert

Halle (Saale), 25.01.2009

*Für Alfred,
mit dem alles begonnen hat*

&

*Für Claudia,
ohne die sich nichts zu beenden lohnt*

Zusammenfassung

Das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate. Essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist das Typ-III-Sekretionssystem, mittels dessen über 20 Effektorproteine in die Pflanzenzelle transloziert werden. In suszeptiblen Pflanzen leisten die Effektorproteine vermutlich einen Beitrag zur Virulenz des Bakteriums, in resistenten Pflanzen hingegen werden einzelne Effektoren vom pflanzlichen Immunsystem erkannt, woraufhin eine Resistenzantwort, wie die hypersensitive Reaktion (HR) initiiert wird. Die HR ist ein lokaler Zelltod an den Infektionsstellen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die molekulare und funktionelle Charakterisierung der drei Effektorproteine AvrBs1, AvrBsT und XopJ aus *Xcv*. AvrBs1 und AvrBsT induzieren die HR in resistenten Paprikapflanzen, wohingegen XopJ nicht erkannt wird. *In planta*-Expressionsstudien zeigten jedoch, dass XopJ die HR in Nicht-Wirtspflanzen, darunter *Physalis peruviana* und drei *Nicotiana*-Spezies, auslöste. AvrBsT und XopJ sind zwei mögliche Cysteinproteasen mit Ähnlichkeit zum Typ-III-Effektorprotein YopJ aus humanpathogenen *Yersinia*. Interessanterweise ist ein konservierter Cysteinrest (ein Teil der vorhergesagten katalytischen Triade) in AvrBsT und XopJ erforderlich für die HR-Induktion beider Proteine. Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass XopJ ein mögliches N-Myristoylierungsmotiv besitzt, welches in AvrBsT fehlt. Das N-Myristoylierungsmotiv erlaubt die Acylierung und somit die Lokalisierung von XopJ an der Plasmamembran, wie mittels mikroskopischer Methoden mit einem Fusionsprotein aus XopJ und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) gezeigt wurde. Interessanterweise ist das N-Myristoylierungsmotiv wichtig für die Membranlokalisierung und die HR in Nicht-Wirtspflanzen. Im Gegensatz zu XopJ lokalisiert AvrBsT im Zytoplasma und im Zellkern. AvrBsT besitzt Proteaseaktivität und supprimiert spezifisch die AvrBs1-induzierte HR in resistenten Paprikapflanzen. Da die Suppression innerhalb der Pflanzenzelle stattfindet, wurden mittels Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen pflanzliche Interaktionspartner von AvrBs1 und AvrBsT isoliert. Es wurden verschiedene Interaktoren von AvrBs1 und AvrBsT isoliert und mittels Virus-induziertem Gen-„Silencing“ auf ihre Relevanz in Bezug auf die AvrBs1-HR getestet. Dadurch konnte der AvrBsT-Interaktor SnRK1 als notwendige Komponente der AvrBs1-induzierten HR identifiziert werden, andere Resistenzreaktionen waren hingegen nicht betroffen. SnRK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Ähnlichkeit zu SNF1, einem Regulator des Kohlenhydratstoffwechsels, zeigt. Mit Proteinanalysen und quantitativer RT-PCR konnte kein Einfluß von AvrBsT auf das *SnRK1*-Transkript oder das SnRK1-Protein nachgewiesen werden. Die erworbenen Daten deuten darauf hin, dass ein Effektor einer konservierten Familie die Abwehrreaktion in Paprika spezifisch unterdrücken kann, indem er mit SnRK1 interagiert.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* is a plant pathogenic bacterium that causes bacterial spot disease in pepper and tomato. Pathogenicity of *X. campestris* pv. *vesicatoria* depends on a type III secretion system that translocates about 20 effector proteins into the host plant cell. Type III effectors probably contribute to bacterial virulence in susceptible plants. In resistant plants, however, individual effector proteins are detected by the plant surveillance system, which initiates subsequent defense responses such as the hypersensitive reaction (HR), a local cell death at the infection site. Main focus of this work was the molecular and functional characterization of the effector proteins AvrBs1, AvrBsT and XopJ from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. AvrBs1 and AvrBsT induce the HR in resistant pepper plants, whereas XopJ is not recognized. However, *in planta* expression studies revealed that XopJ induces the HR in non-host plants, including *Physalis peruviana* and three *Nicotiana* species. AvrBsT and XopJ are two predicted cysteine proteases with similarity to the type III effector protein YopJ from the animal pathogen *Yersinia*. Notably, a conserved cysteine residue in AvrBsT and XopJ, which is part of the predicted catalytic triad, is essential for HR induction by both proteins. Comparative sequence analysis revealed that XopJ possesses a putative N-myristoylation motif, which is absent in AvrBsT. The N-myristoylation motif allows acylation and thus membrane localization of XopJ as was shown by microscopic studies using a fusion protein between XopJ and the green fluorescent protein (GFP). Notably, the N-myristoylation motif is essential for both membrane localization of XopJ and HR induction in non-host plants. In contrast to XopJ, AvrBsT localizes to the plant cytoplasm and the nucleus. AvrBsT is an active protease and specifically suppresses the AvrBs1-induced HR in resistant pepper plants. Since the HR suppression takes place within the plant cell, plant interaction partners of AvrBs1 and AvrBsT were isolated using yeast-two-hybrid screens. Seven interactors of AvrBs1 and eight interactors of AvrBsT were identified and their contribution to the induction of the AvrBs1-specific HR was tested by virus-induced gene silencing. These experiments revealed that the AvrBsT-interactor SnRK1 is essential for the induction of the AvrBs1-specific HR but not for other resistance reactions. SnRK1 is a serine/threonine kinase with similarity to SNF1 from yeast, which is a regulator of carbohydrate metabolism. Protein studies and quantitative real-time PCR analysis did not reveal any influence of AvrBsT on protein stability of SnRK1 or on the *SnRK1* transcript. Taken together, the data suggest that a member of the conserved cysteine protease family of type III effectors specifically suppresses defense reactions in pepper by interacting with SnRK1.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Thieme F., Szczesny R., Urban A., Kirchner O., Hause G. and Bonas U. (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant-Microbe Interact* 20(10): 1250-1261

Gürlebeck D., Jahn S., Gürlebeck N., Szczesny R., Szurek B., Hahn S., Hause G. and Bonas U. (2008) Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4. *Mol Plant Pathol* Published Online: Nov 2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Die Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien	1
1.1.1 Das Typ-III-Sekretionssystem	2
1.1.2 Der Aufbau und die Substrate des T3SS	3
1.2 Die Typ-III-Effektorproteine und ihre Funktion	4
1.2.1 Die Identifizierung von Typ-III-Effektoren	4
1.2.2 Die Suppression der pflanzlichen Basalabwehr durch Typ-III-Effektoren.....	6
1.2.3 Die Induktion der spezifischen Abwehr durch Typ-III-Effektoren	8
1.2.4 Die Suppression der spezifischen Abwehr durch Typ-III-Effektoren.....	11
1.3 Die Gattung <i>Xanthomonas</i>	13
1.3.1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	13
1.4 Die Typ-III-Effektorproteine von <i>Xcv</i>	14
1.5 Die Typ-III-Effektoren der YopJ-Familie aus <i>Xcv</i>	16
1.6 Vorarbeiten	18
1.7 Ziele der Arbeit.....	19
2 Material & Methoden.....	20
2.1 Nährmedien und Antibiotika	20
2.2 Bakterienstämme	21
2.3 Verwendete Pflanzen und Anzuchtbedingungen	21
2.4 <i>Xcv</i> -Inokulationsexperimente	21
2.5 Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen.....	22
2.5.1 Tomate-cDNA-Bibliothek	22
2.5.2 Verwendete Datenbanken.....	23

2.6	Nukleinsäuren.....	23
2.6.1	RNA-Isolierung	23
2.6.2	cDNA-Synthese	23
2.6.3	5'- und 3'- RACE („rapid amplification of cDNA ends“)... ..	24
2.6.4	Isolierung genomischer Pflanzen-DNA (Minipräparation)	24
2.6.5	Isolierung hochmolekularer pflanzlicher DNA (Maxipräparation)	25
2.7	Quantitative Echtzeit-qRT-PCR („quantitative real-time PCR“)	25
2.7.1	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	26
2.7.2	Auswertung der Echtzeit-PCR	26
2.7.2.1	Schwellenzyklus	26
2.7.2.2	Quantifizierung des C _T	27
2.7.2.3	Effizienzbestimmung und -optimierung.....	28
2.7.2.4	Normalisierung nicht konstitutiv exprimierter Gene	29
2.8	Gerichtete Klonierung in pENTR/D-TOPO.....	30
2.9	Klonierung durch Rekombination mittels GATEWAY-System	31
2.10	Binärvektoren für TRV-VIGS.....	32
2.10.1	Erstellung der Silencing-Konstrukte	33
2.10.2	VIGS-Infiltrationsmethoden	34
2.11	Fluoreszenzmikroskopie	34
2.11.1	GFP-Fluoreszenzmikroskopie	34
2.11.2	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	35
2.12	Proteasetest.....	35
2.12.1	Splicing by overlap extension PCR	35
2.13	Koimmunpräzipitation (KoIP) von Protein-Protein-Interaktionen.....	36
2.14	SDS-Gel-Elektrophorese und Westernblot	36
2.14.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	37
2.14.2	Proteinmengenbestimmung.....	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Das Effektorprotein XopJ besitzt ein N-Myristoylierungsmotiv	39
3.1.1	XopJ akkumuliert in Zellwandnähe pflanzlicher Zellen.....	40

3.1.2	Die Analyse der XopJ-vermittelten HR in <i>N. benthamiana</i>	44
3.2	Die Erkennung von AvrBs1, AvrBsT und XopJ in verschiedenen Pflanzenspezies	45
3.3	Die Analyse der AvrBsT-vermittelten Suppression der AvrBs1-HR	47
3.4	Die Lokalisierung der Effektorproteine AvrBsT und AvrBs1	49
3.5	Die Isolierung pflanzlicher Interaktionspartnern von AvrBs1 und AvrBsT	50
3.5.1	Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBs1-Interaktionspartnern	50
3.5.2	Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBsT-Interaktionspartnern	51
3.5.3	Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBsT _{C222A} -Interaktionspartnern	52
3.6	Die Analyse der Interaktoren von AvrBs1 und AvrBsT	53
3.6.1	Die biologische Relevanz der Interaktoren	54
3.6.2	Die Beeinflussung anderer HR durch das <i>SnRK1</i> -„Silencing“	55
3.6.3	Die Quantifizierung des <i>SnRK1</i> -„Silencing“	57
3.7	Die Analyse der SnRK1 aus Tomate	59
3.7.1	Die Interaktionen von SnRK1 in Hefe	59
3.7.2	Die Interaktionen von SnRK1 <i>in planta</i> mittels KoIP	59
3.7.3	Die Interaktionen von SnRK1 <i>in planta</i> mittels BiFC	60
3.8	Die Klonierung des <i>SnRK1</i> -Gens aus Paprika	61
3.8.1	Die Struktur und Eigenschaften der SnRK1	62
3.8.2	Die SnRK1 akkumuliert im Zytoplasma und im Zellkern	63
3.9	Der Einfluss von AvrBsT auf die SnRK1	64
3.9.1	AvrBsT besitzt Proteaseaktivität	64
3.9.1.1	AvrBsT besitzt keine SUMO-Proteaseaktivität	65
3.9.2	Beeinflusst AvrBsT das pflanzliche SnRK1-Protein?	66
3.9.3	Der Einfluss der Effektoren AvrBs1 und AvrBsT auf das <i>SnRK1</i> -Transkript	67
3.10	Y2H-Analysen zur Identifizierung von SnRK1-Interaktoren	69
4	Diskussion & Ausblick	71
4.1	XopJ besitzt ein N-Myristoylierungsmotiv und lokalisiert an der pflanzlichen Plasmamembran	71
4.1.1	Subzelluläre Lokalisierung der Effektoren XopJ, AvrBsT und AvrBs1 und ihre Erkennung in Pflanzen	73

4.2	Die Identifizierung von Virulenzzielen von AvrBs1 und AvrBsT	74
4.2.1	Die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen <i>in planta</i>	75
4.2.2	Die mögliche Bedeutung der Interaktoren für die Virulenz	76
4.2.3	Die biologische Relevanz der Interaktoren für die AvrBs1-HR.....	79
4.3	AvrBsT ist ein Effektor mit Proteasefunktion	80
4.4	Die SnRK1, ein multifunktionaler Regulator in Pflanzen	83
4.4.1	Die mögliche Regulation der SnRK1-Aktivität durch Effektoren.....	84
4.4.2	Die Rolle der SnRK1 bei abiotischem Stress.....	85
4.4.3	Die Rolle der SnRK1 bei biotischem Stress	86
	Literaturverzeichnis	89
	Danksagung.....	112
	Publikationen	113
	Anhang	114
	Lebenslauf.....	118
	Erklärung.....	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell des T3SS in <i>Xanthomonas</i>	4
Abbildung 2: Die Gen-für-Gen-Hypothese nach Flor.....	8
Abbildung 3: Modelle der Erkennung von Effektoren.....	10
Abbildung 4: Die Rolle der Typ-III-Effektoren in der Wirt-Pathogen-Interaktion.....	12
Abbildung 5: Krankheitsbilder von <i>Xcv</i> -infizierten Paprika- und Tomatenpflanzen.....	14
Abbildung 6: AvrBsT supprimiert die AvrBs1-HR in Paprika ECW-10R.....	18
Abbildung 7: C _T -Wert-Ermittlung der Amplifikationen.....	27
Abbildung 8: Eichgerade zur Ermittlung des Anstiegs und der Effizienz.....	28
Abbildung 9: Die VIGS-Vektoren pTRV1, pTRV2 und pTRV2a.....	33
Abbildung 10: N-Myristoylierungsmotiv von XopJ, XopE1 und XopE2.....	39
Abbildung 11: XopJ-GFP akkumuliert in Epidermiszellen nahe der Zellwand.....	41
Abbildung 12: XopJ-GFP akkumuliert an der pflanzlichen Plasmamembran in Mesophyllzellen.....	43
Abbildung 13: Nachweis der XopJ-GFP-Fusionsproteine.....	44
Abbildung 14: Analyse der XopJ-HR in <i>N. benthamiana</i>	45
Abbildung 15: Test auf Suppression der AvrBs1-HR durch Mitglieder der AvrRxx-Familie.....	48
Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisierung von AvrBsT und AvrBs1 in <i>N. benthamiana</i>	49
Abbildung 17: Test der AvrBs1-spezifischen HR nach Interaktor-„Silencing“.....	55
Abbildung 18: VIGS der Gene <i>SnRK1</i> und <i>T-Abc</i> in <i>C. annuum</i> ECW-123-Pflanzen.....	57
Abbildung 19: Schema des <i>SnRK1</i> -homologen Gens aus Paprika.....	58
Abbildung 20: Quantifizierung des <i>SnRK1</i> -„Silencing“ mittels qRT-PCR.....	58
Abbildung 21: <i>In planta</i> -Interaktion von AvrBs1 und AvrBsT mit SnRK1 und 1-TYR.....	61
Abbildung 22: Übersicht der <i>SnRK1</i> -Sequenz aus Paprika und homologen Fragmenten.....	62
Abbildung 23: Annotation konservierter Motive der SnRK1 aus Paprika.....	63
Abbildung 24: SnRK1 akkumuliert im Zytoplasma und im Zellkern.....	63
Abbildung 25: AvrBsT zeigt Proteaseaktivität.....	65
Abbildung 26: Immunoblot SUMO-konjugierter Pflanzenproteine.....	66
Abbildung 27: SnRK1-Proteinstabilität in Anwesenheit von AvrBs1 oder AvrBsT.....	67
Abbildung 28: <i>SnRK1</i> -Transkript in Anwesenheit von AvrBs1 und AvrBsT in Paprika.....	68
Abbildung 29: <i>SnRK1</i> -Transkript in Anwesenheit von AvrBs1 und AvrBsT in Tomate.....	69
Abbildung 30: Interaktionsschema der Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ in der Pflanzenzelle.....	78
Abbildung 31: Vergleich von Acetylierung und Proteolyse.....	82
Abbildung 32: Modell einer möglichen SnRK1-Signalkaskade.....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Typ-III-Effektoren aus <i>Xcv</i> und ihre mögliche biologische Funktion.....	17
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	21
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide	38
Tabelle 4: HR-Induktion von AvrBs1, AvrBsT und XopJ in verschiedenen Pflanzenspezies.....	47
Tabelle 5: Mit AvrBs1 und AvrBsT interagierende Proteinfragmente aus Tomate	53
Tabelle 6: Interaktoren der SnRK1 aus Paprika	70

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avr</i> , Avr	Avirulenz
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
Bp	Basenpaare
Bs	„bacterial spot“
cDNA-AFLP	„complementary DNA amplified fragment length polymorphism“
CFP	„cyan fluorescent protein“, blau-fluoreszierendes Protein
cv.	Kulturvarietät, Kultivar
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
ECW	„Early Cal Wonder“, Kultivar von <i>Capsicum annuum</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GFP	„green fluorescent protein“, grün-fluoreszierendes Protein
Hop	„hrp outer protein“
hpa, Hpa	„hrp associated“, hrp-assoziiert
HR	„hypersensitive response“, hypersensitive Antwort, hypersensitive Reaktion
hrc, Hrc	„hrp conserved“, hrp-konserviert
hrp, Hrp	„hypersensitive response and pathogenicity“, hypersensitive Antwort und Pathogenität
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
mRNA	„messenger RNA“, Boten-RNA
NLS	„nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
Pv.	Pathovar
R, R	Resistenz
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Subspezies
T3SS	„type III secretion system“, Typ-III-Sekretionssystem
qRT-PCR	quantitative "reverse transcribed PCR", Reverse Transkription und PCR
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xop	„Xanthomonas outer protein“
YFP	„yellow fluorescent protein“, gelb-fluoreszierendes Protein
Yop	„Yersinia outer protein“

1 Einleitung

Pathogen-assoziierte Krankheiten von Nutzpflanzen verursachen jährlich erhebliche Ernteeinbußen und können auch heute noch zu Hungersnöten führen (www.fao.org). Pflanzen bieten Pathogenen optimale Lebensbedingungen, können sich aber mit Hilfe ihres ererbten „Immunsystems“ gegen die Mehrzahl pathogener Organismen wehren. Daher gelingt es nur spezialisierten Pathogenen, das pflanzliche Immunsystem zu überwinden und eine Pflanze zu besiedeln. Die Pflanzung von Monokulturen begünstigt die großflächige Ausbreitung spezialisierter Pathogene (Shipton, 1977).

Zu den Pflanzenpathogenen zählen Viren, Nematoden, Pilze und Bakterien. Es gibt Gram-positive und Gram-negative pflanzenpathogene Bakterien. Zu den Gram-positiven zählen Erreger aus den Gattungen *Clavibacter* (Ringfäule) und *Streptomyces* (Schorf); zu den Gram-negativen zählen Vertreter der Gattungen *Agrobacterium* (Gallen), *Xylella* (Chlorose), *Erwinia* (Weichfäulen), *Pseudomonas* (Blattflecken und Brände) und *Xanthomonas* (Blattflecken und Brände) (Agrios, 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten pflanzenpathogenen Bakterien kommen im Wasser und im Boden vor oder haften kollektiv als Biofilm an ihren Wirtsorganismen. Sie verbreiten sich passiv über Regen und Wind und vermehren sich nach der Infektion im Interzellularraum des pflanzlichen Wirtsgewebes (Goode & Sasser, 1980; Kniskern et al, 2007; McInnes et al, 1988). Zwischen Pathogenen und Pflanzen gibt es ein ständiges Wettrüsten zwischen Mechanismen der Virulenz und der pflanzlichen Abwehr.

1.1 Die Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien

Pflanzen sind resistent gegenüber einer ganzen Reihe nicht-pathogener Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli* oder *Pseudomonas fluoreszens*, die eine basale Abwehrreaktion auslösen (Gómez-Gómez & Boller, 2002; Nürnberger et al, 2004). Gram-negative phytopathogene Bakterien haben daher im Verlauf der Evolution eine Reihe von Virulenzfaktoren erworben, welche die Besiedlung der Pflanzen ermöglichen oder erleichtern. Virulenzfaktoren sind z. B. Exopolysaccharide (EPS), Lipopolysaccharide (LPS), Adhäsine und extrazelluläre Enzyme (Alfano & Collmer, 1996; Dow et al, 1995; Kao et al, 1992; Newman et al, 2000; Rojas et al, 2002). Die schleimige EPS-Hülle, mit der sich viele Bakterien umgeben, schützt vor dem Austrocknen und vor hydrophoben Molekülen, dient aber auch der Anreicherung von Nährstoffen und der Immobilisierung toxischer Substanzen im Wirtsgewebe. EPS kann die Suszeptibilität der Pflanze erhöhen und die Virulenz des Pathogens steigern (Denny & Baek,

1991; Yun et al, 2006). Außerdem hat EPS adhäsive Eigenschaften und unterstützt Adhäsine bei der Anheftung des Bakteriums an die Wirtszelle (Coplin & Cook, 1990; Ray et al, 2002; Rojas et al, 2002). EPS und Adhäsine fördern, zusammen mit Typ 4-Pili, auch die Aggregatbildung der Bakterien untereinander (Bieber et al, 1998; Kang et al, 2002; Lindow & Brandl, 2003; Rojas et al, 2002). Typ 4-Pili und Flagellen dienen den Bakterien zur Fortbewegung auf Oberflächen und im wässrigen Milieu (Chesnokova et al, 1997; Kang et al, 2002; Liu et al, 2001; Tans-Kersten et al, 2004). Einige phytopathogene Bakterien sekretieren Phytohormone, Phytotoxine und Proteine, die die Besiedlung des Wirtes erleichtern (Strange, 2007; Tsavkelova et al, 2006).

Zur Sekretion der verschiedenen Substanzen nutzen pflanzenpathogene Bakterien spezielle Sekretionssysteme, die auch in Tierpathogenen verbreitet sind. Über das Typ-I-Sekretionssystem werden Proteasen, Toxine und Lipasen sekretiert (Binet et al, 1997; Delepelaire, 2004; Holland et al, 2005). Das Typ-II-Sekretionssystem sekretiert ebenfalls Toxine und hydrolytische Enzyme (Johnson et al, 2006; Sandkvist, 2001). Durch das Typ-III-Sekretionssystem werden Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert (Alfano & Collmer, 1997; Tampakaki et al, 2004). Das Typ-IV-Sekretionssystem, z. B. aus *Agrobacterium* spp., transportiert neben DNA auch Proteine (Cascales & Christie, 2003).

1.1.1 Das Typ-III-Sekretionssystem

Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor der meisten Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien und auch in pflanzlichen Symbionten von Bedeutung (He et al, 2004; Tampakaki et al, 2004). In den Phytopathogenen *Agrobacterium tumefaciens* und *Xylella fastidiosa* fehlt jedoch ein T3SS (Cornelis & Van Gijsegem, 2000; Simpson et al, 2000). Die T3SS-abhängige Sekretion von Proteinen, die erstmals bei *Yersinia enterocolitica* beschrieben wurde, erfolgt ohne Prozessierung und periplasmatische Zwischenstufen direkt in den Apoplasten oder das Zytoplasma der Wirtszellen (Heesemann et al, 1984).

Das T3SS wurde erstmals durch die Analyse nicht-pathogener *Pseudomonas syringae* identifiziert (Lindgren et al, 1986; Niepold et al, 1985). Die Komponenten des T3SS werden in phytopathogenen Bakterien von einem *hrp*-Gen-Cluster (hypersensitive Reaktion und Pathogenität) kodiert (Alfano & Collmer, 2004; Tampakaki et al, 2004). In *hrp*-Genen mutierte Bakterien wachsen nicht in Pflanzengewebe, verursachen keine Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen und lösen auch keine Abwehrreaktionen in resistenten Wirts- und Nichtwirtspflanzen aus (Bonas et al, 1991; Lindgren et al, 1986). Unter den ca. 20 Hrp-Proteinen befinden sich elf Proteine, die in Pflanzen- und Tierpathogenen konserviert sind und deshalb als

Hrc-Proteine („Hrp-conserved“) bezeichnet werden. Sie bilden wahrscheinlich den Basalapparat des Typ-III-Sekretionssystems (Bogdanove et al, 1996; He et al, 2004; Tampakaki et al, 2004).

1.1.2 Der Aufbau und die Substrate des T3SS

Die Basis des T3SS bildet ein Apparat, der die innere und die äußere bakterielle Membran durchspannt (Abbildung 1) (Tampakaki et al, 2004). In pflanzenpathogenen Bakterien ist der Basalapparat mit einem Hrp-Pilus, einer Art extrazellulärer Röhre, assoziiert, durch die Proteine, wahrscheinlich in ungefaltetem Zustand, transportiert werden (He et al, 2004; Koebnik, 2001). Der Übertritt der Proteine vom Hrp-Pilus in das Zytoplasma der Pflanzenzelle erfolgt über ein Translokonprotein, das in die Plasmamembran der Wirtszelle inseriert ist. Das Translokon ist wahrscheinlich eine Pore, durch die Effektorproteine das pflanzliche Zytoplasma erreichen (Büttner & Bonas, 2002).

Die Substrate des T3SS sind extrazelluläre Komponenten des Sekretionssystems, wie z. B. Hrp-Pilus-Proteine und das Translokonprotein, sowie Typ-III-Effektorproteine. Einige Substrate werden über das T3SS in das extrazelluläre Milieu sekretiert, aber nicht ins Wirtszytoplasma transloziert. Dies sind sowohl die extrazellulären Bestandteile des Sekretionssystems (Pilusproteine und Translokon), als auch Harpine. Harpine sind kleine, hitzestabile Proteine, die möglicherweise die Translokation oder die Penetration der Zellwand durch den Hrp-Pilus unterstützen (He et al, 2004). Typ-III-Effektorproteine werden dagegen ohne extrazelluläre Zwischenschritte direkt in das Zytoplasma der eukaryotischen Wirtszelle transloziert (Alfano & Collmer, 2004; Tampakaki et al, 2004).

Das Erkennungssignal für Substrate des T3SS befindet sich vermutlich in der N-terminalen Region der Proteine (Anderson et al, 1999; Mudgett et al, 2000; Schechter et al, 2004). Obwohl es in den N-Termini keine konservierte Aminosäuresequenz gibt, sind gemeinsame Merkmale vorhanden. Dazu gehören fünf N-terminale hydrophile Aminosäurereste, eine Häufung von Serin- und Glycinresten, sowie das Fehlen saurer Reste innerhalb der ersten zwölf Aminosäuren (He et al, 2004; Tampakaki et al, 2004). Alternativ wird auch ein Typ-III-Sekretionssignal in der mRNA diskutiert (Anderson & Schneewind, 1997).

Der Transport von T3SS-Substraten kann von Typ-III-Sekretions-Chaperonen unterstützt werden, die an Translokonproteine oder einzelne Effektoren binden können (Badel et al, 2003; Büttner & Bonas, 2006; Parsot et al, 2003; Shan et al, 2004; Wehling et al, 2004). Außerdem gibt es globale Typ-III-Sekretions-Chaperone, die mehrere Effektoren binden können (Büttner et al, 2004; Büttner et al, 2006). Vermutlich werden die Typ-III-Substrate mit Hilfe der Typ-III-

Sekretions-Chaperone dem Sekretionsapparat zugeführt, stabilisiert und in partiell ungefaltetem Zustand gehalten (Büttner et al, 2006; Gaudriault et al, 2002; Losada & Hutcheson, 2005; Shan et al, 2004; Stebbins & Galan, 2001).

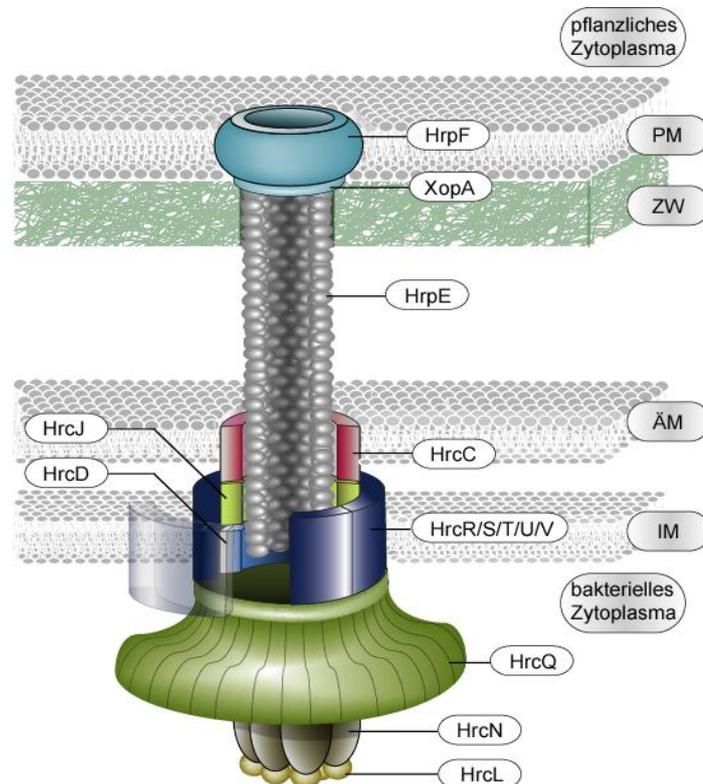


Abbildung 1: Modell des T3SS in *Xanthomonas*.

Die Hrc-Proteine bilden einen komplexen Apparat aus, der beide bakteriellen Membranen durchspannt. Der mit der Basis assoziierte, extrazelluläre Pilus durchzieht die pflanzliche Zellwand (ca. 200 - 500 nm). Den Abschluss des Systems bildet die Translokonpore in der Pflanzenmembran. Die Komponenten sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. HrpF = Translokonprotein, HrpE = Hauptkomponente des Pilus, HrcN = ATPase, HrcC = Sekretin, PM = Plasmamembran, ZW = Zellwand, ÄM = äußere Bakterienmembran, IM = innere Bakterienmembran. Abbildung nach (Berger et al, 2006).

1.2 Die Typ-III-Effektorproteine und ihre Funktion

1.2.1 Die Identifizierung von Typ-III-Effektoren

Die Begriffe Effektorprotein oder Effektor bezeichnen eine Gruppe von T3SS-Substraten, deren Funktion hauptsächlich innerhalb der Wirtszelle liegt (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Die ersten Effektoren wurden über ihre Funktion als Avirulenzfaktoren (Avr) identifiziert, da sie in resistenten Pflanzen die hypersensitive Reaktion (HR), einen schnellen, lokalen und programmierten Zelltod, auslösen (Ronald & Staskawicz, 1988; Staskawicz et al, 1984). Daher wird die Wirtsspezifität phytopathogener Bakterien über Effektoren mit Avr-Funktion

determiniert (Staskawicz et al, 1984; Swanson et al, 1988). In suszeptiblen Pflanzen agieren Avr-Proteine hingegen als Effektoren mit Virulenzfunktion (Bai et al, 2000; Gürlebeck et al, 2008; Ritter & Dangl, 1995).

Die Identifizierung von Effektoren ohne Avirulenzphänotyp ist ungleich schwerer. Nur wenige Effektoren scheinen einzeln eine erkennbare Bedeutung für die Virulenz des Bakteriums und deshalb einen selektierbaren Phänotyp zu haben (Angot et al, 2006; Bai et al, 2000; Ritter & Dangl, 1995; Swarup et al, 1991; Wichmann & Bergelson, 2004; Yang & White, 2004). Viele Effektoren ohne Virulenzphänotyp wurden über ihre Koregulation mit dem T3SS identifiziert. Interessanterweise sind alle bisher bekannten Typ-III-Effektoren aus *Pseudomonas* mit dem T3SS koreguliert, einige *Xanthomonas*-Effektoren hingegen konstitutiv exprimiert (Chang et al, 2005; Escolar et al, 2001; Noël et al, 2001; Xiao et al, 1994).

Die Sequenzierung von Bakteriengenomen eröffnete neue Möglichkeiten der Typ-III-Effektorisolierung, da nun bioinformatisch nach charakteristischen Motiven gesucht werden konnte (Bell et al, 2004; Buell et al, 2003; Da Silva et al, 2002; Thieme et al, 2005). Zu den Suchkriterien für Typ-III-Effektoren zählen Homologien zu bereits bekannten Effektoren, ein niedriger G+C-Gehalt, flankierende mobile Elemente, das Vorhandensein eukaryotischer Motive und / oder einer PIP-Box („plant-inducible promoter“) (Büttner et al, 2003; Collmer et al, 2002; Dobrindt et al, 2004; Greenberg & Vinatzer, 2003; Koebnik et al, 2006; Noël et al, 2001).

Neu identifizierte Typ-III-Effektoren wurden in *Yersinia* als „*Yersinia* outer protein“ (Yop), in *Pseudomonas* als „Hrp outer protein“ (Hop), in *Ralstonia* als Pop (nach der früheren Systematik „*Pseudomonas* outer protein“) und in *Xanthomonas* als „*Xanthomonas* outer protein“ (Xop) bezeichnet, es gibt aber auch Ausnahmen (Alfano & Collmer, 1997; Lindeberg et al, 2005; Noël et al, 2001). Pflanzenpathogene Xanthomonaden und Pseudomonaden translozieren ca. 15 – 30, *Ralstonia* wahrscheinlich über 40 Effektorproteine mittels T3SS in die Wirtszelle (Cunnac et al, 2004; Ghosh, 2004; Lindeberg et al, 2006; Thieme et al, 2005).

Mutationsstudien zeigten, dass der individuelle Beitrag eines Effektors zur Virulenz des Bakteriums schwer auszumachen ist und dass vermutlich mehrere Effektoren in Kombination wirken, vermutlich sogar funktionsredundant (Alfano & Collmer, 2004; Kunkel & Chen, 2006; Wichmann & Bergelson, 2004). Wesentliche Virulenzfunktionen von Typ-III-Effektoren sind vermutlich die Freisetzung von Nährstoffen aus der Pflanzenzelle und vor allem die Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr, wodurch das Wachstum der Bakterien im Interzellularraum gefördert wird (Alfano & Collmer, 2004; Jones & Dangl, 2006).

1.2.2 Die Suppression der pflanzlichen Basalabwehr durch Typ-III-Effektoren

Pflanzen besitzen kein adaptives Immunsystem, wie es bspw. in Tieren vorkommt, jedoch ist jede Zelle fähig, Pathogene zu erkennen und auf sie zu reagieren (Ausubel, 2005; Chisholm et al, 2006; Dangl & Jones, 2001). Grundlegend für das pflanzliche Immunsystems ist die Basalabwehr oder Nichtwirtsresistenz (Nürnberger et al, 2004). Neben passiven physikalischen Barrieren gegen das Eindringen von Pathogenen (Haare, Cuticula, Zellwand) besteht sie auch aus induzierbaren Abwehrmechanismen.

Solche induzierbaren Mechanismen sind z. B. Oberflächen-assoziierte Rezeptoren auf den Pflanzenzellen, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP)) oder MAMP („microbe-associated molecular patterns“) erkennen (Bittel & Robatzek, 2007; Nürnberger et al, 2004; Nürnberger & Kemmerling, 2006). PAMP sind konservierte Strukturen in essentiellen Komponenten der Pathogene, wie z. B. Lipopolysaccharide aus der Bakterienmembran, der Elongationsfaktor EF-Tu, bakterielle Kälteschockproteine, Harpin und Flagellin (Felix & Boller, 2003; Felix et al, 1999; Gómez-Gómez et al, 1999; Kunze et al, 2004; Lee et al, 2001; Meyer et al, 2001; Newman et al, 2002; Wei et al, 1992). Ein gut untersuchtes PAMP ist das 22 As große Peptid flg22 aus dem Flagellum (Zipfel & Felix, 2005). Das Flagellum dient der Fortbewegung von Bakterien, kommt im Wirt nicht vor und wird deshalb in Pflanzen als fremdartig oder „nicht-selbst“ erkannt (Gómez-Gómez & Boller, 2002). Der Rezeptor zur Perzeption von flg22 ist die Rezeptor-Kinase FLS2 (Zipfel & Felix, 2005). FLS2 besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne mit Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (LRR, „leucin rich repeat“), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne (Bittel & Robatzek, 2007). Folglich sind Mutanten in *fls2* stärker suszeptibel gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Sun et al, 2006; Zipfel et al, 2004).

In der Zelle erfolgt die Signalweiterleitung in der Regel über MAPK-Signalkaskaden (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und WRKY-Transkriptionsfaktoren (Asai et al, 2002; Eulgem et al, 1999; Eulgem & Somssich, 2007; Greenberg et al, 1994; Nürnberger & Scheel, 2001; Zhang & Klessig, 2001). Die Signalweiterleitung kann zudem über andere Prozesse, wie die Bildung von Ethen, Salizylsäure, reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid, sowie über Kalzium-Ionenflüsse verlaufen (Bittel & Robatzek, 2007; Fritig et al, 1998; Greenberg, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001). In der Folge wird eine Reihe von Genen, wie z. B. *PR*- („pathogenesis related“) Gene, angeschaltet, wodurch antimikrobielle Substanzen, wie PR-Proteine oder Phytoalexine gebildet werden (Dangl & Jones, 2001). Eine weitere Folge der Basalabwehr ist die Einlagerung von Kallose, Lignin und Suberin in pflanzliche Zellwände. Durch diese Zellwandverstärkung wird

der Austritt von Nährstoffen und Wasser beschränkt und die Zelle geschützt (Dangl & Jones, 2001).

Ein erfolgreiches Pathogen muss also zunächst die Basalabwehr der Pflanze überwinden, um eine Pflanze als Wirt nutzen zu können. Nachdem gezeigt wurde, dass *hrp*-Mutanten (kein T3SS) in suszeptiblen Pflanzen die Basalabwehr induzieren, während Wildtyp-Bakterien virulent sind, wurde vermutet, dass Typ-III-Effektoren die Basalresistenz unterdrücken können (Brown et al, 1995; He et al, 2007; Jakobek et al, 1993; Nomura et al, 2005).

Mittlerweile gibt es konkrete Beispiele für die Suppression der Basalabwehr durch Typ-III-Effektoren. Einige Effektoren, wie z. B. HopAO1 und HopAI1, deaktivieren MAPK, andere (z. B. AvrE1, HopM1) reduzieren die Salizylsäureproduktion und die Kalloseeinlagerung in die Zellwand (de Torres et al, 2006; DebRoy et al, 2004; Hann & Rathjen, 2007; Hauck et al, 2003; Kim et al, 2005; Zhang et al, 2007). So trägt der Effektor HopM1 zur Virulenz von *P. syringae* in *A. thaliana* und Tomate bei, indem er die Kalloseeinlagerung in die Zellwand supprimiert (Badel et al, 2006; DebRoy et al, 2004). HopM1 verursacht vermutlich einen Proteasom-abhängigen Abbau von Enzymen, bspw. dem G-Protein AtMIN7, einer Schlüsselkomponente der Signaltransduktion (Nomura et al, 2006). Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt, sicher ist jedoch, dass HopM1 direkt mit dem G-Protein interagiert (Nomura et al, 2006).

HopAO1 (früher HopPtoD2) aus *P. syringae* besitzt Tyrosin-Phosphataseaktivität und supprimiert in *N. benthamiana* die Abwehrreaktionen, die durch einen avirulenten *P. syringae*-Stamm induziert werden (Bretz et al, 2003; Espinosa et al, 2003). HopAO1 supprimiert auch die HR, die durch eine konstitutiv exprimierte MAPK hervorgerufen wird (Espinosa et al, 2003). Demnach könnte HopAO1 über seine Phosphataseaktivität die MAPK-Signalkaskade stören, die eines der wenigen Beispiele für Tyrosin-Phosphorylierung in Pflanzen darstellt (Espinosa et al, 2003). HopAI1, ein weiterer *Pseudomonas*-Effektor, wirkt als Phosphothreoninlyase und kann MAPKK irreversibel dephosphorylieren, wodurch die PAMP-induzierte Gen-Expression reduziert wird (Li et al, 2007). Auch aus *Xanthomonas* gibt es Beispiele für die Suppression der Basalabwehr durch AvrXa7, AvrXa10 und Apl1, drei Effektoren der *avrBs3*-Familie (Fujikawa et al, 2006).

1.2.3 Die Induktion der spezifischen Abwehr durch Typ-III-Effektoren

Für das Überleben von pflanzlichen Spezies ist es von essentieller Bedeutung, Effektoren zu erkennen und deren Aktivitäten einzudämmen. Im Zuge der Evolution haben Pflanzen deshalb Resistenzgene (*R*) entwickelt, die Effektoren sehr spezifisch erkennen können. Ein historischer Meilenstein in der Resistenzgenforschung war die Erkenntnis, dass die Resistenz von Weizen gegen Weizenrost stabil monogen vererbt wird (Biffen, 1905). Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für die Gen-für-Gen-Hypothese, die Flor nach Studien der Interaktion von Flachs und Flachsrost aufstellte (Flor, 1955; Flor, 1971). Nach diesem Modell der Wirt-Pathogen-Interaktion (Abbildung 2) existiert für jedes pflanzliche *R*-Gen ein passendes Avirulenzgen (*avr*) im Pathogen. Heute weiß man, dass *avr*-Gene in Gram-negativen Bakterien für Typ-III-Effektoren kodieren.

Das Vorhandensein von *avr* und *R* führt zu einer Resistenzantwort und damit zu einer inkompatiblen Interaktion. Die inkompatible Interaktion induziert meist eine HR. Fehlt eine der beiden Komponenten, kommt es zu Auslösung von Krankheitssymptomen und man spricht von einer kompatiblen Interaktion.

		Genotyp der Wirtspflanze	
		<i>RR</i> oder <i>Rr</i>	<i>rr</i>
Genotyp des Pathogens	<i>avr</i> ⁺	Resistenz	Krankheit
	<i>avr</i> ⁻	Krankheit	Krankheit

Abbildung 2: Die Gen-für-Gen-Hypothese nach Flor.

avr⁺ = Avirulenzgen vorhanden, *avr*⁻ = Avirulenzgen nicht vorhanden, *R* = dominantes Resistenzgen, *r* = rezessives Resistenzgen

In den letzten 15 Jahren wurde die Gen-für-Gen-Hypothese durch die molekulare Isolierung zahlreicher *avr*- und *R*-Gen-Paare bestätigt (Mindrinos et al, 1994; Römer et al, 2007; Salmeron et al, 1996; Schornack et al, 2004; Tai et al, 1999). Da nicht alle Interaktionen von Effektoren und *R*-Genen mit der Gen-für-Gen-Hypothese erklärt werden können, gibt es im Wesentlichen drei Modelle der Interaktion zwischen Effektoren und R-Protein bzw. *R*-Gen. Das Rezeptor-Liganden-Modell (Abbildung 3 A) beschreibt die direkte Interaktion von Effektor und R-Protein, wobei das R-Protein als Rezeptor den Effektor direkt erkennt und daraufhin die Resistenz initiiert. Dieses Modell wurde tatsächlich für einige Interaktionen bestätigt, z. B. interagiert der Effektor PopP2 aus *Ralstonia solanacearum* mit dem R-Protein RRS1-R aus *A. thaliana* (Deslandes et al, 2003).

Das zweite Modell ist das „guard“-Modell (Abbildung 3 B) und wurde entwickelt, um die Interaktion zwischen AvrPto aus *P. syringae* und den Proteinen Pto und Prf aus Tomate zu beschreiben (Van der Biezen & Jones, 1998). Das Modell beruht auf der Annahme, dass das Resistenzprotein der Beschützer („guard“) eines Effektor-Zielproteins („gardee“) ist. Das „gardee“ selbst oder eine mit ihm in Zusammenhang stehende Funktion wird vom „guard“ bewacht. Die Bindung oder Modifizierung des „gardee“ durch einen Effektor kann vom „guard“ erkannt und folglich die HR induziert werden. Die *P. syringae*-Effektoren AvrB1 und AvrRpm1 sind strukturell verschieden, phosphorylieren aber beide das „gardee“ RIN4, wodurch in RPM1-Pflanzen (RPM1 = „guard“) die HR ausgelöst wird (DeYoung & Innes, 2006; Lindeberg et al, 2005; Mackey et al, 2002). Neu ist das sogenannte „decoy“-Modell (Abbildung 3 C) (van der Hoorn & Kamoun, 2008). „Decoy“ bedeutet hier „Falle“ und beschreibt die Interaktion zwischen einem Effektor und einem Effektor-Ziel, welches in suszeptiblen Pflanzen keinen Vorteil für die Virulenz des Bakteriums bietet, in resistenten Pflanzen jedoch die HR initiieren kann. Ein Beispiel für das „decoy“-Modell ist die Interaktion des *Xcv*-Effektors AvrBs3 mit den Promotoren der *UPA*-Gene (Virulenzgene) und dem *R*-Gen *Bs3* (Kay et al, 2007; Marois et al, 2002; Römer et al, 2007). AvrBs3 fungiert in der Wirtszelle als Transkriptionsaktivator, bindet an Promotorsequenzen („UPA-Box“) und aktiviert so die Genexpression von Virulenzzielen (Kay et al, 2007; Marois et al, 2002). Das „decoy“ ist im Falle von AvrBs3 das *Bs3*-Gen aus Paprika, welches ebenfalls eine „UPA-Box“ besitzt. Die Aktivierung von *Bs3* (vermutlich eine Flavin-abhängige Monooxygenase) induziert pflanzlichen Zelltod, der die Bakterienvermehrung stoppt (Römer et al, 2007).

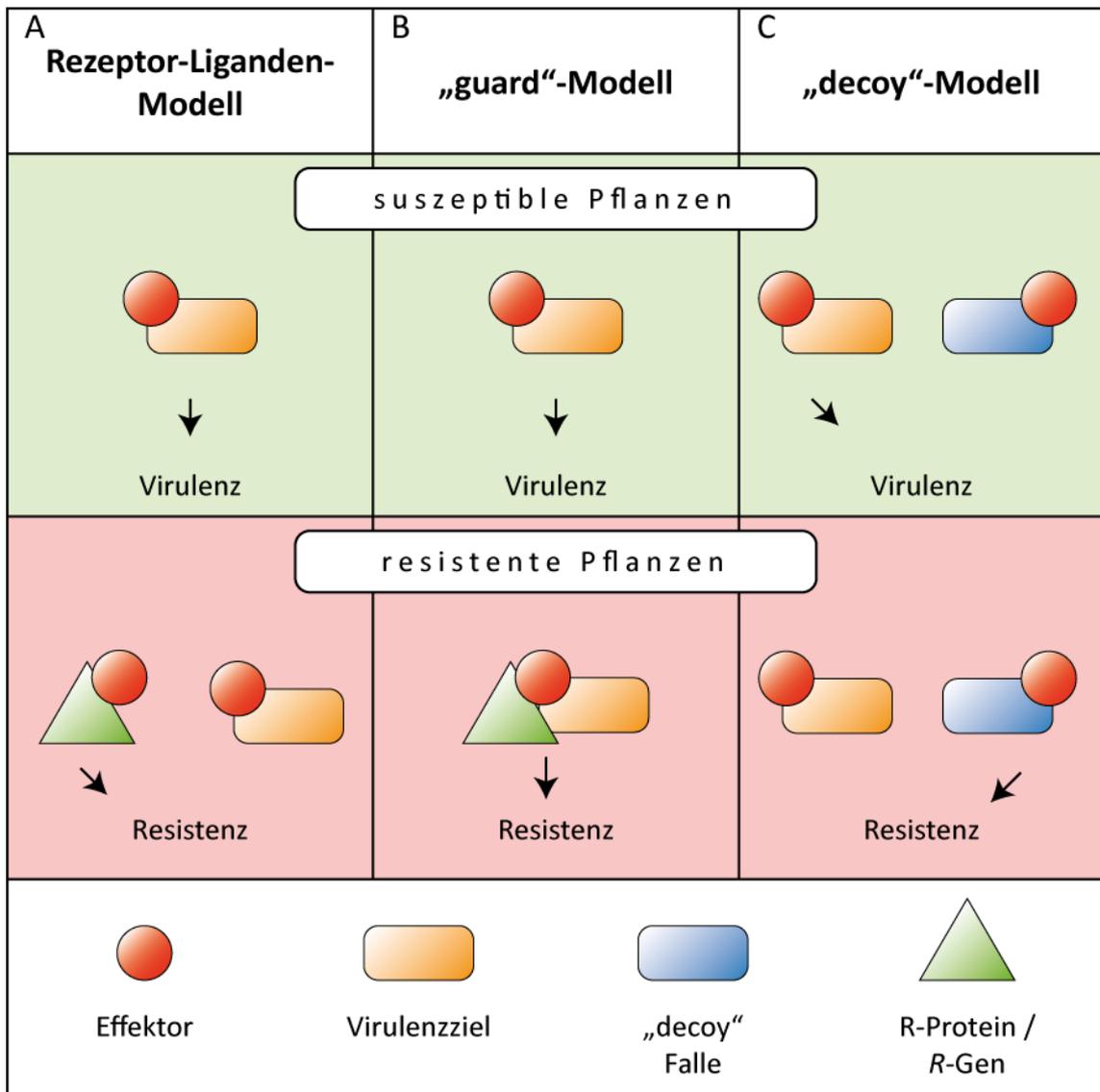


Abbildung 3: Modelle der Erkennung von Effektoren.

(A) Rezeptor-Liganden-Modell: In suszeptiblen Pflanzen trägt der Effektor durch Manipulation eines Virulenzziels zur Virulenz des Bakteriums bei. In resistenten Pflanzen hingegen wird der Effektor oder seine Virulenzfunktion direkt von einem R-Gen / R-Protein erkannt, welches daraufhin eine Resistenzantwort vermittelt.

(B) „guard“-Modell: In suszeptiblen Pflanzen manipuliert der Effektor sein Virulenzziel. In resistenten Pflanzen wird das Virulenzziel zum „guardee“ und von einem R-Gen / R-Protein „guard“ überwacht. Wird das Virulenzziel von einem oder mehreren Effektoren manipuliert, vermittelt das R-Gen / R-Protein eine Resistenzantwort. Diese Methode hat den Vorteil, dass ein R-Gen / R-Protein gegen mehrere Effektoren wirken kann, die das gleiche Virulenzziel haben.

(C) „decoy“-Modell: In suszeptiblen Pflanzen manipuliert der Effektor mehrere Virulenzziele, unter denen sich das „decoy“ befindet, welches jedoch nicht zur Virulenz beiträgt. In resistenten Pflanzen vermittelt das „decoy“ eine Resistenzantwort oder wird von einem R-Gen / R-Protein überwacht, welches die Resistenz initiiert.

1.2.4 Die Suppression der spezifischen Abwehr durch Typ-III-Effektoren

Die Suppression der spezifischen Abwehr durch Effektoren ist aus der Sicht des Pathogens essentiell im Wettkampf mit dem Wirt. Für viele *Pseudomonas*-Effektoren ist gezeigt worden, dass sie die pflanzliche Abwehr unterdrücken können, die durch andere Avr-Proteine induziert wird (Abramovitch et al, 2003; Axtell et al, 2003; Bretz et al, 2003; Espinosa et al, 2003; Jamir et al, 2004; Lopez-Solanilla et al, 2004; Mackey et al, 2003). So induziert z. B. der Typ-III-Effektor HopAB2 (früher AvrPtoB) in resistenten Tomatenpflanzen (*R*-Gene *Pto* und *Rsb*) die HR, nicht aber in *pto*-Pflanzen. Ein HopAB2-Deletionsderivat ohne C-terminale Region löst in *pto*-Pflanzen hingegen die HR aus, die vom *R*-Gen *Rsb* abhängig ist. Die C-terminale Region von HopAB2 ist also offenbar in der Lage, *Rsb* zu supprimieren, nicht jedoch *Pto* (Abramovitch et al, 2006; Abramovitch et al, 2003). Die 3D-Analyse der C-terminalen Region von HopAB2 zeigte Ähnlichkeiten zu Ubiquitin-E3-Ligasen (Janjusevic et al, 2006). Der *Pseudomonas*-Effektor HopX1 supprimiert die HopA1-vermittelte HR, wenngleich noch nicht bekannt ist, ob eine Proteasefunktion dafür notwendig ist (Jamir et al, 2004).

In der Evolution von Wirt und Pathogen entwickeln sich in Pflanzen immer neue Erkennungsmechanismen und in Bakterien Möglichkeiten, diese zu umgehen (Abbildung 4).

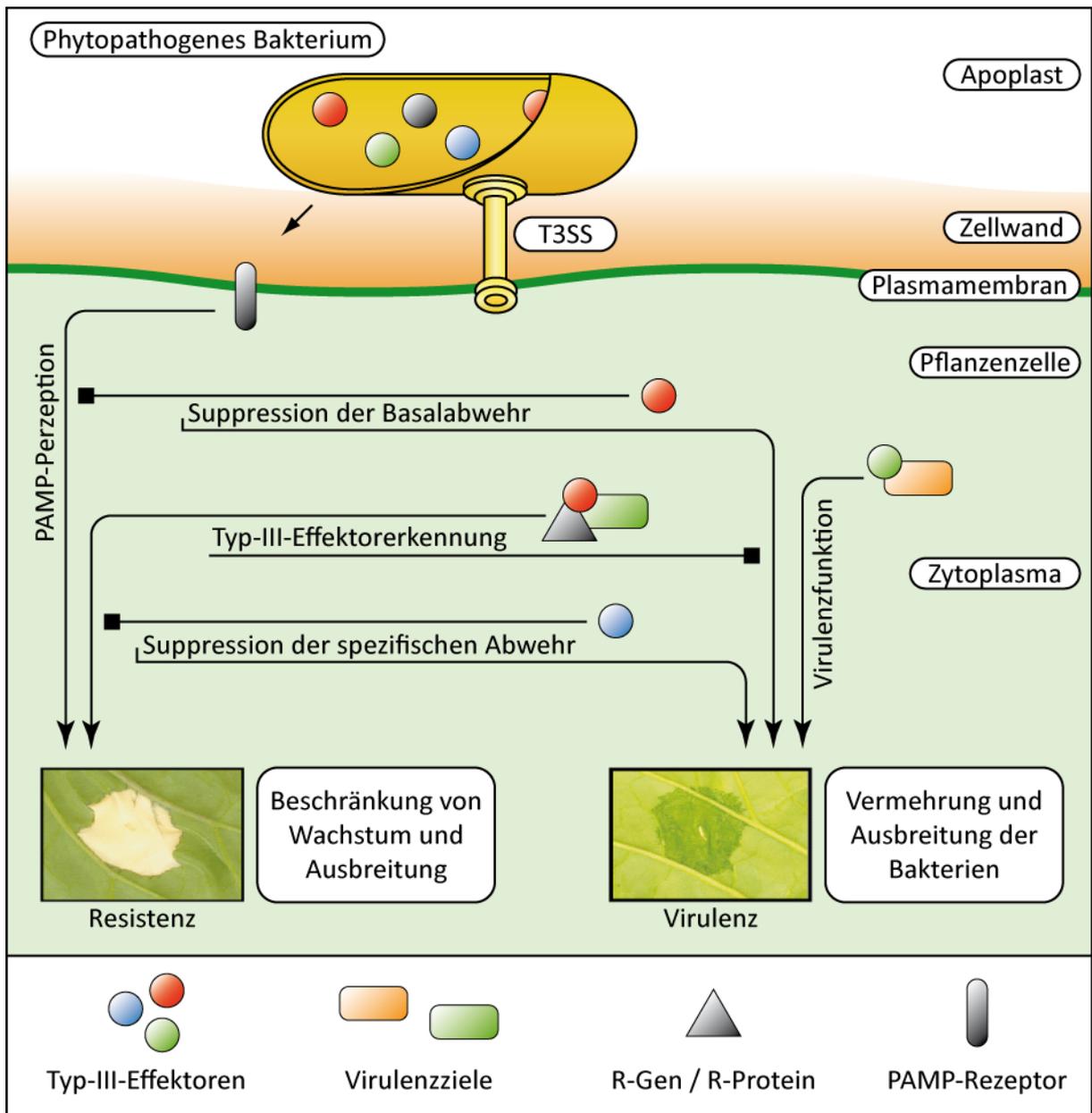


Abbildung 4: Die Rolle der Typ-III-Effektoren in der Wirt-Pathogen-Interaktion.

Über das Typ-III-Sekretionssystem werden Effektoren direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle transloziert und verändern dort deren Physiologie zugunsten des Bakteriums. Dazu gehört, neben dem Aufsuchen möglicher Virulenzziele, die Suppression der Basalabwehr, die durch PAMP-Rezeptoren initiiert wird. Effektoren können von R-Genen / R-Proteinen erkannt werden, welche die HR induzieren. Diese Resistenz kann durch Suppression der R-Gen-vermittelten Erkennung durch weitere Effektoren verhindert werden. Zwischen Pathogen und Wirt herrscht ein ständiger Wettkampf zwischen Mechanismen der bakteriellen Virulenz und der pflanzlichen Abwehr.

1.3 Die Gattung *Xanthomonas*

Xanthomonaden sind Gram-negative, gelb pigmentierte Bakterien, die meist polar monotrich begeißelt sind. Ihr Name leitet sich von der gelben Färbung ihrer Pigmente durch Brom-haltige Polyenverbindungen ab. Sie leben als biotrophe Pathogene an oder in Pflanzen (Swings et al, 1993). Bakterien der Gattung *Xanthomonas* befallen Pflanzen aus vielen verschiedenen Gattungen. Je nach Wirtsbereich werden die Bakterienarten in Pathovaren (pv.) eingeteilt. Zu den wichtigsten, molekular bearbeiteten Schädlingen auf Kulturpflanzen gehören *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, der Erreger der bakteriellen Weißblättrigkeit („bacterial blight“) in Reis, *X. axonopodis* pv. *citri*, der Erreger des Zitruskrebs („citrus canker“) auf *Citrus*-Arten und *X. campestris* pv. *campestris*, der Erreger der Adernschwärze („black rot“) auf Kreuzblütlern (Alvarez, 2000; Graham et al, 2004; Nino-Liu et al, 2006). Der in dieser Arbeit behandelte Erreger ist *X. campestris* pv. *vesicatoria*, der die bakterielle Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“) auf Paprika und Tomate verursacht.

1.3.1 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

X. campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“) auf Paprika (*Capsicum* spp.) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) (Abbildung 5). *Xcv* wird auch als *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* und *X. euvesicatoria* bezeichnet und verursacht vor allem in feuchtwarmen Gebieten der Erde erhebliche Ernteauffälle (Agrios, 2005; Jones et al, 2004; Marco & Stall, 1983; Vauterin et al, 2000). *Xcv* breitet sich in der Natur über Wind und Regen aus, dringt über natürliche Öffnungen und Wunden in den Interzellularraum ein, verbreitet sich aber nicht systemisch in der Pflanze. Krankheitssymptome äußern sich daher in lokal begrenzten, wässrigen Läsionen, die im weiteren Verlauf nekrotisch werden. Das Bakterium zählt zu den etablierten Modellorganismen der Phytopathologie. Vor kurzem wurde der *Xcv*-Stamm 85-10 sequenziert (Thieme et al, 2005).

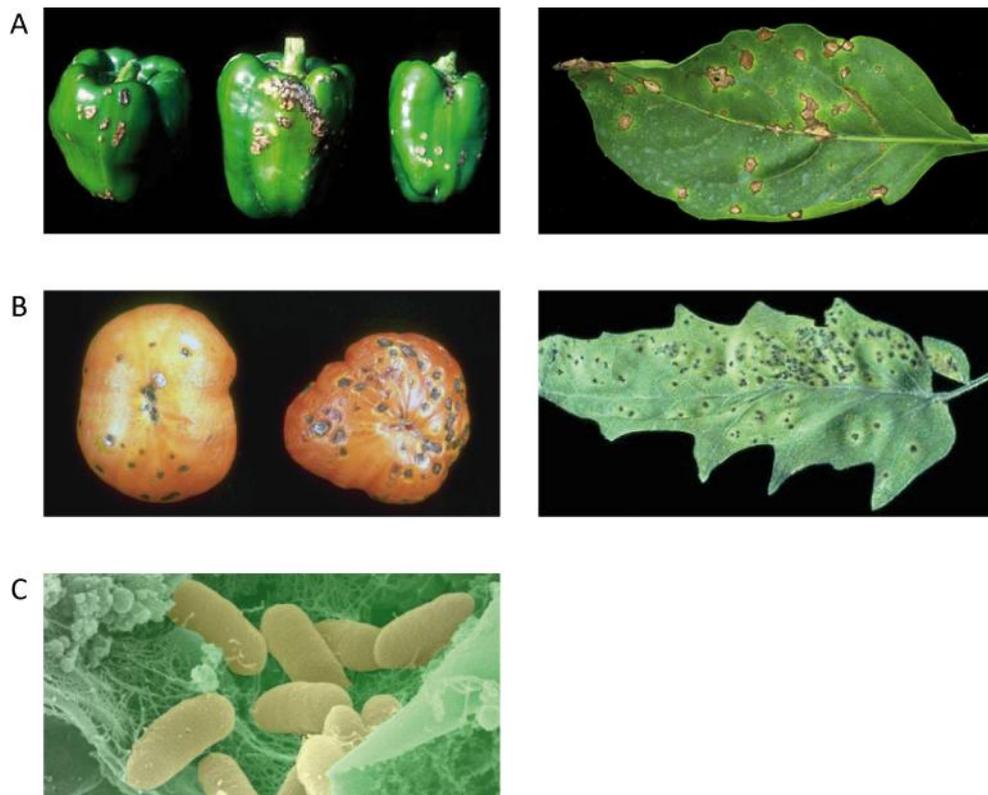


Abbildung 5: Krankheitsbilder von *Xcv*-infizierten Paprika- und Tomatenpflanzen.

Die von *Xcv* verursachte bakterielle Fleckenkrankheit äußert sich in wässrigen Läsionen auf Blättern und Früchten von (A) Paprika und (B) Tomate. Die Läsionen werden später nekrotisch. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Xcv* im Mesophyll eines Paprika-Blatts (zur Verdeutlichung koloriert). (Bildquellen: A, B: USDA Cooperative Extension Slide Series, C: D. Gürlebeck, G. Hause)

1.4 Die Typ-III-Effektorproteine von *Xcv*

Die ersten Effektorproteine von *Xcv* wurden anhand der von ihnen induzierten HR in resistenten Paprika- und Tomatenpflanzen identifiziert und als Avr-Proteine bezeichnet (Astua-Monge et al, 2000a; Bonas et al, 1993; Bonas et al, 1989; Canteros et al, 1991; Kearney & Staskawicz, 1990b; Minsavage et al, 1990; Swanson et al, 1988; Whalen et al, 1988). Nach der Entdeckung des *hrp*-Gen-kodierten T3SS wurde vor ca. 15 Jahren klar, dass die Avr-Proteine aus *Xcv* Typ-III-sekretierte Effektorproteine darstellen (Van den Ackerveken et al, 1996).

Weitere Effektorgene wurden mittels cDNA-AFLP und Transposon-Typ-III-Effektor-Reporterproteininfusionen isoliert und als „*Xanthomonas* outer protein“ (Xop) bezeichnet (Noël et al, 2001; Roden et al, 2004b). Die bioinformatische Auswertung der Genomsequenz des sequenzierten *Xcv*-Stammes 85-10, nach den in 1.2.1 beschriebenen Kriterien, erweiterte die Zahl der Effektoren und Effektorkandidaten auf über 25 (Tabelle 1) (Thieme et al, 2005).

Das erste aus *Xcv* klonierte Typ-III-Effektorgen war *avrBs1*, das in Paprika ECW-10R-Pflanzen (*Bs1* R-Gen) erkannt wird (Swanson et al, 1988). Das korrespondierende Resistenzgen *Bs1* wurde noch nicht isoliert. Die typische AvrBs1-HR ist im natürlichen Infektionsverlauf nicht sichtbar, jedoch bei hohem Inokulum ($> 10^7$ cfu/ml) unter Laborbedingungen relativ schnell und bereits nach 24 h deutlich sichtbar (Swanson et al, 1988). Das *avrBs1*-Gen liegt auf dem konjugativen Plasmid pXvCuI, das auch die Kupferresistenz vermittelt. Das Effektorgen *avrBs1* wurde in verschiedenen *Xcv*-Stämmen, darunter das Tomatenpathogen *Xcv* 75-3 und das Paprikapathogen *Xcv* 85-10, nachgewiesen und ist *hrpG*- und *hrpX*-unabhängig exprimiert (Escobar et al, 2001; Ronald & Staskawicz, 1988; Swanson et al, 1988; Thieme et al, 2005). Die R-Gen-vermittelte Resistenz von Pflanzen gegenüber einzelnen Bakterienstämmen ist unter Feldbedingungen oft kurzlebig, da spontane Mutationen im Pathogen die Erkennung verhindern (Dahlbeck & Stall, 1979; Johnson, 1983). So ist z. B. ein IS-Element (IS476) für die spontane Inaktivierung des *avrBs1*-Gens verantwortlich (Kearney & Staskawicz, 1990a). Die Funktion des AvrBs1-Proteins ist unbekannt, aber es ist zu 46 % identisch mit der C-terminalen Hälfte des Typ-III-Effektors AvrA aus *P. syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz et al, 1984). Interessanterweise überleben *Xcv*-Deletionsmutanten ohne *avrBs1*-Gen besser im Boden (O Garro et al, 1997). In Feldversuchen wurde allerdings beobachtet, dass *Xcv-avrBs1*-Mutanten bei zusätzlicher Abwesenheit von *avrBs2* eine verminderte Virulenz zeigen (Wichmann & Bergelson, 2004). AvrBs2 ist eines der wenigen Effektorproteine, die als Hauptvirulenzfaktoren bezeichnet werden können, da sie einen sichtbaren Beitrag zur Virulenz eines Bakteriums leisten (Kearney & Staskawicz, 1990b; Wichmann & Bergelson, 2004). AvrBs2 ist ähnlich zur Glycerin-Phosphoryl-Diester-Diesterase UgpQ aus *E. coli* und bildet oder zerstört möglicherweise Phosphodiester-Bindungen (Swords et al, 1996). In *avrBs2*-Mutanten werden auch die Virulenzphänotypen von AvrBs3 und AvrBs4 sichtbar (Wichmann & Bergelson, 2004).

Diese zu 97 % identischen Proteine wirken vermutlich beide als Transkriptionsaktivatoren (Bonas et al, 1993; Bonas et al, 1989). Für AvrBs3 ist die Aktivierung der *UPA*-Gene („upregulated by *avrBs3*“) beschrieben worden, unter denen sich das Virulenzziel *UPA20* befindet, welches Hypertrophie von Pflanzenzellen verursacht (Kay et al, 2007; Marois et al, 2002).

Wie auch in *Pseudomonas*, befindet sich unter den Effektoren aus *Xanthomonas* eine große Zahl möglicher Cysteinproteasen, die sich nach ihrer Ähnlichkeit zueinander verschiedenen Klänen zuordnen lassen (Rawlings et al, 2008). Während in *Pseudomonas* auch Peptidasen des CA-Klans vorkommen, sind aus *Xanthomonas* bisher nur Mitglieder des Klans CE bekannt (Alfano & Collmer, 2004). Effektorproteine des CE-Klans sind in tier- und pflanzenpathogenen Organismen konserviert und charakterisiert durch ein katalytisches Zentrum, welches aus einem Cystein-, einem Aspartat- oder Glutamat- und einem Histidinrest besteht und entscheidend zur Funktion

dieser Effektoren beiträgt (Orth et al, 2000). Die bekannten Vertreter des CE-Klans in *Xanthomonas* sind AvrBsT, AvrRxv, AvrXv4, XopD und XopJ (Astua-Monge et al, 2000a; Ding et al, 1996; Minsavage et al, 1990; Noël et al, 2003; Noël et al, 2002; Orth et al, 2000; Whalen et al, 1988).

Basierend auf Primärstrukturvergleichen wird der CE-Klan in sechs Familien (C5, C48, C55, C57, C63, C79) unterteilt (Rawlings et al, 2008). Die Familien C48, C55 und C79 kommen in Bakterien vor (Rawlings et al, 2008). Der Typ-III-Effektor XopD zählt zur Familie C48 und ist der Ubiquitin-ähnlichen Protease ULP1 („ubiquitin-like protein protease 1“) aus Hefe sehr ähnlich (Li & Hochstrasser, 1999). ULP wirken als Peptidasen, die SUMO-Vorläufer („small ubiquitin-like modifier“) in die reife Form überführen und als Isopeptidasen, die konjugiertes SUMO von Proteinen abspalten (Müller et al, 2001). XopD zeigt sowohl SUMO-Peptidase-, als auch Isopeptidaseaktivität (Hotson et al, 2003). Außerdem verzögert XopD die Blattseneszenz in suszeptiblen Tomatenpflanzen (Kim et al, 2008).

1.5 Die Typ-III-Effektoren der YopJ-Familie aus *Xcv*

AvrBsT, AvrRxv, AvrXv4 und XopJ aus *Xcv* gehören wie YopJ aus *Yersinia* der Familie C55 des CE-Klans an. Wie XopD reduzieren YopJ und AvrXv4 *in vivo* die Akkumulation von SUMO-Proteinkonjugaten, eine *in vitro*-Aktivität als SUMO-Peptidase war jedoch nicht nachweisbar (Mudgett, 2005; Orth et al, 2000; Roden et al, 2004a). Die YopJ-Homologen HopZ1, HopZ2 und HopZ3 aus *Pseudomonas* zeigen Proteaseaktivität (Ma et al, 2006). Am besten charakterisiert ist YopJ aus Subspezies von tierpathogenen *Yersinia* und soll deshalb hier erwähnt werden. YopJ inhibiert MAPK- und NF κ B-abhängige Signalwege (Orth et al, 1999). Neuere Studien deuten darauf hin, dass YopJ als Acetyltransferase wirkt. Durch Acetylierung der Aminosäuren Ser207 und Thr211 der MAPKK6 verhindert es deren Aktivierung durch Phosphorylierung und unterbindet so die Signalweiterleitung der Basalabwehr nach *Yersinia*-Infektion (Mukherjee et al, 2006). Ob auch die YopJ-Homologen aus pflanzenpathogenen Bakterien als Acetyltransferasen wirken, ist noch ungeklärt.

Bislang wurde noch kein R-Gen / R-Protein isoliert, das Vertreter der YopJ/AvrRxv-Familie erkennt. Mit SOBER1 wurde allerdings ein pflanzlicher Suppressor der AvrBsT-induzierten HR in *Arabidopsis thaliana* isoliert (Cunnac et al, 2007). Das „Suszeptibilitätsgen“ *SOBER1*, das zu α/β -Hydrolasen ähnlich ist, zeigt *in vitro* Carboxylesterase-Aktivität. Es wird vermutet, dass AvrBsT und SOBER1 in der Zelle antagonistisch auf gemeinsame Substrate wirken (Cunnac et al, 2007).

Tabelle 1: Bekannte Typ-III-Effektoren aus *Xcv* und ihre mögliche biologische Funktion

Effektor	Homologie	Vorhergesagte Funktion und Motive	Referenzen
AvrBs1	AvrA ¹	unbekannt	(Escolar et al, 2001; O Garro et al, 1997; Ronald & Staskawicz, 1988)
AvrBs2	UgpQ ²	Diesterase	(Kearney & Staskawicz, 1990b; Mudgett et al, 2000; Swords et al, 1996)
AvrBs3	AvrBs4 ³	Transkriptionsfaktor	(Bonas et al, 1989; Kay et al, 2007)
AvrBs4	AvrBs3 ³	Transkriptionsfaktor	(Bonas et al, 1993; Gürlebeck et al, 2008)
AvrBsT	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Ciesiolka et al, 1999; Escolar et al, 2001; Minsavage et al, 1990)
AvrRxv	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Ciesiolka et al, 1999; Whalen et al, 2008; Whalen et al, 1993)
AvrXv3	HopAF1 ¹	unbekannt	(Astua-Monge et al, 2000a)
AvrXv4	YopJ ⁴	SUMO-Protease / Acetyltransferase C55	(Astua-Monge et al, 2000b; Roden et al, 2004a)
HpaA		Unbekannt	(Huguet et al, 1998; Lorenz et al, 2008; Wengelnik & Bonas, 1996)
XopB	HopD1 ¹	Unbekannt	(Noël et al, 2001)
XopC		Phosphoribosyltransferase	(Noël et al, 2003)
XopD	Ulp1 ⁵	SUMO-Protease, C48	(Hotson et al, 2003; Kim et al, 2008; Noël et al, 2002)
XopE1	HopX ¹	N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme et al, 2007)
XopE2	HopX ¹	N-Myristoylierungsmotiv	(Thieme et al, 2007)
XopF1	XopF2 ³	Unbekannt	(Roden et al, 2004b)
XopF2	XopF1 ³	Unbekannt	(Roden et al, 2004b)
XopJ	YopJ ⁴	Protease / Acetyltransferase C55	(Noël et al, 2003; Thieme et al, 2007)
XopN	HopAU1 ¹	Unbekannt	(Roden et al, 2004b)
XopO	HopK1 ¹ AvrRps4 ¹	Unbekannt	(Roden et al, 2004b)
XopP		Unbekannt	(Roden et al, 2004b)
XopQ	HopQ1 ¹	Nukleosid Hydrolase	(Noël et al, 2001; Roden et al, 2004b)
XopX	HopAE1 ¹	Supprimiert Abwehr in <i>N. benthamiana</i>	(Metz et al, 2005)
Ecf	HopAE1 ¹	early chlorosis factor	(Morales et al, 2005)

1 = *P. syringae*, 2 = *E. coli*, 3 = *X. campestris*, 4 = *Yersinia* spp., 5 = *Saccharomyces cerevisiae*.

1.6 Vorarbeiten

Seit einiger Zeit war bekannt, dass der Typ-III-Effektor AvrBsT die AvrBs1-induzierte HR unterdrücken kann (Abbildung 6) (Lucía Escolar und Ulla Bonas, unpubliziert). Die *in planta*-Koexpression von AvrBs1 und AvrBsT in Paprika ECW-10R-Pflanzen zeigte, dass die Suppression innerhalb der Pflanzenzelle und nicht im Bakterium stattfindet. Die Koexpression von AvrBs1 mit AvrBs2, AvrBs3, AvrBs4, AvrRxv oder AvrXv4 beeinträchtigte die AvrBs1-HR nicht. Die Koexpression von AvrBsT mit AvrBs2, AvrBs3, AvrBs4, AvrRxv oder AvrXv4 zeigte keine Beeinträchtigungen der verschiedenen HR durch AvrBsT (Lucía Escolar und Ulla Bonas, unpubliziert). Die AvrBsT-vermittelte Suppression der AvrBs1-induzierten HR ist also in beiden Richtungen sehr spezifisch.

Mit *xopJ* wurde in einer cDNA-AFLP-Sichtung ein weiterer Effektor als HrpX-abhängig exprimiertes Mitglied des CE-Klans isoliert (Noël et al, 2003). XopJ wurde nicht auf AvrBs1-HR-Suppression getestet. Mittels bioinformatischer Analysen wurde ein mögliches N-Myristoylierungssignal in XopJ identifiziert (Thieme et al, 2007). Im Rahmen der Diplomarbeit von Alexander Urban wurde gezeigt, dass *in planta* exprimiertes *xopJ* die HR in der Nichtwirtspflanze *Nicotiana benthamiana* hervorruft.

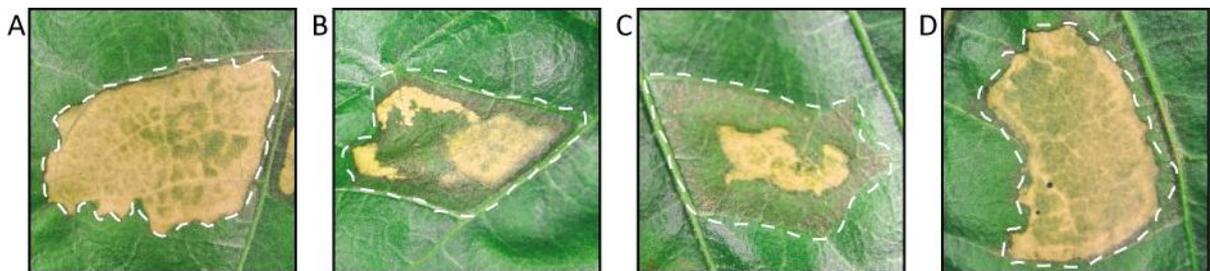


Abbildung 6: AvrBsT supprimiert die AvrBs1-HR in Paprika ECW-10R.

(A) Die Erkennung von AvrBs1 aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 führt in *C. annuum* ECW-10R zur HR. (B) Die AvrBs1-spezifische HR wird durch Translokation von AvrBsT (exprimiert vom Plasmid PDSM400) supprimiert. (C) Der *Xcv*-Stamm 75-3 induziert eine partielle HR in ECW-10R, da (neben anderen Effektoren) AvrBs1 und AvrBsT transloziert werden. (D) Eine Δ *avrBsT*-Mutante von *Xcv* 75-3 induziert eine ausgeprägte AvrBs1-spezifische HR.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die molekulare und funktionelle Charakterisierung von AvrBsT und XopJ, zwei Mitgliedern der C55-Familie aus *Xcv*. Es sollte ein möglicher Einfluss von AvrBsT und XopJ auf die AvrBs1-induzierte pflanzliche Abwehrreaktion untersucht werden. Neben der Isolierung pflanzlicher Interaktionspartner von AvrBsT und AvrBs1 sollten die Effektoren subzellulär lokalisiert werden, um Hinweise auf ihre Wirkungsorte zu bekommen.

2 Material & Methoden

2.1 Nährmedien und Antibiotika

„Lysogeny-Broth“ (LB)-Medium:	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,5
NYG-Medium:	0,5 % (w/v) Pepton, 0,3 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,2 % Glycerin
YEB-Medium:	0,5 % (w/v) Fleisch-Extrakt, 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 0,2 % 1 M MgSO ₄ pH 7,2
Induktionsmedium:	1,05 % (w/v) K ₂ HPO ₄ , 0,45 % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,1 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,05 % (w/v) Natriumcitrat, 1 mM MgSO ₄ , 0,1 % (w/v) Glukose, 0,1 % (w/v) Fruktose, 0,4 % Glycerin, 10 mM MES, 50 µg/ml Acetosyringon
Infiltrationsmedium:	10 mM MgCl ₄ , 5 mM MES pH 5,3, 150 µM Acetosyringon

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und 1,1 x 10⁵ Pa. Für die Herstellung von Festmedien wurden den Medien 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

Ampicillin (Ap)	100 µg/ml in festen Medien, 50 µg/ml in flüssigen Medien
Gentamycin (Gm)	15 µg/ml
Hygromycin (Hm)	50 µg/ml
Kanamycin (Km)	50 µg/ml
Rifampicin (Rp)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	10 µg/ml

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Resistenz	Referenz / Kurzbeschreibung
<i>E. coli</i> Top10		Invitrogen / für Klonierungen
<i>E. coli</i> DB 3.1		Invitrogen / für leere GATEWAY-Vektoren
<i>E. coli</i> BL21 DE3		Stratagene / Expression von Proteinen
<i>E. coli</i> BL21 AI		Invitrogen / Expression toxischer Proteine
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Gm, Rp	(Van Larebeke et al, 1974) / Transformation von Pflanzen
<i>Xcv</i> 75-3	Rp	(Minsavage et al, 1990) / enth. <i>avrBs1</i> und <i>avrBsT</i>
<i>Xcv</i> 75-3 Δ <i>avrBsT</i>	Rp	L. Escolar / <i>avrBsT</i> deletiert
<i>Xcv</i> 85-10	Rp	(Bonas et al, 1989)
<i>Xcv</i> 85-10pDSM400	Rp Sp	L. Escolar / enthält <i>avrBsT</i>

2.3 Verwendete Pflanzen und Anzuchtbedingungen

Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) der Kulturvarietät (cv.) Moneymaker, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *Nicandra physaloides*, *Petunia spec.*, *Physalis alkekengi*, *P. peruviana*, *Solanum americanum*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. suaveolens* und *S. tuberosum* wurden wie in (Marois et al, 2002) für *N. benthamiana* beschrieben kultiviert. Die fünf isogenen Paprika-Linien (*Capsicum annuum*) des Kultivars *Early Cal Wonder* (ECW) wurden wie in (Bonas et al, 1989) beschrieben kultiviert. Die fünf Linien unterschieden sich in den monogen introgressierten Resistenzgenen *Bs1* bei ECW-10R, *Bs2* bei ECW-20R, *Bs3* bei ECW-30R und *Bs1*, *Bs2*, *Bs3* bei ECW-123. Die Linie ECW trägt keines der erwähnten Resistenzgene.

2.4 Xcv-Inokulationsexperimente

Xcv-Stämme wurden zwei Tage auf selektiven NYG-Platten angezogen. Für die Inokulationen wurden die Bakterien in 1 mM MgCl₂ resuspendiert, auf eine optische Dichte von 0,4 bei 600 nm (1 x 10⁹ cfu/ml) eingestellt und mit einer nadellosen Einwegspritze in die Blattunterseite junger Blätter injiziert. Inokulierte Pflanzen verblieben bis zur Bonitur in Gewächshausatmosphäre (26 – 28 °C, 60 – 70 % relative Luftfeuchte, Lichtperiode von 6.00 bis 22.00 Uhr). Die Bonitur der

Phänotypen erfolgte i. d. R. 48 h nach Inokulation. Zur verbesserten Visualisierung des Phänotyps wurden die infiltrierten Blätter im 80%igen Ethanolbad gebleicht.

2.5 Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen

Für die Sichtung der Tomaten-cDNA-Bank und direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde das MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-Di-Hybrid-System nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Da sich die Bibliothek im Stamm *Saccharomyces cerevisiae* AH109 befindet, wurde der Hefestamm Y187 mit den Köderplasmiden pGBKT7_avrBs1, pGBKT7_avrBsT oder pGBKT7attR_avrBsT_{C222A} transformiert. Das Pellet einer Übernachtskultur von 50 ml Y187(pGBKT7_Effektor) wurde mit 500 µl AH109 (pGADT7_Sl-cDNA) in 50 ml 2xYPDA gelöst, 24 h bei 30 °C inkubiert und anschließend auf SD-Medium -Ade/-His/-Leu/-Trp plattiert. Nach Paarung mit dem Hefestamm AH109 wurden die diploiden Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert bzw. ausgestrichen, um auf Interaktion von Beute und Köder zu testen. Der Stamm AH109 enthält die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* und *lacZ*. Y187 enthält ebenfalls das Reportergen *lacZ*. Bei Interaktion erfolgt die Aktivierung der Reportergene und die Hefezellen können ohne Adenin und Histidin wachsen und mit Hilfe der α -Galaktosidase das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α -D-Galactopyranosid (X- α -Gal) zu einem blauen Farbstoff umsetzen. X- α -Gal wird dem Minimalmedium zugegeben.

2.5.1 Tomate-cDNA-Bibliothek

Die Tomate-cDNA-Bibliothek war aus Gesamt-RNA von nicht infizierten Laubblättern 6 Wochen alter Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) erstellt worden (D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas). Für die Generierung der cDNA-Bank wurde das GAL4-Hefe-Di-Hybrid-„MATCHMAKER Library Construction&Screening Kit“ (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels zufällig generierten Oligonukleotiden und cDNA-Fragmente mit einer Größe von 0,5-2,0 kB wurden ausgewählt. Durch subtraktive Hybridisierung wurde die Bibliothek normalisiert und in pGADT7-Rec2, den Angaben des Herstellers folgend (Clontech, Heidelberg, Deutschland), rekombiniert. Die Rekombination und Generierung erfolgen dabei im Hefestamm AH109. Der Stamm wurde nachfolgend in Reaktionsgefäße mit einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml abgefüllt und bei -80 °C

gelagert. Die Sichtung der cDNA-Bank erfolgte mittels Hefe-Paarung wie im Protokoll des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) beschrieben.

2.5.2 Verwendete Datenbanken

Für die Suche nach Homologen und zusätzlicher Sequenzinformation von Kandidaten aus den Y2H-Sichtungen wurden folgende Datenbanken benutzt:

The Gene Index Databases: <http://www.danafarber.org/>
Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA 02115

Plant Diversity Research Center: <http://210.218.199.240/SOL/>
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

NCBI BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD
20894

2.6 Nukleinsäuren

2.6.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe wurde mit dem Qiagen RNeasy Plant Mini Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt, mit den folgenden Ergänzungen: Paprikablätter wurden aufgrund ihres erhöhten Stärkegehalts nicht bei 65 °C inkubiert und es wurde ein DNase-Verdau auf der zweiten Säule als optionaler Schritt eingefügt. Dazu wurde das Qiagen RNase-Free DNase Set verwendet, das speziell auf die RNeasy Kits abgestimmt ist. Um zwischen 50 und 100 µg/ml RNA aus Paprikablättern zu extrahieren, wurden zwischen 80 und 100 mg Blattgewebe; das entspricht ca. vier Blattscheiben (Korkbohrer Größe 5) ausgestanzt. Die Homogenisierung des gefrorenen Blattmaterials erfolgte per Kugelmühle (Retsch).

2.6.2 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem Fermentas RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Dabei wurde nach Anleitung der Synthese für PCR-Amplifikation verfahren. Die Ausgangsmenge an RNA betrug ca. 1 µg. Als Startstellen für die Reverse-Transkriptase

wurden die im Kit enthaltenen Zufallshexamer-Oligonukleotide verwendet. Die synthetisierte cDNA wurde für PCR-Ansätze im Verhältnis 1:100 verdünnt.

2.6.3 5'- und 3'- RACE („rapid amplification of cDNA ends“)

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

2.6.4 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA (Minipräparation)

Zunächst wurden Blattscheiben der Pflanzen in 2 ml Reaktionsgefäße geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff mit einem schmalen Pistill zu einem feinen Pulver verarbeitet. Der anschließende chemische Aufschluss erfolgte durch Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Extraktionspuffer. Die Proben wurden auf einem Vortex kräftig durchmischt und 30 min bei 60 °C im Thermomixer inkubiert. Die Lösungen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,5 ml vorgekühltem Chloroform (-20 °C) versetzt. Die Proben wurden wiederum sorgfältig gemischt (> 5 min) und zur Phasentrennung 15 min bei 16100 rcf zentrifugiert. In der Interphase sammeln sich die denaturierten Proteine, während die Nukleinsäuren sich in der oberen, wässrigen Phase befinden. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Die Proben wurden anschließend 10 min bei 16100 rcf zentrifugiert und so die pflanzliche DNA pelletiert. Die DNA-Pellets wurden mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, im Vakuumtrockner getrocknet und in 0,15 ml TE resuspendiert. Um die Nukleinsäure-Lösung von unlöslichen Bestandteilen zu trennen, wurden die Proben für 10 min bei 16100 rcf zentrifugiert und die wässrige Lösung in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße oder in Mikrotiterplatten überführt. Die Lagerung dieser erfolgte bei -20 °C. Die durchschnittliche DNA-Ausbeute lag zwischen 50-250 ng/µl.

2.6.5 Isolierung hochmolekularer pflanzlicher DNA (Maxipräparation)

Zur Gewinnung großer Mengen hochmolekularer DNA wurden drei bis vier große Paprikablätter geerntet. Diese wurden unter flüssigem Stickstoff in vorgekühlten Mörsern mit einem Pistill zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das Pulver wurde anschließend in gekühlte 50 ml Röhrchen überführt und mit ca. 20 ml vorgewärmtem Extraktionspuffer versetzt. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und 1 Stunde bei 60 °C unter regelmäßigem Invertieren im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diesen 10 ml vorgekühltes Chloroform (-20 °C) zugegeben und durch Invertieren gemischt (>5 min). Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation der Lösungen für 15 min bei 1700 rcf. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 1700 rcf). Die wässrige Phase wurde wiederum abgenommen und aus dieser die hochmolekulare DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt. Die in langen Fadenknäueln ausgefallene DNA wurde mit einer, zu einem Haken deformierten Glaspipette „geangelt“, an dieser in 70%igem Ethanol gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 200 µl TE unter Zusatz von 5 µl RNase A bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss auf 500 µl mit 1 x TE verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert, um eine vollständige Auflösung der DNA-Pellets zu erreichen. Im Folgenden wurde die DNA in 15-ml-Röhrchen überführt, auf ein Gesamtvolumen von 5 ml mit destilliertem H₂O verdünnt und mit 1 ml Phenol versetzt. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und zur Phasentrennung 15 min bei 1700 rcf zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 15-ml-Röhrchen pipettiert und mit 2 ml Chloroform gemischt. Nach erneuter Phasentrennung (15 min, 1700 rcf) wurde die DNA aus dem Überstand mit 2 Volumen 96%igem Ethanol präzipitiert. Die hochmolekulare DNA wurde erneut aus der Lösung mittels Pasteurpipette gewonnen, gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 100 - 300 µl TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C. Die DNA-Ausbeute wurde am Photometer bestimmt und lag zwischen 400 ng/µl bis 1,5 µg/µl. Für PCR-Analysen wurden die DNA-Proben 1:100 verdünnt.

2.7 Quantitative Echtzeit-qRT-PCR („quantitative real-time PCR“)

Alle qRT-PCR-Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Bio-Rad iCycler iQ durchgeführt. Der iCycler iQ beherrscht Anregungswellenlängen von 400 bis 700 nm und kann bis zu vier Fluorophore gleichzeitig messen. Für alle Reaktionen wurde SYBR Green I als

interkalierender Farbstoff eingesetzt. Für Echtzeit-RT-PCR wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Mix der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Das im Handbuch beschriebene Reaktionsvolumen wurde nach vergleichenden Versuchen zur Kostenersparnis von 50 µl auf 20 µl reduziert.

2.7.1 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm mit einem „NanoDrop“ (Thermo Scientific) gegen DEPC-Wasser. Für qRT-PCR wurde die RNA auf ca. 200 ng/µl eingestellt und zum „QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit“ (Qiagen) gegeben.

2.7.2 Auswertung der Echtzeit-PCR

Die pro Zyklus gemessenen Fluoreszenzwerte werden als Ordinate gegen die entsprechende Zyklenzahl auf der Abszissenachse in ein Diagramm eingetragen, sodass eine Verlaufskurve entsteht. Im Fall der Amplifikation eines Fragments ist ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz ab einem bestimmten Zyklus zu beobachten.

2.7.2.1 Schwellenzyklus

Der Zyklus, in dem sich die Fluoreszenz in einer Probe gegenüber der Hintergrundstrahlung abhebt, wird als Schwellenzyklus (C_T) bezeichnet. Er ist die Grundlage jeder Berechnung in der quantitativen Echtzeit-PCR. Für die Bestimmung des C_T wird eine Gerade parallel zur Abszissenachse so in das Diagramm gelegt, dass sie von jeder Fluoreszenzkurve nur einmal geschnitten wird (Abbildung 7). Der C_T ist das gefällte Lot unter dem Punkt, an dem die Fluoreszenzkurve die Gerade schneidet. Je mehr Kopien eines Gens in einer Probe vorhanden sind, desto eher hebt sich die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase vom Hintergrund ab, desto eher wird der C_T erreicht. Um den C_T so genau wie möglich zu bestimmen, sollte jede untersuchte Probe als Duplikat oder besser Triplikat vorliegen, sodass ein Mittelwert errechnet werden kann.

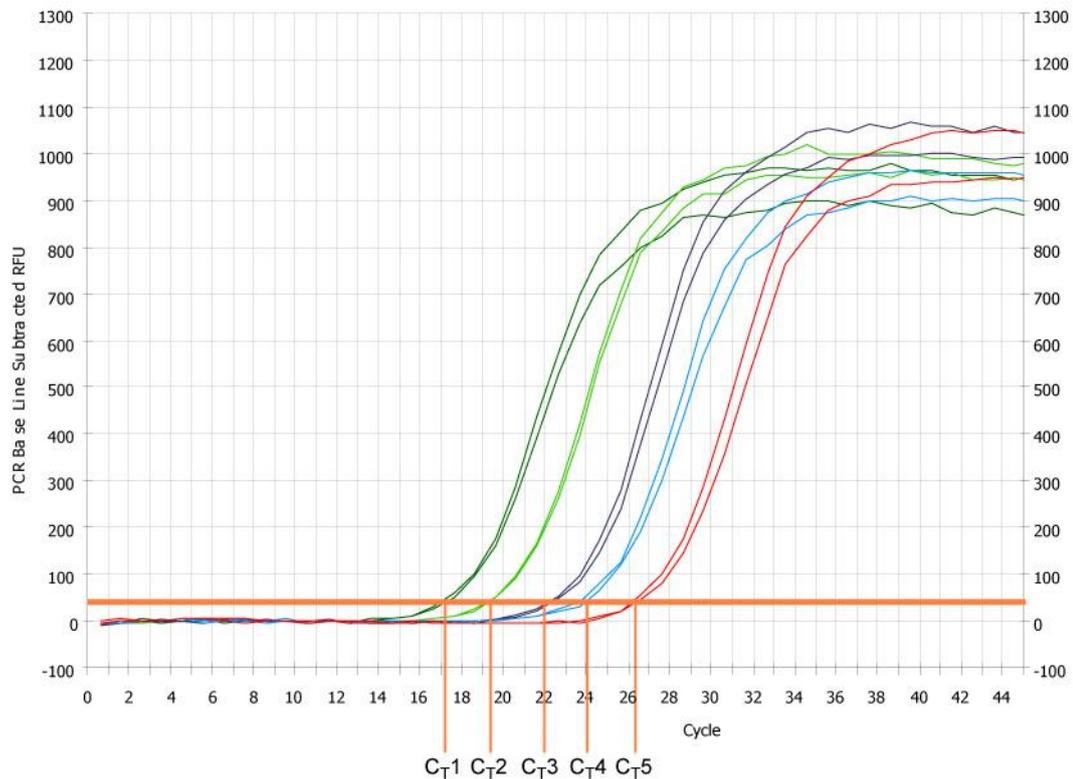


Abbildung 7: C_T -Wert-Ermittlung der Amplifikationen.

In das Diagramm aus wurde eine Horizontale eingezeichnet, die signifikant über der Hintergrundstrahlung liegt. Ausgehend von ihren Schnittpunkten mit den Amplifikationskurven wurde jeweils das Lot gefällt und so die C_T -Werte 1-5 ermittelt. Cycle: Amplifikationszyklus, PCR Base Line Subtracted RFU: Relative Fluoreszenzeinheit (relative fluorescence unit, RFU) abzüglich der vom passiven Fluoreszenzfarbstoff ausgehenden Hintergrundstrahlung

2.7.2.2 Quantifizierung des C_T

Der Wert der Fluoreszenz am C_T ist praktisch ohne Einheit, er wird erst über vorher festgelegte Referenzen definiert. Eine Referenz ist ein zur untersuchten Probe identischer Nukleinsäureabschnitt. Sind Molekulargewicht und/oder Kopienzahl der Referenz bekannt, so können diese Größen über die C_T -Werte in unbekanntenen Proben ermittelt werden. Sind diese Größen nicht bekannt, kann eine relative Quantifizierung anhand eines konstitutiv exprimierten Gens oder des untersuchten Gens im induzierten Zustand vorgenommen werden. Für die Quantifizierung unbekannter Proben muss in jedem Fall eine Eichgerade mit der bekannten Referenz erstellt werden. Für die Eichgeraden wurde die OD_{260} der isolierten Nukleinsäuren bestimmt und an einen Wert angeglichen, dem auch folgende Proben entsprachen. Die Referenz-Nukleinsäure wurde nun in mindestens fünf Schritten logarithmisch verdünnt, um zu

gewährleisten, dass die Verdünnungen einen möglichst großen Bereich überspannen. Die Verdünnungen wurden in eine Echtzeit-PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Die in der PCR ermittelten C_T -Werte wurden als Ordinaten gegen den Logarithmus der eingesetzten Startmenge in ein Diagramm eingetragen. Über lineare Regression wurden die Werte miteinander verbunden und sowohl der Anstieg, als auch der Schnittpunkt mit der Ordinatenachse bestimmt (Abbildung 8).

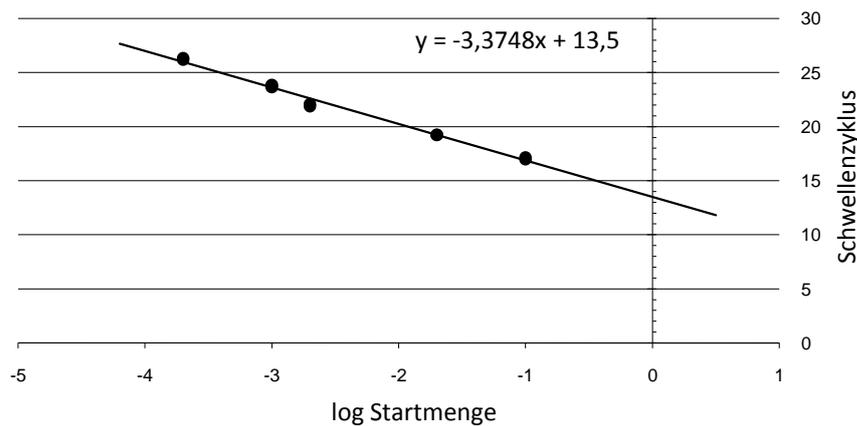


Abbildung 8: Eichgerade zur Ermittlung des Anstiegs und der Effizienz.

Die ermittelten C_T -Werte wurden gegen den Logarithmus ihrer zugehörigen Startmenge an RNA-Matrize aufgetragen. Die ermittelte Regressionsgerade gibt Aufschluss über den Anstieg und den Schnittpunkt mit der y-Achse.

Für die Eichgerade ergibt sich eine Formel nach dem Format:

$$y = mx + b \quad (\text{m: Anstieg der Eichgeraden, b: Schnittpunkt mit der y-Achse})$$

Für die Quantifizierung einer unbekannt Probe wird deren C_T -Wert als x in diese Formel eingesetzt und man erhält einen Wert y, der der eingesetzten Menge an unbekannter Probe entspricht.

2.7.2.3 Effizienzbestimmung und -optimierung

Für die pflanzenübergreifende Bestimmung von Transkriptionsmengen eines Gens ist es wichtig, dass Ergebnisse, die in den einzelnen Echtzeit-PCR ermittelt wurden, miteinander vergleichbar sind. Wesentliche Voraussetzungen dafür sind, dass die annähernd gleiche Menge an Nukleinsäure in die PCR eingesetzt wird und die Amplifikation des Zielfragments so effektiv

wie möglich verläuft. Optimal ist eine Effizienz von 100 %, dies entspricht einer Verdopplung der Amplikonmenge pro PCR-Zyklus. Die Effizienz der Echtzeit-PCR lässt sich aus dem Anstieg der Eichgeraden über die Formel:

$$E = 10^{-1/m}$$

E: Effizienz, m: Anstieg der Eichgerade

Bei einem Anstieg von 3,32 ist $E = 2$. Dies entspricht einer Effizienz von 100%. Für den prozentualen Ausdruck der Effizienz ergibt sich demnach folgende Formel:

$$E_{\%} = \frac{10^{-1/m} * 100}{2}$$

$E_{\%}$: Effizienz in Prozent, m: Anstieg der Eichgerade

Für die Eichgerade des eEF1a in Abbildung 8 ergibt sich also eine Effizienz von 98,9 %. Die Optimierung der Echtzeit-PCR beschränkt sich hauptsächlich auf die verwendeten Oligonukleotide. Die Echtzeit-PCR-Oligonukleotide in dieser Arbeit wurden in einer Länge von 20 bis 30 Bp synthetisiert, um eine größtmögliche Spezifität zu gewährleisten. Die Schmelztemperatur aller Oligonukleotide liegt bei ca. $62\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Dadurch konnten alle Gene auch parallel in einem Ansatz untersucht werden. Die Spezifität der Oligonukleotid-Paare wurde über konventionelle PCR und anschließende Agarose-Gelelektrophorese getestet. Die optimale Anlagerungstemperatur wurde über Gradienten-PCR ermittelt. In der Literatur finden sich Angaben über die optimale Länge eines Amplikons von 80 - 100 Bp, zur Steigerung der PCR-Effizienz (Bustin, 2000). Neuere Untersuchungen der Reaktionskinetik einer Echtzeit-PCR haben gezeigt, dass die Länge des Amplikons keinen Einfluss auf die PCR-Effizienz hat, ein längeres Amplikon eher der Spezifität der PCR dient (Tichopad et al, 2002).

2.7.2.4 Normalisierung nicht konstitutiv exprimierter Gene

Die Normalisierung der untersuchten Proben in einer Echtzeit-PCR geschieht auf drei Ebenen (Muller et al, 2002). Eine erste, grobe Angleichung findet über die Messung und Einstellung der eingesetzten Nukleinsäure-Mengen statt. Die zweite Angleichung wird durch den eingesetzten passiven Fluoreszenzfarbstoff erreicht, über den unterschiedliche Reaktionsvolumina vom aufzeichnenden Gerät verrechnet werden. Der dritte und genaueste Normalisierungsschritt wird über das Verhältnis des Referenzgens zur Gesamt-Nukleinsäure-Menge bestimmt.

Die Menge jedes untersuchten Gens steht im Verhältnis zur Gesamtmenge an Nukleinsäure. Bei einem konstitutiv exprimierten Gen ist dieses Verhältnis immer gleich. Sind die

Amplifikationseffizienzen von Referenz- und Zielgen bekannt, lässt sich die normalisierte Expression eines Gens mit Hilfe mathematischer Formeln über den Schwellenzyklus berechnen. Die normalisierte Genexpression eines Gens berechnet sich wie folgt:

$$nE = \frac{(E_{\text{ziel}})^{C_{T\text{ziel}}}}{(E_{\text{referenz}})^{C_{T\text{referenz}}}}$$

nE : normalisierte Expression, E_{ziel} : Effizienz der Zielgen-Amplifikation, E_{referenz} : Effizienz der Referenzgen-Amplifikation, $C_{T\text{ziel}}$: Schwellenzyklus des Zielgens, $C_{T\text{referenz}}$: Schwellenzyklus des Referenzgens

Daraus ergibt sich die Formel für die Berechnung von Triplikaten:

$$nE_{\text{Durchschnitt}} = \frac{(E_{\text{ziel}})^{\frac{C_{T\text{ziel}1} + C_{T\text{ziel}2} + C_{T\text{ziel}3}}{3}}}{(E_{\text{referenz}})^{\frac{C_{T\text{referenz}1} + C_{T\text{referenz}2} + C_{T\text{referenz}3}}{3}}}$$

$nE_{\text{Durchschnitt}}$: durchschnittliche Expression, $C_{T\text{ziel}n}$: C_T der Zielgene in der n-ten Probe, $C_{T\text{referenz}n}$: C_T des Referenzgens in der n-ten Probe

Die Standardabweichung der Expressionen errechnet sich nach folgender Formel:

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n * (n - 1)}}$$

Δx : Standardfehler, x_i : Werte der unabhängigen Messungen, \bar{x} : Durchschnittswert der unabhängigen Messungen, n : Anzahl der unabhängigen Messungen

2.8 Gerichtete Klonierung in pENTR/D-TOPO

Der kommerziell erhältliche Vektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) ermöglicht es, ein Amplikon in einer definierten Orientierung zu klonieren. Dazu werden über die Oligonukleotidsequenz vier zusätzliche Basen (CACC) an das 5'-Ende des Amplikons angehängt. Diese vier Basen binden an einen komplementären Bereich im linearisiert vorliegenden Vektor. Ein weiteres Merkmal des pENTR/D-TOPO sind die *attL*-Rekombinationsstellen, die sich links und rechts von der

Klonierungsstelle befinden. Sie ermöglichen eine schnelle Rekombinations-basierte Klonierung in andere Vektoren.

2.9 Klonierung durch Rekombination mittels GATEWAY-System

Das GATEWAY-System ermöglicht eine schnelle und gerichtete Klonierung von Fragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Im Vergleich zu klassischen Klonierungsmethoden sind bei diesem System keine zusätzlichen Restriktionsenzyme und Ligasen notwendig. Außerdem kann durch die sequenzspezifische Rekombination an sogenannten *attachment (att)*-Stellen eine gerichtete Klonierung der DNA garantiert werden. Das GATEWAY-System leitet sich vom Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ ab. Der Phage λ ist ein Bakterien-Virus, das seine lineare DNA in eine Bakterienzelle injiziert. Die Phagen-DNA kann sich in das Wirtsgenom integrieren und mit dem Wirt vermehren (lysogener Zyklus). Die Integration des Phagengenoms in das Wirtsgenom basiert auf sequenzspezifischer Rekombination zwischen zwei homologen DNA-Sequenzen, der *attP*-Stelle des Phagen und der *attB*-Stelle des Bakteriums. In gleicher Weise ist auch der Ausbau des Phagengenoms aus dem Wirtsgenom möglich. Hierbei rekombinieren die Bereiche *attL* und *attR*. Im GATEWAY-System sind diese *att*-Bereiche gentechnisch sequenzmodifiziert und in verschiedenen Vektoren integriert. Damit ist ein Austausch von DNA-Fragmenten zwischen Donor- und Zielvektor durch BP- bzw. LR-Rekombination möglich. Die BP-Reaktion ist eine Rekombination zwischen Expressions-Vektor mit *attB*-Stellen (je 25 Bp) und Donor-Vektor mit *attP*-Stellen (200 Bp). In der *attP*-Kassette sind *cat*-Gen (Chloramphenicolresistenz) und *ccdB*-Gen integriert. *ccdB* ist ein negativer Selektionsmarker, dessen Produkt die Gyrase-Funktion anfälliger *E. coli*-Stämme hemmt. Deshalb ist die Klonierung von Vektoren mit *attP*-Kassette in *ccdB*-resistente Stämme wie z.B. DB3.1 notwendig. Es können aber auch PCR-Produkte, die durch *attB*-Stellen flankiert sind, mit dem Donor-Vektor rekombinieren. Das Produkt der BP-Rekombination ist ein Entry-Vektor mit enthaltener Ziel-DNA, die von *attL*-Stellen (je 100 Bp) flankiert wird. Das zweite Produkt (Nebenprodukt) enthält das *ccdB*-Gen. Bei der anschließenden Transformation in *ccdB*-sensitive Bakterien wird gegen dieses Nebenprodukt und zugunsten des Entry-Vektors selektiert. Das Zielgen kann unter Nutzung von BP- und LR-Reaktion zwischen verschiedenen Vektoren ausgetauscht werden. Die LR-Rekombination erfolgt zwischen Entry-Vektor mit *attL*-Bereichen (je 100 Bp) und Destinations-Vektor mit *attR*-Stellen (je 125 Bp). Die *attR*-Kassette enthält wie die *attP*-Kassette *cat*-Gen und *ccdB*-Gen. Deshalb erfolgte die Vermehrung von Vektoren, die die *attR*-Kassette besitzen auch z.B. in DB3.1. Die Produkte der LR-Klonierung sind ein Expressions-Vektor mit *attB*-Stelle und ein Donor-Vektor mit *attP*-Kassette. In dieser Arbeit wurde das GATEWAY-System für die Rekombination der Silencing-Fragmente aus dem Entry-Vektor

pENTR/D-TOPO in den Zielvektor pTRV2a genutzt. Nachdem die gewünschten Fragmente amplifiziert worden waren, wurden sie gerichtet in den Entry-Vektor kloniert. Positive Klone wurden selektiert und in LR-Rekombinationsreaktionen mit dem Zielvektor eingesetzt. Das Ergebnis war ein Silencing-Konstrukt, das nach Transformation in *A. tumefaciens* in die Pflanzen infiltriert werden konnte.

2.10 Binärvektoren für TRV-VIGS

Das in dieser Arbeit benutzte VIGS basiert auf der Verwendung des TRV (Liu et al, 2002). TRV ist ein stäbchenförmiges Virus mit spiralförmiger Einzelstrang-(+)-RNA, die in der Replikation direkt als mRNA dient. Das zweigeteilte virale Genom wurde als cDNA-Klon in zwei Ti-Plasmide kloniert. Der die RNA1 enthaltende Vektor trägt die Bezeichnung pTRV1, der die RNA2 enthaltende Vektor heißt pTRV2. Zur Vereinfachung der Klonierungsschritte bei der Einführung des Zielfragmentes wurde ein Polylinker im pTRV2 durch eine *attR*-Kassette ersetzt (Liu et al, 2002). Zwischen rechter und linker Begrenzung des pTRV1 befinden sich die Gene für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ein Movement-Protein (MP), ein 16 kDa großes Cysteinereiches Protein (16K) und ein selbstschneidendes Ribozym (Rz). Die vier Virusteile werden von zwei 35S Promotoren aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (caulimovirus, CmV) auf der einen und dem Nopalinsynthase-Terminator (NOS_t) auf der anderen Seite begrenzt. Auf dem Vektor pTRV2 begrenzen die gleichen Elemente das Gen für das virale Hüllprotein (coat protein, CP), eine *attR*-Kassette und ein Rz. Die *attR*-Kassette besteht aus den Rekombinationsstellen *attR1* und *attR2*, zwischen denen sich das *ccdB*-Gen und ein Gen für Chloramphenicolresistenz (*Cm^R*) befinden. In den ursprüngliche Vektor pTRV2 wurde zur besseren Selektionierbarkeit eine Ampicillin-Resistenz integriert (T. Lahaye, P. Römer unveröffentlicht). Zur Differenzierung wurde der Vektor pTRV2a benannt. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 9 gezeigt.

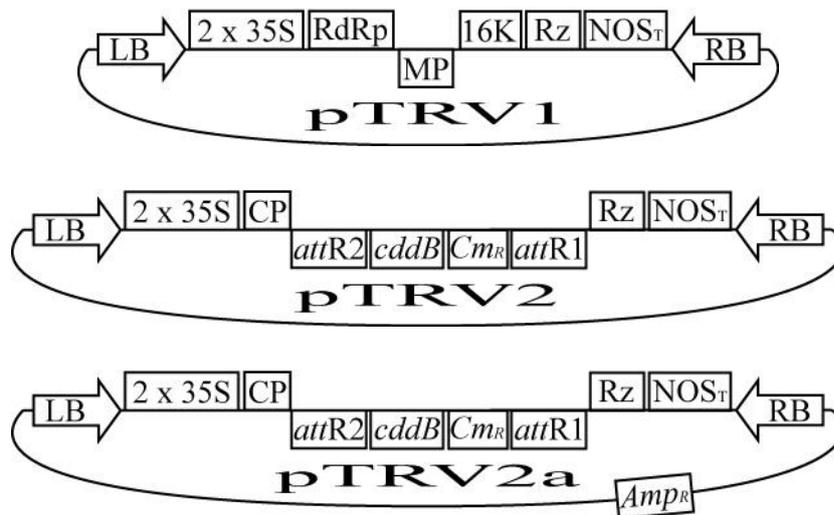


Abbildung 9: Die VIGS-Vektoren pTRV1, pTRV2 und pTRV2a.

LB: linke T-DNA-Begrenzung, 35S: 35S-Promotor, RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase, MP: Movement-Protein, 16K: 16kDa Cystein-reiches Protein, Rz: selbstschneidendes Ribozym, NOS_T: Nopalinsynthese-Terminator, RB: rechte T-DNA-Begrenzung, CP: virales Hüllprotein, attR1/attR2: GATEWAY Rekombinationskassette, ccdB: ccdB-Gen, Cm^R: Chloramphenicolresistenz, Amp^R: Ampicillin-Resistenz. Abb. nach (Liu et al, 2002)

2.10.1 Erstellung der Silencing-Konstrukte

Die PCR-Fragmente für die Silencing-Konstrukte wurden in ca. 400 Bp Länge erzeugt. Üblicherweise sind diese Fragmente zwischen 300 – 800 Bp lang, wobei auch kürzere Fragmente von 23 – 60 Bp schon erfolgreich getestet wurden (Thomas et al, 2001) (Jin et al, 2002). Über die angehängten Basen (CACC) wurden sie gerichtet in den Entry-Vektor pENTR/D-TOPO kloniert. Der Vektor wurde in *E. coli*-Zellen transformiert, vermehrt und reisoliert. In einer LR-Rekombinationsreaktion wurde das Silencing-Fragment in den Vektor pTRV2a rekombiniert. Das so entstandene Silencing-Konstrukt wurde in *A. tumefaciens* transformiert. Eine *A. tumefaciens*-Kultur mit dem Vektor pTRV1 und eine Kultur mit dem jeweiligen Silencing-Konstrukt wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in die Pflanzen infiltriert, wo die T-DNA in die Pflanzen-DNA integrierte. Bei der Transkription in der Pflanze wurden die Viruskomponenten repliziert und nach ihrer Translation assembliert. Das Virus konnte sich systemisch in der Pflanze ausbreiten und seine Erbinformation in weitere Zellen integrieren. Bei der anschließenden Transkription wurden neben den viralen Genen auch großen Mengen mRNA des exogenen Silencing-Fragments erzeugt. Die, bei der TRV-Replikation übliche, Bildung von dsRNA löste PTGS in der Pflanze aus.

2.10.2 VIGS-Infiltrationsmethoden

Die Infiltration der *A. tumefaciens*-Bakteriensuspension erfolgte entweder mittels einer nadellosen Spritze oder per Vakuuminfiltration. Bei der Spritzeninfiltration wurde die Suspension auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,01 und 1 eingestellt, in die Spritze aufgenommen und in die Blattunterseite der Versuchspflanzen infiltriert. Nach Möglichkeit wurden die Pflanzen eine halbe Stunde vor Infiltration gegossen oder mit Wasser besprüht, sodass sich die Spaltöffnungen weiteten, was die Infiltration erleichterte. Für die Vakuuminfiltration wurde die Bakteriensuspension auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,01 und 0,2 eingestellt. Der Pflanzengröße entsprechend wurde ein Gefäß ausgewählt und mit ausreichend Suspension gefüllt. Um die Oberflächenspannung der Suspension zu reduzieren und damit die Haftung von Luftblasen an der Blattoberflächen zu verringern, wurde 0,02 % Silwet L77 (Union Carbide) zu der Lösung hinzugefügt. Die Pflanzgefäße wurden um den Pflanzenstängel herum mit Aluminium- oder Kunststoffolie abgedeckt, um zu verhindern, dass Substrat oder Wasser in die Lösung tropfen kann. Zur Stabilisierung wurde zusätzlich eine zur Hälfte geschlitzte Pappscheibe auf den Rand der Pflanzgefäße gelegt. In einem Exsikkator wurden die Pflanzen kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht und für ca. 4 min einem Vakuum ausgesetzt. Das Vakuum wurde mittels Membran-Pumpe eine Minute lang aufgebaut, wonach die Pflanzen 2 min im Vakuum belassen wurden. Das anschließende Einlassen der Luft in den Exsikkator über das eingebaute Ventil dauerte ebenfalls ca. 1 min. Nach der Inokulation wurden die Pflanzen für ca. 10 - 20 min seitlich liegend auf Papierhandtüchern getrocknet, um zu verhindern, dass Bakteriensuspension in das Substrat tropft.

2.11 Fluoreszenzmikroskopie

2.11.1 GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Blattproben wurden je nach exprimiertem Konstrukt zwischen 24 und 36 hpi genommen und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 505 - 530 nm Bandpass-Filter für GFP analysiert. Zur Visualisierung von Zellkernen wurde ca. 1 h vor der Analyse am LSM 0,01%ige DAPI-Lösung in die infizierten Bereiche infiltriert. Anschließend wurden die Pflanzen für mind. 30 min dunkel gestellt. Das infiltrierte DAPI in den Proben wurde bei 364 nm angeregt und die DAPI-Fluoreszenz mit einem Bandpass-Filter 385 - 470 nm aufgenommen.

2.11.2 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Interaktionsstudien mittels BiFC wurden unter Verwendung des gelb fluoreszierenden Proteins („yellow fluorescent protein“, YFP) durchgeführt, welches in eine C-terminale und eine N-terminale Domäne geteilt wurde (YFP_N: As 1-154, YFP_C: As 155-239). BiFC-Experimente erfolgten nach transienter Expression der entsprechenden Gene mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana*. Für die Fluoreszenzdetektion wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit spezifischen Filtern für YFP verwendet.

2.12 Proteasetest

Für die Proteasetests wurde das RediPlate™ 96 EnzChek® Protease Assay Kit (Invitrogen) nach Angaben des Hersteller verwendet. Die His-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gebunden. Wäsche und Elution erfolgten unter nativen Bedingungen. Von insgesamt vier Eluatenthielten die Eluate zwei und drei jeweils größere Mengen an Fusionsproteinen und wurden vereinigt. Je ein 1 µg der Fusionsproteine und Proteinase K (Invitrogen) wurden in jeweils fünf Reaktionsgefäße gegeben. Zur Bestimmung des Spontanzerfalls des Casein-Substrates wurden je fünf Reaktionsgefäße nur mit Elutionspuffer gefüllt. Direkt nach der Zugabe wurde die Fluoreszenz bei 635 nm bestimmt. Der Ansatz wurde anschließend für zwei Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert und die Fluoreszenz halbstündlich gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der fünf Werte jeder Probe pro Zeitpunkt gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Der Spontanzerfall wurde von allen Werten abgezogen.

2.12.1 Splicing by overlap extension PCR

Bei der SOE-PCR werden zwei einzeln amplifizierte Fragmente (A und B) über einen künstlichen überlappenden Bereich in einer PCR zusammengefügt. So lassen sich Deletionen oder Mutationen an einem Gen vornehmen. Die Oligonukleotide für die SOE-PCR wurden so gewählt, dass 3 – 5 zusätzliche Nukleotide am 3'-Ende des Fragments A mit dem 5'-Ende des Fragments B übereinstimmen und dass 3 – 5 zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende des Fragments B mit dem 3'-Ende des Fragments A übereinstimmen. So ergibt sich ein Bereich von 6 – 10 überlappenden

Nukleotiden. In einem ersten Schritt wurden die Fragmente A und B je einzeln amplifiziert und zu gleichen Teilen in eine zweite Reaktion zur Amplifikation des Gesamtfragments C eingesetzt. Als Oligonukleotide wurden der forward-primer des A-Fragments und der reverse-primer des B-Fragments zugegeben.

2.13 Koimmunpräzipitation (KoIP) von Protein-Protein-Interaktionen

Für KoIP-Experimente wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. 48 hpi wurden 2 Blattscheiben mittels Korkbohrer (d = 9 mm) geerntet und in „Safelock“-Reaktionsgefäßen (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Homogenisierung des Blattmaterials wurde 1 ml KoIP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 µl Protease-Inhibitor-Mischung (complete, EDTA-free; Roche) sowie eine Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen und 15 minütiger Zentrifugation wurde der Extraktüberstand mit 2,1 µl 15%igem Nonidet-P40 versetzt, zu 25 µl Protein G-Agarose (Roche) gegeben und für 30 min bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Der vorgeklärte Extrakt wurde anschließend mit 25 µl Protein G-Agarose gemischt (Roche) und über Nacht bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4 °C kaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 1 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

2.14 SDS-Gel-Elektrophorese und Westernblot

Proteine wurden mittels SDS-PAGE unter Verwendung 8 - 12%iger Gele aufgetrennt. Für Westernblot-Analysen wurden Proteine auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit polyklonalem Anti-GFP-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonalem Anti-HA-Antikörper (Ratte; Santa Cruz) oder monoklonalem Anti-c-Myc-Antikörper (Maus; Roche) inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden sekundären Antikörpers erfolgte die Detektion der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

2.14.1 Transmissionselektronenmikroskopie

30 h nach *Agrobacterium*-Infiltration wurden Gewebeproben entnommen, in Methanol gefroren und mittels Gefriersubstitution aufbereitet. Ultradünnschnitte wurden anschließend mit einem polyklonalen GFP-Antikörper (Clontech) und mit einem 10 nm-Goldkugelchen-konjugierten zweiten Antikörper (Sigma) inkubiert. Die Aufnahmen des Transmissionselektronenmikroskops wurden von Dr. Gerd Hause angefertigt.

2.14.2 Proteinmengenbestimmung

Um Proteinmengen gereinigter Proteine so genau wie möglich in die enzymatischen Tests einsetzen zu können, wurden sie bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Mit dem Programm ProtParam (Gasteiger et al, 2005) (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) wurde anhand der bekannten Proteinsequenz der Fusionsproteine deren Extinktionskoeffizient bestimmt, bspw. $31860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für AvrBsT.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Bemerkung
aBs1-fe	CACCATGTCCGACATGAAAGTTAATTC	avrBs1 forward für pENTR/D Topo
aBs1-r	CTCTTACGCTTCTCCTGCATTTGTAAC	avrBs1 reverse mit Stopp
aBs1-rsl	CGCTTCTCCTGCATTTGTAACATG	avrBs1 reverse ohne Stopp
aBsT-fe	CACCATGAAGAATTTTATGCGTTTAC	avrBsT forward für pENTR/D Topo
aBsT-r	CGAATTATGATTCAATAGTTTTCTAATTTTC	avrBsT reverse mit Stopp
aBsT-rsl	TGATTCAATAGTTTTCTAATTTTCTC	avrBsT reverse ohne Stopp
xpJ-fe	CACCATGGGTCTATGCGTTTCA	xopJ forward für pENTR/D Topo
xpJ-rsl	TGACTGGCGATCAGAGATAGCTGTC	xopJ reverse ohne Stopp
xpJG2E-fe	CACCATGGAGCTATGCGTTTCAAAGCCGAG	xopJ forward mit Mutation Gly2 für pENTR/D Topo
xJmC-f	CACAGAAGTCTGCAGCGGACGCC	xopJ Mutation Cys 235 SOE-forward
xJmC-r	ATGCAGATCGAACATCAGGGC	xopJ Mutation Cys 235 SOE-reverse
xJmH-f	GACTAGAACGTGATGGTGAAGCT	xopJ Mutation His 173 SOE-forward
xJmH-r	GAACATCCGCTGCCACGTGAGC	xopJ Mutation His 173 SOE-reverse
aRxx-fe	CACCATGTGCGACTCCATAAGAGTG	avrRxx forward für pENTR/D Topo
aRRxx-r	GGATTCTAAGGCGTGACGGA	avrRxx reverse ohne Stopp
siTYR-fe	CACCATGAGTGCAAGTGAAGGGAG	„Silencing“-Fragment 1- <i>Tyr</i> forward
siTYR-r	ACGATCCTGAGCGTTGACAT	„Silencing“-Fragment 1- <i>Tyr</i> reverse
siTIP-fe	CACCATGGCTGGCGGCGTAGCTAT	„Silencing“-Fragment 1- <i>Tip</i> forward
siTIP-r	GGGTTAACATGACCACCGGA	„Silencing“-Fragment 1- <i>Tip</i> reverse
siEF1-fe	CACCATGGGTAAAGAGAAGATTCA	„Silencing“-Fragment T- <i>Ef1</i> forward
siEF1-r	ATGGTAATACCACGTTCCACG	„Silencing“-Fragment T- <i>Ef1</i> reverse
siSNF-fe	CACCATGGACGGAACAGCAGTGCA	„Silencing“-Fragment T- <i>Snf</i> forward
siSNF-r	GCAATCTGCCCTTCTCAACA	„Silencing“-Fragment T- <i>Snf</i> reverse
siGYF-fe	CACCATGAATAACTCAGATGTTTCTCTCG	„Silencing“-Fragment T- <i>Gyf</i> forward
siGYF-r	AGATCTTTTGGGGCTCTTTT	„Silencing“-Fragment T- <i>Gyf</i> reverse
siABC-fe	CACCATGAAGATTCTGTACCAA	„Silencing“-Fragment T- <i>Abc</i> forward
siABC-r	CTACAATGTTGTCCCATCA	„Silencing“-Fragment T- <i>Abc</i> reverse
1-TIP-fe	CACCATGGCTGGCGGCGTAGCTAT	δ-TIP voller ORF forward
1-TIP-rsl	GAAGTATTGGATAAAGGAGCATG	δ-TIP voller ORF reverse ohne Stopp
1-TYR-fe	CACCATGAGTGCAAGTGAAGGGAG	Tyrosinkinase voller ORF forward
1-TYR-rsl	TGAAGTGAAAAGGTGCCAATGATG	Tyrosinkinase voller ORF reverse ohne Stopp
T-EF1-fe	CACCATGGGTAAAGAGAAGATTC	Elongationsfaktor 1 α voller ORF forward
T-EF1-rsl	CTTCTTCTTTGGGCAGCCTTGGTG	Elong.-faktor 1 α voller ORF reverse ohne Stopp
SISnRK1-fe	CACCATGGACGGAACAGCAGTGCAGGG	SnRK1 aus Tomate voller ORF forward
SISnRK1-rs	TTAAAGTACTCGAAGCTGAGCAAG	SnRK1 aus Tomate voller ORF reverse mit Stopp
SISnRK1-rsl	AAGTACTCGAAGCTGAGCAAG	SnRK1 aus Tomate voller ORF reverse ohne Stopp
CaSnRK1-fe	CACCATGGATGGGTCAACAGTCCAAG	SnRK1 aus Paprika voller ORF forward
CaSnRK1-rs	TCAAAGGACCCGAAGCTGAGCAAG	SnRK1 aus Paprika voller ORF reverse mit Stopp
CaSnRK1-sl	AAGGACCCGAAGCTGAGCAAG	SnRK1 aus Paprika voller ORF reverse ohne Stopp
rtSNF-f	TGCGCGATGGTCATTTTCTG	qRT-PCR forward SnRK1 Paprika und Tomate
rtSNF-r	GCAGGCGAATCTCAGGAATA	qRT-PCR reverse SnRK1 Paprika und Tomate
rtEF1-f	AGTCAACTACCACTGGTCAC	qRT-PCR forward eEF1A Paprika und Tomate
rtEF1-r	GTGCAGTAGTACTTAGTGGTC	qRT-PCR reverse eEF1A Paprika und Tomate

3 Ergebnisse

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung der Suppression der AvrBs1-HR durch AvrBsT. Aus *Xcv* sind neben AvrBsT drei weitere YopJ-homologe Proteine bekannt, von denen XopJ noch nicht auf Suppression der AvrBs1-HR getestet worden war. Das mögliche N-Myristoylierungsmotiv und die katalytische Triade von XopJ sollten ebenfalls charakterisiert werden.

3.1 Das Effektorprotein XopJ besitzt ein N-Myristoylierungsmotiv

Bioinformatische Analysen der XopJ-Proteinsequenz mit den Programmen NMT und Myristoylator wiesen auf ein mögliches N-Myristoylierungsmotiv in den ersten 17 Aminosäuren von XopJ hin (Bologna et al, 2004; Eisenhaber et al, 2003; Farazi et al, 2001; Thieme et al, 2007). An solchen, typisch eukaryotischen, Motiven können Proteine von einer N-Myristoyltransferase (NMT) acyliert werden und sich dadurch reversibel an die Plasmamembran anheften (Farazi et al, 2001). Ein N-terminaler Glycinrest dient als Akzeptor der Acylierung, ein eventuell vorhandener Cysteinrest an Position 4 kann zusätzlich palmitoyliert werden und so die Membranbindung verstärken (Farazi et al, 2001). Im *Xcv*-Stamm 85-10, dessen Genomsequenz bekannt ist, besitzen neben XopJ nur noch zwei weitere Effektorproteine, XopE1 und XopE2, ein solches N-Myristoylierungsmotiv (Abbildung 10) (Thieme et al, 2005; Thieme et al, 2007).

		2	4		10		20													
XopJ . . . (1)	M	G	L	C	V	S	K	P	S	V	A	G	S	P	E	H	Y	A	A	H
XopE2 . . (1)	M	G	L	C	I	S	K	P	A	M	S	G	S	S	V	A	A	S	P	E
XopE2 . . (1)	M	G	L	C	S	S	K	P	S	V	V	G	S	P	V	A	G	S	P	E

Abbildung 10: N-Myristoylierungsmotiv von XopJ, XopE1 und XopE2.

Der Sequenzvergleich der N-Termini von XopJ, XopE1 und XopE2 zeigt ein konserviertes N-Myristoylierungsmotiv. Der Gly-Rest an Position 2 wird wahrscheinlich myristoyliert. Gelb unterlegt sind die vier As-Reste, die mit dem aktiven Zentrum der NMT interagieren. In allen drei Proteinen befindet sich ein Cys-Rest an Position 4 (rot). Die vier As-Reste, die mit der Oberfläche der NMT interagieren, sind blau unterlegt (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004). Abb. nach (Thieme et al, 2007).

3.1.1 XopJ akkumuliert in Zellwandnähe pflanzlicher Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Lokalisierungsstudien analysiert werden, ob XopJ myristoyliert wird und welche Auswirkungen die Mutation des N-terminalen Gly-Rests auf die Lokalisierung und die Erkennung in *N. benthamiana* hat. Eine elegante Methode zur Lokalisierung von Effektoren ist die Untersuchung von Fusionsproteinen zwischen Effektor und optischen Markern mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM). Als optischer Marker wurde in dieser Arbeit das grün-fluoreszierende Protein (GFP) gewählt, welches translational im Binärvektor pGWB5 an den C-Terminus des Effektorproteins fusioniert wurde. Mittels *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers wurden die Fusionskonstrukte in die Modellpflanze *N. benthamiana* transferiert und unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors exprimiert. *N. benthamiana* ist keine Wirtspflanze von *Xcv* (Metz et al, 2005). Die transiente *in planta*-Expression von z. B. GFP-Fusionsproteinen in der *Xcv*-Wirtspflanze *Capsicum annuum* zeigte jedoch, dass nur etwa jede zehnte Zelle bei Anregung von GFP fluoresziert (am Beispiel von XopJ_{WT}-GFP gezeigt in Abbildung 11). Die Transformationseffizienz scheint im Vergleich zu *N. benthamiana* sehr viel niedriger zu sein, was Lokalisierungsexperimente erheblich erschwert. Unterschiede in der Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen in *N. benthamiana* und *C. annuum* konnten bisher nicht beobachtet werden (Abbildung 11). Zunächst wurde eine *xopJ*-Mutante erstellt, in der über den Vorwärtsprimer das Codon für Gly gegen ein Codon für Glu im N-Myristoylierungsmotiv ausgetauscht wurde. Das *xopJ*_{G2E}-Konstrukt wurde, neben dem Wildtypgen *xopJ*_{WT}, in den Expressionsvektor pGWB5 kloniert und in Lokalisierungsstudien eingesetzt.

In einem Zeitraum von 20 - 72 h nach Inokulation der Agrobakterien in *N. benthamiana* wurden Gewebeprouben am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) untersucht. Wie die Abbildung 11 zeigt, akkumulierte XopJ_{WT}-GFP in Zellwandnähe. Die Mutante XopJ_{G2E}-GFP hingegen war im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert, vergleichbar zu GFP. Zur Visualisierung der Nuklei wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) infiltriert, das sich an AT-reiche Sequenzen der DNA anlagert.

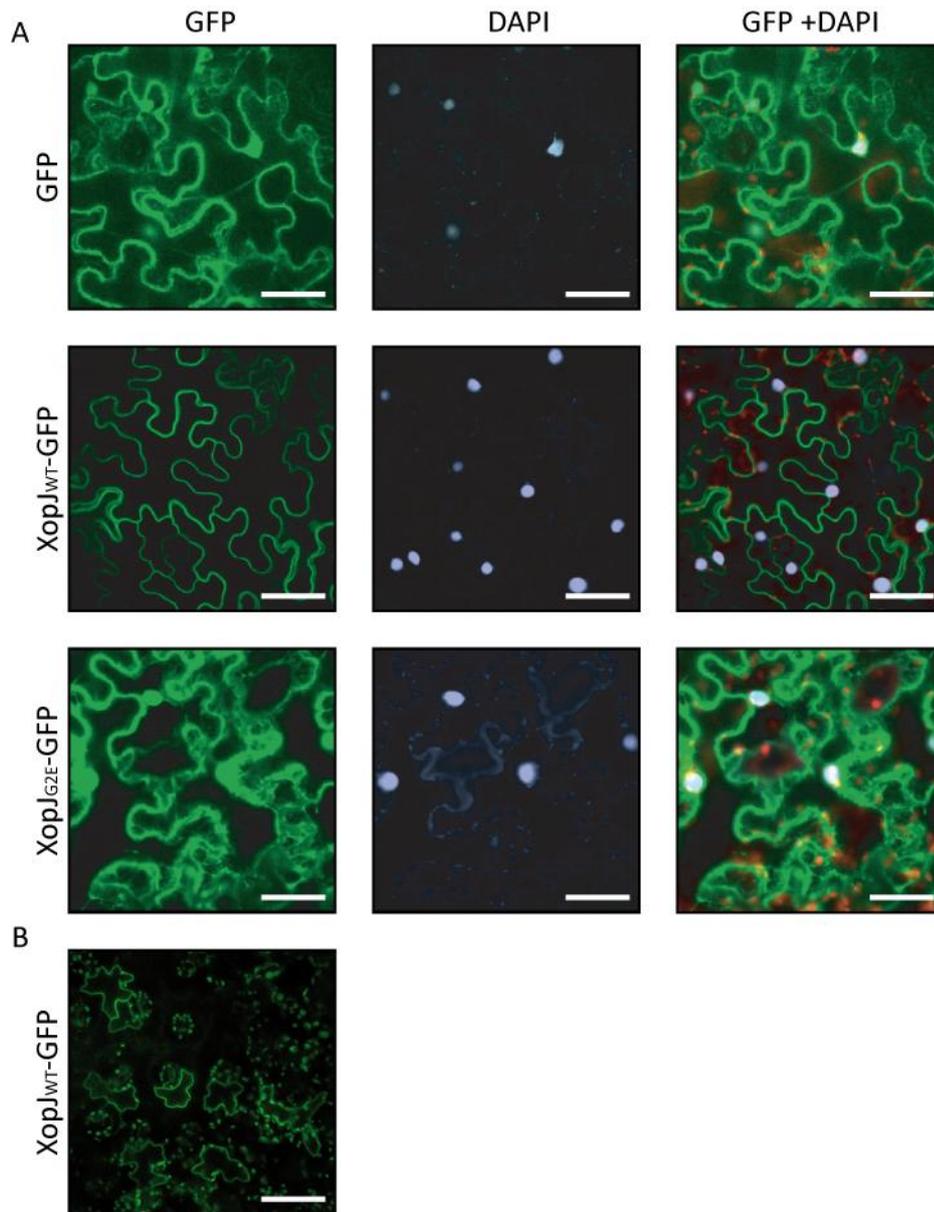


Abbildung 11: XopJ-GFP akkumuliert in Epidermiszellen nahe der Zellwand.

(A) Derivate des *Agrobacterium*-Stamms GV3101 mit pGWB6 (*gfp*), pGWB5_xopJ_{WT} oder pGWB5_xopJ_{G2E} wurden in *N. benthamiana*-Blätter (je 1×10^9 cfu/ml) inokuliert. 30 hpi wurde DAPI in die infizierten Bereiche infiltriert. Die GFP-Fluoreszenz in Epidermiszellen ist links gezeigt, DAPI-gefärbte Zellkerne in der Mitte. Die rechte Spalte zeigt eine Überlagerung der beiden Kanäle. (B) XopJ_{WT}-GFP-Fluoreszenz in *C. annuum*-Epidermiszellen. Der Größenstandard beträgt jeweils 50 μ m.

Die Untersuchung der *N. benthamiana*-Epidermiszellen lieferte erste Hinweise auf eine Membranlokalisierung von XopJ-GFP, da die GFP-Fluoreszenz in Zellwandnähe akkumulierte und keine Zytoplasmastränge sichtbar waren. Allerdings enthalten Epidermiszellen wenige oder keine Chloroplasten und Vakuolen, die bis zu 99 % des Zellinhalts ausmachen können, weshalb eine Lokalisierung im Zytoplasmasaum nicht ausgeschlossen werden konnte. In Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause (Biozentrum der MLU Halle) wurden deshalb vertikale Dünnschnitte von XopJ_{WT}-GFP- und XopJ_{G2E}-GFP-exprimierendem *N. benthamiana*-Gewebe angefertigt, um Mesophyllzellen untersuchen zu können. In Mesophyllzellen umschließt das Zytoplasma viele Chloroplasten, wodurch es stärker verteilt wird als in Epidermiszellen und optisch besser von der Zellmembran unterscheidbar ist. Die Schnitte der *N. benthamiana*-Gewebeproben wurde immunzytochemisch am Fluoreszenzmikroskop mit einem gegen GFP gerichteten, fluoreszierenden Alexa 488-Antikörper (Invitrogen) untersucht. Wie in der Abbildung 12 A dargestellt, war XopJ_{WT}-GFP-Fluoreszenz in Mesophyllzellen als eine feine Linie in der Nähe der Zellwand zu beobachten und im Zellkern nicht sichtbar (siehe vgl. DAPI-Fluoreszenz). Dagegen akkumulierte XopJ_{G2E}-GFP, ähnlich wie GFP, im Zytoplasma und in Nuklei.

Um die Lokalisierung von XopJ_{WT}-GFP und XopJ_{G2E}-GFP noch genauer bestimmen zu können, wurde im Folgenden die Ultrastruktur der Gewebe mittels Transmissionselektronenmikroskops untersucht (siehe 2.14.1). Wie die Abbildung 12 B zeigt, akkumulierte ein Großteil des XopJ_{WT}-GFP an der Plasmamembran, während XopJ_{G2E}-GFP in der gesamten Zelle verteilt war. Daraus kann man schließen, dass die Lokalisierung von XopJ-GFP in der Pflanzenzelle wahrscheinlich vom Gly an Position 2 abhängt.

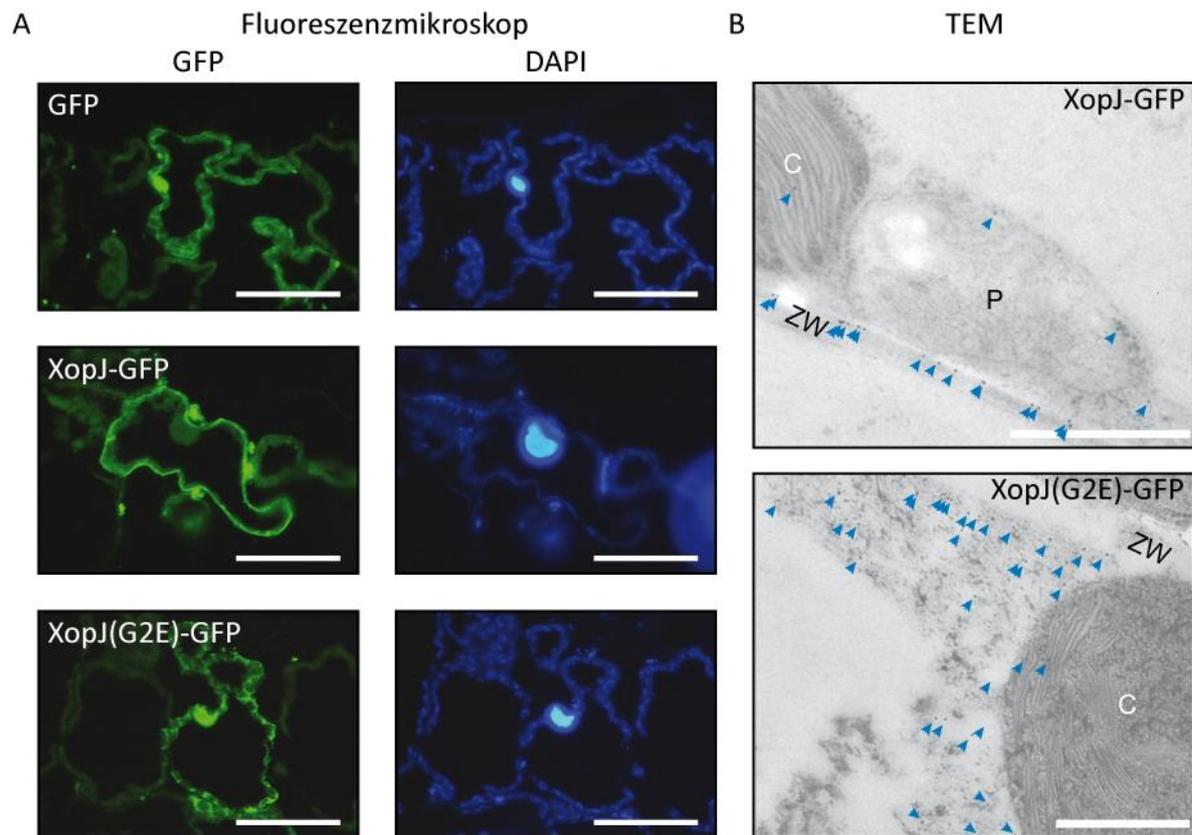


Abbildung 12: XopJ-GFP akkumuliert an der pflanzlichen Plasmamembran in Mesophyllzellen.

(A) GFP und GFP-Fusionsproteine wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert. 30 hpi wurden die Proteine in Mesophyllzellen immunzytochemisch mit einem gegen GFP gerichteten Alexa 488-Antikörper am Fluoreszenzmikroskop lokalisiert. Der Größenstandard entspricht 50 μm . (B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme XopJ_{WT}-GFP- und XopJ_{G2E}-GFP-exprimierendes Gewebes, inkubiert mit einem GFP-Antikörper und einem Gold-gekoppelten zweiten Antikörper. Pfeile markieren Goldpartikel, ZW die Zellwand, P Peroxisomen und C Chloroplasten. Der Größenstandard entspricht 500 nm.

Um nachzuweisen, dass die Fusionsproteine stabil exprimiert werden, wurden XopJ_{WT}-GFP und XopJ_{G2E}-GFP mittels Western-Blot von pflanzlichen Proteinextrakten untersucht. Wie die Abbildung 13 zeigt, waren beide Fusionsproteine stabil. Auffällig ist, dass XopJ_{WT}-GFP etwas oberhalb der erwarteten Größe von 66 kDa bei ca. 75 kDa nachzuweisen war, wohingegen XopJ_{G2E}-GFP etwa die erwartete Größe zeigt. Das veränderte Laufverhalten wird möglicherweise durch anheftende Membranfragmente verursacht.

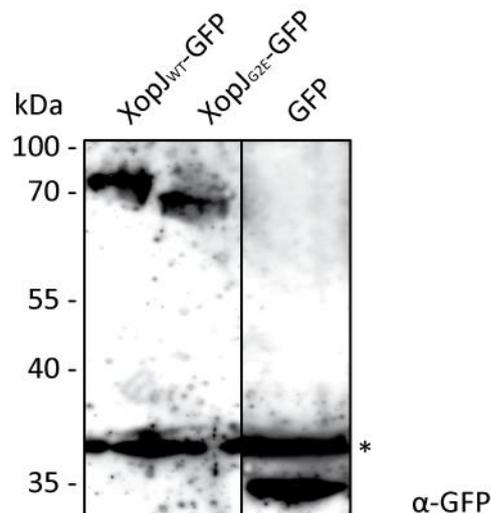


Abbildung 13: Nachweis der XopJ-GFP-Fusionsproteine.

XopJ_{WT}-GFP, XopJ_{G2E}-GFP und GFP wurden *Agrobacterium*-vermittelt in Blättern von *N. benthamiana* exprimiert. 30 hpi wurden Proteinextrakte aus dem Blattgewebe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFP inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen Kaninchen. * markiert eine unspezifische Hintergrundbande.

3.1.2 Die Analyse der XopJ-vermittelten HR in *N. benthamiana*

XopJ löst nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression die HR in *N. benthamiana* aus (Thieme et al, 2007). Um zu untersuchen, ob die HR-Induktion von der XopJ-Lokalisierung abhängig ist, wurden die Fusionsproteine XopJ_{WT}-GFP (Wildtyp) und XopJ_{G2E}-GFP (N-Myristoylierungsmutante) transient in *N. benthamiana* exprimiert. Über einen Zeitraum von 72 hpi wurden die Phänotypen dokumentiert. Die Abbildung 14 zeigt, dass XopJ_{WT}-GFP die HR in *N. benthamiana* auslöst, während XopJ_{G2E}-GFP im gleichen Zeitraum keine HR induziert. Dies lässt vermuten, dass die pflanzliche Reaktion auf XopJ vom Gly2 und damit möglicherweise von der Lokalisierung des Proteins abhängig ist. Die Experimente wurden ohne Epitop-Markierung der Proteine wiederholt. Dazu wurden XopJ_{WT} und XopJ_{G2E} in den Binärvektor pGWB2 rekombiniert und über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. Die inokulierten Blätter wurden bis 10 dpi beobachtet. Die Proteine lösten ohne Epitop-Markierung die gleichen Phänotypen aus wie mit GFP-Markierung (Daten nicht gezeigt). Die C-terminale GFP-Fusion hat scheinbar keinen Einfluss auf die HR-Induktion durch XopJ_{WT}.

XopJ zeigt Ähnlichkeit zur YopJ-Familie, die durch eine katalytische Triade aus Histidin, Glutaminsäure oder Asparaginsäure und Cystein gekennzeichnet ist (Noël et al, 2001). Für andere Mitglieder dieser Familie ist bekannt, dass ihre Erkennung in der Pflanze von einer intakten katalytischen Triade abhängt (Bonshtien et al, 2005; Orth et al, 2000; Roden et al,

2004a). Deshalb sollte die Bedeutung der intakten katalytischen Triade für die Erkennung von XopJ mittels Mutanten untersucht werden. Die katalytische Triade von XopJ besteht aus Histidin an Position 173, Glutaminsäure an Position 193 und Cystein an Position 235. Per SOE-PCR (siehe 2.12.1) wurden Einzelaustauschmutanten in His173 und Cys235, jeweils zu Alanin, im Plasmid pENTR/D_xopJ erstellt. Zur Expression in der Pflanze wurden *xopJ_{H173A}* und *xopJ_{C235A}* in den Binärvektor pGWB5 (C-terminale GFP-Markierung) rekombiniert und über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. Wie die Abbildung 14 zeigt, löste das Wildtypkonstrukt XopJ-GFP die HR in *N. benthamiana* aus, während XopJ_{H173A}-GFP und XopJ_{C235A}-GFP keine HR induzierten. Die stabile Expression der XopJ-Fusionsproteine wurde mittels GFP-Antikörpers im Western-Blot überprüft und bestätigt. Die XopJ-vermittelte HR-Induktion in *N. benthamiana* scheint also sowohl vom Gly 2, als auch von einer intakten katalytischen Triade abhängig zu sein.

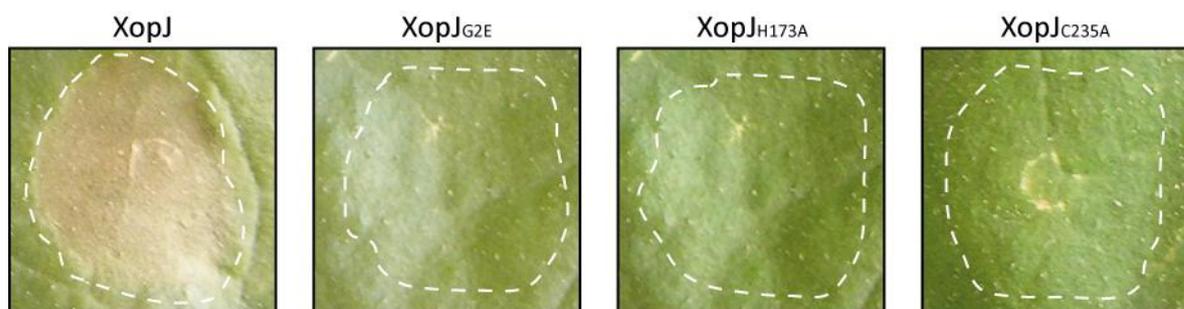


Abbildung 14: Analyse der XopJ-HR in *N. benthamiana*.

Die *xopJ*-Derivate wurden über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (1×10^9 cfu/ml) in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. 4 dpi wurden die Reaktionen auf die GFP-Fusionsproteine XopJ_{WT}-GFP, XopJ_{G2E}-GFP, XopJ_{H173A}-GFP und XopJ_{C235A}-GFP auf den Blättern der Pflanzen dokumentiert. Die weißen Linien markieren die inokulierten Bereiche.

3.2 Die Erkennung von AvrBs1, AvrBsT und XopJ in verschiedenen Pflanzenspezies

Die Effektorprotein-vermittelte Auslösung der HR in Pflanzen kann bei biochemischen Arbeiten problematisch sein. Andererseits ist die HR aber auch hilfreich bei der Analyse der Aktivität von Effektorproteinen und -mutanten und kann als Marker genutzt werden. Bereits bekannt war, dass AvrBs1 auf *C. annuum* ECW-10R (Paprika) eine HR auslöst (Ronald & Staskawicz, 1988). ECW-10R Pflanzen sind nahezu isogen zu Paprika ECW-Pflanzen, enthalten allerdings das noch nicht klonierte Resistenzgen *Bs1*, das für die AvrBs1-HR verantwortlich ist. AvrBsT induziert die HR in *N. benthamiana* und in *C. annuum* ECW (Minsavage et al, 1990; Orth et al, 2000). Wie oben

bereits beschrieben, löst XopJ ebenfalls die HR in *N. benthamiana* aus (Thieme et al, 2007). Um das Spektrum an reagierenden Testpflanzen zu erweitern, wurden die Effektoren in verschiedenen Nachtschattengewächsen exprimiert. Dazu wurden die Gene *avrBs1*, *avrBsT_{WT}* und *avrBsT_{C222A}* in die Binärvektoren pGWB2 und pGWB5 rekombiniert und mit *xopJ_{WT}*, *xopJ_{G2E}* und *xopJ_{C235A}* mit und ohne Epitop-Markierung (siehe 3.1.2) *Agrobacterium*-vermittelt in je zwei Pflanzen pro Spezies exprimiert. Die Phänotypen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen dokumentiert (siehe Tabelle 4). Das Experiment wurde einmal nach zwei Wochen mit denselben Pflanzen und einmal unabhängig wiederholt. Von den getesteten Pflanzen reagierte nur *C. annuum* ECW-10R auf AvrBs1. Eine AvrBsT-vermittelte HR wurde in 10 von 17 getesteten Pflanzen beobachtet und scheint in jedem Fall von der intakten katalytischen Triade abhängig zu sein, da die Mutante AvrBsT_{C222A} in keiner der Pflanzen eine HR auslöste. XopJ_{WT} wurde in drei *Nicotiana*-Arten und in *Physalis peruviana* erkannt. In *P. peruviana* wurde interessanterweise auch die XopJ_{G2E}-Mutante erkannt, nicht aber die XopJ_{C235A}-Mutante. Hier erfolgt die Erkennung von XopJ möglicherweise unabhängig von der Lokalisierung, ist jedoch abhängig von der katalytischen Triade. Es wurde kein phänotypischer Unterschied zwischen Proteinen mit oder ohne GFP-Epitop beobachtet.

Tabelle 4: HR-Induktion von AvrBs1, AvrBsT und XopJ in verschiedenen Pflanzenspezies

Spezies	AvrBs1	AvrBsT	AvrBsT _{C222A}	XopJ _{WT}	XopJ _{G2E}	XopJ _{C235A}
<i>Capsicum annuum</i> ECW	—	hr	—	—	—	—
<i>Capsicum annuum</i> ECW-10R	HR	hr	—	—	—	—
<i>Capsicum annuum</i> ECW-20R	—	hr	—	—	—	—
<i>Capsicum annuum</i> ECW-30R	—	hr	—	—	—	—
<i>Nicandra physaloides</i>	—	HR	—	—	—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	—	HR	—	HR	—	—
<i>Nicotiana clevelandii</i>	—	HR	—	HR	—	—
<i>Nicotiana tabacum</i>	—	HR	—	HR	—	—
<i>Petunia spec.</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Physalis alkekengi</i>	—	HR	—	—	—	—
<i>Physalis peruviana</i>	—	—	—	HR	HR	—
<i>Solanum americanum</i>	—	HR	—	—	—	—
<i>Solanum lycopersicum</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Solanum nigrum</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Solanum pseudocapsicum</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Solanum suaveolens</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Solanum tuberosum</i>	—	—	—	—	—	—

HR = hypersensitive Reaktion, hr = schwache HR, — = keine HR

In zwei unabhängigen Experimenten wurden je zwei Pflanzen pro Spezies zweimal im Abstand von zwei Wochen getestet.

3.3 Die Analyse der AvrBsT-vermittelten Suppression der AvrBs1-HR

Das Effektorprotein AvrBs1 löst in resistenten *C. annuum* ECW-10R-Pflanzen die HR aus (Ronald & Staskawicz, 1988). In vorangegangenen Arbeiten wurde beobachtet, dass die AvrBs1-HR durch das Effektorprotein AvrBsT supprimiert wird und dass dies von den As-Resten His154 und Cys222 in der katalytischen Triade von AvrBsT abhängt. Die AvrBsT-homologen Proteine AvrRxv und AvrXv4 supprimieren jedoch die AvrBs1-HR nicht (L. Escolar und U. Bonas, unveröffentlicht).

Es stellte sich die Frage, ob XopJ als viertes bekanntes Mitglied der C55-Familie in *Xcv*, die AvrBs1-HR supprimieren kann. Dazu sollten XopJ und AvrBs1 in AvrBs1-resistenten Pflanzen koexprimiert werden. Da das korrespondierende Resistenzgen *Bs1* von den in 3.2 getesteten

Pflanzen nur in ECW-10R vorhanden ist und nicht isoliert vorliegt, wurde die *Agrobacterium*-vermittelte Expression der Gene in Paprika ECW-10R durchgeführt. Die Entwicklung der AvrBs1-HR ist trotz der schlechteren Transformierbarkeit von Paprika (siehe 3.1.1) gut dokumentierbar und unabhängig von der später auftretenden *Agrobacterium*-induzierten Abwehr (Escolar et al, 2001). Als Positivkontrolle für die Suppression der AvrBs1-HR wurde AvrBsT benutzt, als Negativkontrolle AvrRxv. Das *avrRxv*-Gen wurde aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 amplifiziert, in den Binärvektor pGWB2 rekombiniert und in *Agrobacterium* transformiert. Der *Agrobacterium*-Stamm mit dem oben erwähnten pGWB2*avrBs1*-Konstrukt wurde mit den *xopJ*-, *avrBsT*- und *avrRxv*-tragenden *Agrobacterium*-Derivaten im Verhältnis 1:2 gemischt und in ECW-10R Paprikapflanzen koinokuliert.

In der Abbildung 15 sind die Phänotypen der resistenten Pflanzen gezeigt: Wie erwartet löste AvrBs1 die HR in ECW-10R aus. Wurden XopJ und AvrBs1 koexprimiert, war die HR vergleichbar zur AvrBs1-HR. Auch bei Koexpression von AvrRxv und AvrBs1 wurde keine verminderte AvrBs1-HR beobachtet. Nur die Koexpression von AvrBsT und AvrBs1 führte zu einer Suppression der AvrBs1-HR. Die Expression der Effektorgene konnte wegen des fehlenden Epitops in diesen Konstrukten nur indirekt über ihre HR-Induktion nachgewiesen werden. Dafür wurden *xopJ*, *avrRxv* und *avrBsT* ebenfalls über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert, wo alle drei die HR auslösten. Die Ergebnisse stehen mit der Tatsache im Einklang, dass sowohl AvrBs1, als auch XopJ vom *Xcv*-Stamm 85-10 transloziert werden und nach Infektion von ECW-10R-Pflanzen mit 85-10 keine Suppression der AvrBs1-HR beobachtet wird.

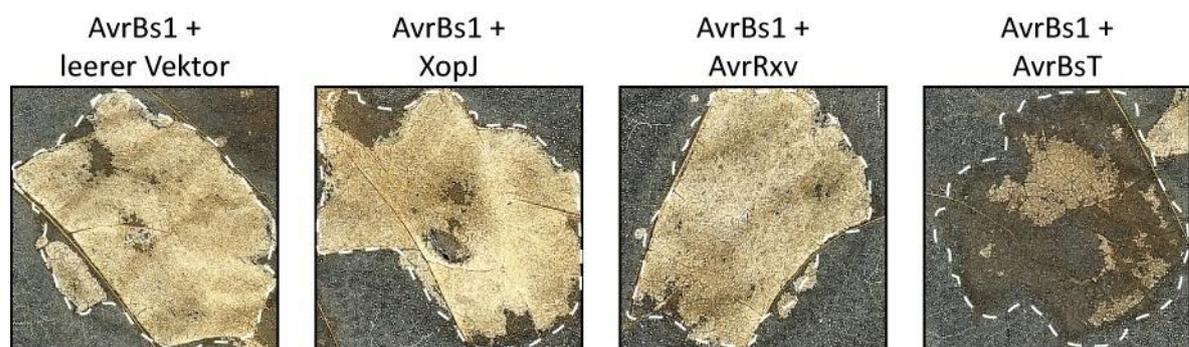


Abbildung 15: Test auf Suppression der AvrBs1-HR durch Mitglieder der AvrRxv-Familie.

Die *xopJ*-, *avrRxv*- oder *avrBsT*-enthaltenden *Agrobacterium*-Derivate (je 2×10^9 cfu/ml) wurden im Verhältnis 1:2 mit einem *avrBs1*-tragenden *Agrobacterium*-Derivat (2×10^9 cfu/ml) gemischt (Endkonzentration je 1×10^9 cfu/ml) und in *C. annuum* ECW-10R-Pflanzen inokuliert. 3 dpi wurden die Blätter in Ethanol gebleicht und fotografiert. Weiße Linien markieren die inokulierten Bereiche.

3.4 Die Lokalisierung der Effektorproteine AvrBsT und AvrBs1

Die Suppression der AvrBs1-HR durch *in planta* exprimiertes *avrBsT* legte die Vermutung nahe, dass die Ursache der Suppression innerhalb der Pflanzenzelle und nicht in *Xcv* zu finden ist. Im Folgenden sollte mit subzellulären Lokalisierungsstudien geklärt werden, ob AvrBsT-GFP und AvrBs1-GFP in denselben Zellkompartimenten vorkommen. Dazu wurden *avrBsT* und *avrBs1* im Binärvektor pGWB5 (mit C-terminalem GFP) mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert. In einem Zeitraum von 24 bis 48 hpi wurde Blattgewebe entnommen und am LSM untersucht. Die Abbildung 16 zeigt, dass das Fusionsprotein AvrBsT-GFP im Zytoplasma und im Zellkern akkumulierte. Die AvrBs1-GFP-Fusion akkumulierte im Zytoplasma und war im Zellkern nicht nachweisbar. Das Experiment wurde in Paprikapflanzen wiederholt. Es konnten keine Unterschiede in der Lokalisierung der beiden Effektor-Fusionsproteine im Vergleich zu *N. benthamiana* festgestellt werden.

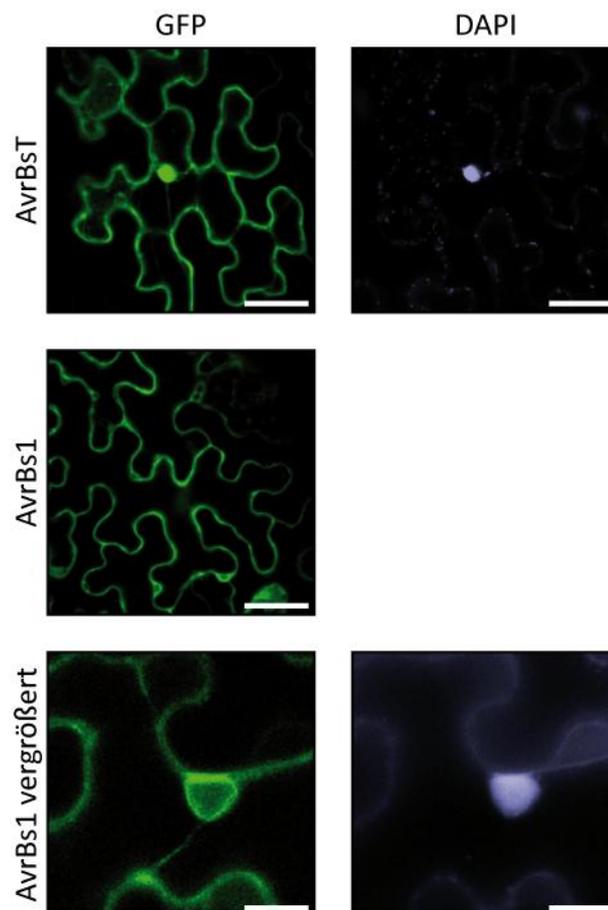


Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisierung von AvrBsT und AvrBs1 in *N. benthamiana*.

Agrobacterium-Stämme, die die Effektor-GFP-Fusionsgene translozieren wurden in *N. benthamiana*-Blätter inokuliert (1×10^9 cfu/ml). Die Aufnahmen zeigen Gewebe 24 hpi. DAPI-Fluoreszenz markiert die Zellkerne. Der Größenstandard für AvrBsT-GFP und AvrBs1-GFP entspricht 50 μm , für die AvrBs1-GFP-Vergrößerung 20 μm .

3.5 Die Isolierung pflanzlicher Interaktionspartnern von AvrBs1 und AvrBsT

Um die molekulare Basis der HR-Suppression näher zu charakterisieren, wurden pflanzliche Proteine gesucht, die mit AvrBs1 und / oder AvrBsT interagieren. Solche Proteine könnten potentiell an der Suppression beteiligt sein. AvrBs1 und AvrBsT wurden als Köder im Hefe-Di-Hybrid-System („yeast-2-hybrid“ (Y2H)) auf Basis des „Matchmaker™ Two-Hybrid System“ (Clontech) verwendet.

Auf Grund der hohen Homologie der Nachtschattengewächse untereinander wurde zunächst darauf verzichtet, eine cDNA-Bibliothek aus Paprika zu erstellen. Stattdessen wurde auf eine bereits erstellte, normalisierte Bibliothek von cDNA-Klonen aus *Solanum lycopersicum* (Tomate) im *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm AH109 zurückgegriffen (D. Gürlebeck, S. Masiero, H. Sommer und U. Bonas, siehe 2.5.1). Die Verwendung der Bibliothek aus Tomate bot weiterhin den Vorteil, dass zum Zeitpunkt der Y2H-Analysen eine wesentlich größere Zahl an annotierten EST aus Tomate als aus Paprika in der Datenbank des „The Institute of Genome Research“ (TIGR) vorhanden war. Dadurch konnten Kandidatengene schneller untersucht werden.

3.5.1 Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBs1-Interaktionspartnern

Für die Erstellung des AvrBs1-Köderplasmids wurde das *avrBs1*-Gen aus dem Plasmid pBS100 (Escolar et al, 2001) in den Ködervektor pGBKT7 kloniert. Das Köderkonstrukt pGBKT7_avrBs1 wurde in die *S. cerevisiae*-Stämme AH109 und Y187 transformiert. Der Test auf Transkriptionsautoaktivierung erfolgte mit dem Derivat des Reporterstammes *S. cerevisiae* AH109, der jeweils auf Minimalmedium ohne Adenin (SD-Ade) und auf Minimalmedium ohne Histidin (SD-His) ausgestrichen wurde. Wachstum auf einem dieser Medien würde die Autoaktivierung des jeweiligen Reportergens anzeigen. AH109 (pGBKT7_avrBs1) konnte auf keinem der beiden Medien wachsen. Der Stamm AH109 (pGBKT7_avrBs1) induzierte demnach nicht die Expression der Reportergene und wurde für die Y2H-Sichtung verwendet.

Der Köderstamm Y187 (pGBKT7_avrBs1) wurde mit dem Beutestamm AH109, der die cDNA-Bibliothek aus Tomate enthält, 24 h lang gepaart und die diploiden Zellen auf Minimalmedium ohne Ade, His, Trp und Leu („quadruple dropout“ (QDO)) selektiert. Da das Wachstum der eingesetzten Stämme und die Paarungseffizienz von Paarung zu Paarung variieren, wurden die Zahl der diploiden Zellen und das Verhältnis von Köder- zu Beutestamm nach der Paarung

bestimmt (siehe 2.5). Insgesamt wurden rund 2×10^7 diploide Hefekolonien gesichtet. In einer „ungerichteten“ Paarung sollte der Beutestamm der limitierende Partner sein, da so für jeden potentiellen Interaktionspartner mindestens ein Köder bereit steht. Der Köderstamm Y187 (pGBKT7_avrBs1) war in 40fachem Überschuss zum Beutestamm vorhanden, die Sichtung sollte also gesättigt gewesen sein. Sechs bis acht Tage nach Plattieren wurden insgesamt 20 Kolonien isoliert. Diese wurden auf QDO mit X- α -Gal (QDOX) transferiert, um die Aktivierung aller fünf Reporter gene des Systems zu testen. Alle 20 Kolonien wuchsen auf QDOX. Die Plasmide der 20 Kandidaten wurden isoliert und, nach einem Zwischenschritt in *E. coli*, jeweils in den Stamm AH109 (pGBKT7_avrBs1) transformiert, um sie im „gerichteten“ Ansatz auf Interaktion mit AvrBs1 zu testen. 14 Kandidaten interagierten in diesem Ansatz erneut mit AvrBs1. Die Spezifität der Interaktion wurde durch Transformation der 14 verbliebenen Kandidaten in den Stamm AH109 (pGBKT7_lamC) getestet. Dieser exprimiert das menschliche Lamin C-Protein, das nur mit sich selbst und anderen Lamin-Proteinen interagieren sollte (Goldman et al, 2002; Ye & Worman, 1995). Neun der 14 Kandidaten interagierten nicht mit Lamin C und wurden weiter bearbeitet.

Die Inserts der neun Kandidaten wurden sequenziert. Sequenzvergleiche mit verschiedenen EST-Datenbanken von *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *S. tuberosum* und *N. tabacum* ergaben jeweils Homologien zu bekannten Proteinen. Darunter befanden sich z. B. ein Tonoplast-intrinsisches Protein, eine Tyrosinkinase, ein möglicher Transkriptionsfaktor mit „basic helix-loop-helix (bHLH)“-Domäne, ein Protein mit Pentatricopeptid-Wiederholungen, ein prä-RNA prozessierendes Protein, ein Abscisinsäure-responsives Protein (HV22A) und ein ribosomales Protein (siehe Tabelle 5).

3.5.2 Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBsT-Interaktionspartnern

Zur Erstellung des AvrBsT-Köderkonstrukts wurde das *avrBsT*-Gen aus dem Plasmid pADGAL4_avrBsT (L. Escolar, unpubliziert) in pGBKT7 kloniert. Die Stämme AH109 und Y187 wurden mit pGBKT7_avrBsT transformiert. Der Reporterstamm AH109 (pGBKT7_avrBsT) zeigte keine Autoaktivierung der Reporter gene. Der Köderstamm Y187 (pGBKT7_avrBsT) wurde 24 h mit dem Beutestamm AH109 gepaart, der die cDNA-Bibliothek aus Tomate enthält. Aus der Paarung resultierten ca. $1,5 \times 10^7$ diploide Zellen, der Köderstamm war im 45fachen Überschuss zum Beutestamm vorhanden. Sechs bis acht Tage nach Plattieren wurden insgesamt 17 Kolonien isoliert, die auf QDOX wuchsen. Die Plasmide der Kandidaten wurden isoliert und in gerichteten Ansätzen auf Interaktion mit AvrBsT und auf Spezifität der Interaktion hin untersucht. Alle 17 Kandidaten interagierten im gerichteten Ansatz erneut mit AvrBsT, fünf der 17 Kandidaten

interagierten nicht mit Lamin C. Die Inserts der fünf Kandidaten wurden sequenziert und mit verschiedenen EST-Datenbanken verglichen. Vier der fünf Kandidaten sind homolog zum Elongationsfaktor 1α (eEF1A) und für einen Kandidaten wurde keine Homologie zu bekannten Genen gefunden.

3.5.3 Y2H-Analysen zur Identifizierung von AvrBsT_{C222A}-Interaktionspartnern

Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, wurde mit AvrBsT nur zwei verschiedene Kandidaten isoliert. Um auszuschließen, dass dies auf einer enzymatischen Funktion (z. B. Protease) von AvrBsT beruht, wurde eine Y2H-Sichtung mit der katalytischen Mutante AvrBsT_{C222A} durchgeführt. Das Gen *avrBsT_{C222A}* wurde in den GATEWAY-fähigen Ködervektor pGBKT7attR (A. Strauß und T. Lahaye, unveröffentlicht) rekombiniert und in die Stämme AH109 und Y187 transformiert. Der Stamm AH109 (pGBKT7attR_avrBsT_{C222A}) zeigte keine Autoaktivierung. Der Stamm Y187 (pGBKT7attR_avrBsT_{C222A}) wurde 24 h mit dem Bibliotheks-Beutestamm gepaart, es wurden ca. 1×10^8 diploide Hefezellen gesichtet. Von insgesamt 77 isolierten Klonen wuchsen 42 auf QDOX. Die Plasmide dieser 42 Kandidaten wurden isoliert und in „gerichteten“ Interaktionsstudien mit AvrBsT_{C222A} und Lamin C überprüft. Die Inserts von 25 spezifisch mit AvrBsT_{C222A} interagierenden Kandidaten wurden sequenziert. Sequenzanalysen ergaben Homologien zu der Untereinheit S8 des 26S Proteasom-Deckelkomplexes, zum eEF1A, zu einem ABC-Transporter, einem Protein mit GYF-Domäne, zu DnaJ und SNF1 (siehe Tabelle 5).

Um herauszufinden, ob sich unter den gefundenen Interaktoren ein gemeinsames pflanzliches Zielprotein befindet, wurden alle mit AvrBs1 interagierenden Kandidaten in den Stamm AH109 (pGBKT7attR_AvrBsT_{C222A}) transformiert und auf Interaktionen getestet. Es waren keine Interaktionen mit AvrBsT_{C222A} nachweisbar. Umgekehrt wurden die mit AvrBsT_{C222A} gefundenen Kandidaten in den Stamm AH109 (pGBKT7AvrBs1) transformiert und auf Interaktion getestet. Es ließen sich ebenfalls keine Interaktionen nachweisen. Keiner der isolierten Kandidaten interagiert demnach mit beiden Effektorproteinen.

Tabelle 5: Mit AvrBs1 und AvrBsT interagierende Proteinfragmente aus Tomate

Name	Homologie	Größe der cDNA in Bp	DNA-Homologie ¹ in %
iA1-T #10	Tonoplast-intrinsisches Protein (Typ δ)	500	100%
iA1-T #11	Tyrosinkinase	1000	97%
iA1-T #13	DNA-bindendes Protein (bHLH)	450	90%
iA1-T #16	Protein mit Pentatricopeptid-Wiederholungen	500	96%
iA1-T #18	ATP-/GTP-bindendes, prä-mRNA schneidendes Protein	600	99%
iA1-T #19	Auf Abscisinsäure reagierendes Protein (HV22A)	550	79%
iA1-T #20	Ribosomales Protein S17	450	98%
iAT-T #08	Unbekannt	650	62%
iAT-T #09	Translations-Elongationsfaktor 1A (eEF1A)	950	92%
iAC-T #01	Protein mit GYF-Domäne	1250	93%
iAC-T #04	Untereinheit S8 des 26S Proteasom-Deckelkomplexes	1200	91%
iAC-T #13	eEF1A	250	92%
iAC-T #33	DnaJ	700	92%
iAC-T #34	ABC-Transporter	1450	70%
iAC-T #53	SNF1-Homologes	600	92%

iA1-T = Interaktor von AvrBs1 aus Tomate, iAT-T = Interaktor von AvrBsT aus Tomate, iAC-T = Interaktor von AvrBsT_{C222A} aus Tomate, ¹ Homologie zu EST aus der Tomate-EST-Datenbank

3.6 Die Analyse der Interaktoren von AvrBs1 und AvrBsT

Alle spezifisch mit AvrBs1 oder AvrBsT interagierenden sequenzierten Kandidaten wurden anhand ihrer Homologie, der Stärke der Interaktion mit dem jeweiligen Köder und der Häufigkeit ihres Auftretens in anderen Interaktionsstudien bewertet. Nach diesen Kriterien wurde eine Auswahl für weitere Analysen getroffen. Ausgewählt wurden die zwei AvrBs1-Interaktoren δ -Tonoplast-intrinsisches Protein (*1-Tip*) und Tyrosin-Kinase (*1-Tyr*), sowie vier AvrBsT-Interaktoren und zwar der ABC-Transporter (*T-Abc*), der Elongationsfaktor 1α (*T-Ef1*), das Protein mit der GYF-Domäne (*T-Gyf*) und das SNF1-ähnliches Protein (*T-Snf*).

3.6.1 Die biologische Relevanz der Interaktoren

Nachdem Fragmente einzelner Pflanzenproteine in Hefe spezifisch mit AvrBs1 oder AvrBsT interagierten, sollte nun der Einfluss dieser Proteine auf die AvrBs1-HR und deren Suppression durch AvrBsT untersucht werden. Dazu sollten die Transkripte der korrespondierenden Interaktorgene mittels Virus-induzierten Gen-„Silencing“ (VIGS) in Paprika ECW-10R reduziert werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde Tabakrattle-Virus (TRV)-basiertes „Silencing“ in Paprika etabliert und optimiert (R. Szczesny, Diplomarbeit).

Das Genom des TRV ist auf zwei Binärvektoren verteilt: Der Binärvektor pTRV1 trägt auf der T-DNA den größten Teil der TRV-Gene und auf der T-DNA des zweiten Binärvektors pTRV2a befindet sich neben den übrigen Virusgenen eine GATEWAY-Klonierungsstelle für die „Silencing“-Fragmente. Der Transfer der Virusgene und des „Silencing“-Fragments erfolgt über zwei entsprechende *Agrobacterium*-Stämme. Als „Silencing“-Kontrolle dient ein Fragment des Phytoendesaturasegens (*Pds*). Wenn die Blätter der Kontrollpflanzen in Folge des *Pds*-„Silencing“ weiß werden, ist der optimale Zeitpunkt für phänotypische Tests gegeben.

Für VIGS der Interaktoren *1-Tip*, *1-Tyr*, *T-Abc*, *T-Ef1*, *T-Gyf* und *T-Snf* wurden jeweils ca. 300 Bp lange genspezifische Bereiche des korrespondierenden Gens amplifiziert, kloniert und in den Binärvektor pTRV2a rekombiniert. Pro Konstrukt wurden jeweils fünf Paprika ECW-10R-Pflanzen mit den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen inokuliert, je zwei Pflanzen wurden für *Pds*-„Silencing“ verwendet. Ca. 14 Tage nach Inokulation begannen die ersten *Pds*-„Silencing“-Pflanzen weiß zu werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die *Xanthomonas*-Stämme 85-10 (transloziert u. a. AvrBs1) und 85-10 (pDSM400) (exprimiert zusätzlich ektopisch *avrBsT*) in die „Silencing“-Pflanzen inokuliert. Das „Silencing“ der Interaktorgene wurde in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt.

Die Abbildung 17 zeigt exemplarisch die pflanzlichen Phänotypen nach Inokulation mit *Xcv* 85-10. In *1-Tip*-, *1-Tyr*-, *T-Ef1*- und *T-Gyf*-„Silencing“-Pflanzen wurde die AvrBs1-HR, vergleichbar zur *Pds*-Kontrolle, ausgelöst. In zwei *T-Abc*-„Silencing“-Experimenten wurde eine leicht reduzierte AvrBs1-HR beobachtet. In vier der fünf *T-Snf*-„Silencing“-Experimente war die Induktion der AvrBs1-HR jedoch stark reduziert. Der Stamm *Xcv* 85-10 (pDSM400) induzierte in allen Pflanzen eine stark reduzierte AvrBs1-HR. Demnach reduziert das „Silencing“ des *Snf1*-homologen Gens die AvrBs1-HR.

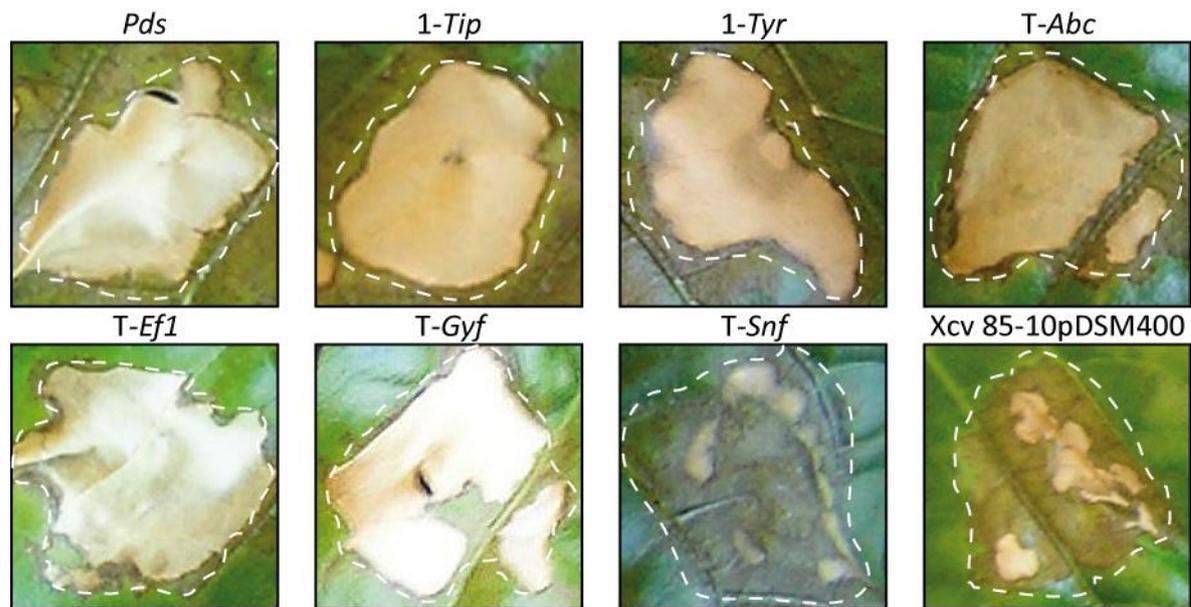


Abbildung 17: Test der AvrBs1-spezifischen HR nach Interaktor-„Silencing“.

Agrobacterium-Stämme mit den „Silencing“-Konstrukten und dem TRV1 wurden gemischt und in ECW-10R-Pflanzen inokuliert (Endkonzentration je 1×10^8 cfu/ml). 14 dpi wurden die oberen Blätter der Pflanzen mit dem *Xcv*-Stämmen 85-10 bzw. 85-10 (pDSM400) inokuliert (1×10^9 cfu/ml). *Xcv* 85-10 (pDSM400) ist unten rechts als Vergleich abgebildet. Die weiße Linie markiert den inokulierten Bereich.

3.6.2 Die Beeinflussung anderer HR durch das *SnRK1*-„Silencing“

Der Interaktor *T-Snf* zeigt Homologie zu „sucrose non-fermenting 1“ (*SNF1*) aus *S. cerevisiae*. Aus Tomate wurde ein *SNF1*-Homologes bereits kloniert (Bradford et al, 2003). Da der Interaktor offenbar eine Rolle in der AvrBs1-vermittelten HR spielt, wurde er weiter analysiert. Die *SNF1*-homologen Gene aus Tomate und Paprika werden im Folgenden nach der üblichen Nomenklatur für die homologen Gene aus Pflanzen als „SNF1-related kinase 1“ (*SnRK1*) bezeichnet (Hardie, 1999).

Da sich *SnRK1*-„Silencing“ offenbar auf die AvrBs1-HR auswirkt und nach *T-Abc*-„Silencing“ sporadisch eine leichte Reduktion der AvrBs1-HR zu beobachten war, wurde untersucht, ob auch andere spezifische HR vom „Silencing“ dieser Gene betroffen sind.

Die Auswahl an möglichen HR-Elicitoren war in diesem Fall begrenzt, da die Kontrolle des „Silencing“ nur in *Bs1*-tragenden Paprikapflanzen über die AvrBs1-vermittelte HR möglich war. Das „Silencing“ von *SnRK1* und dem ABC-Transporter-Gen wurde deshalb wie in 3.6.1 beschrieben in jeweils fünf Pflanzen *C. annuum* ECW-123 durchgeführt. Diese Linie enthält die Resistenzgene *Bs1*, *Bs2*, *Bs3* und *BsT* und ist im übrigen Genom isogen zur Linie ECW. Als Negativkontrolle diente eine Kombination aus pTRV1 und pTRV2a ohne „Silencing“-Fragment,

d. h. nur systemische Virus-Infektion. 14 Tage nach Inokulation der *Agrobacterium*-„Silencing“-Stämme wurden verschiedene *Xcv*-Stämme in die „Silencing“- und Kontrollpflanzen inokuliert:

- 1: *Xcv* 85-10 (exprimiert u. a. *avrBs1* und *avrBs2*)
- 2: *Xcv* 85-10 (pDSM400) (wie 1, exprimiert zusätzlich *avrBsT*)
- 3: *Xcv* 85-10 (pD400_{C222A}) (wie 1, exprimiert zusätzlich *avrBsT*_{C222A})
- 4: *Xcv* 85-10 (pDS300) (wie 1, exprimiert zusätzlich *avrBs3*)

Die Abbildung 18 zeigt das Ergebnis sechs Tage nach *Xanthomonas*-Inokulation. Die T-*Abc*-„Silencing“-Pflanzen reagierten auf alle *Xcv*-Stämme mit der AvrBs1-HR. Diese HR wird erwartungsgemäß in Anwesenheit von AvrBsT (*Xcv*-Stamm 2) supprimiert. Das von allen Stämmen translozierte AvrBs2 löst eine schwache HR aus, die in jedem Fall von der AvrBs1-HR (Stämme 1,3 und 4), der AvrBsT-HR (Stamm 2) und von der AvrBs3-HR (Stamm 4) überdeckt wird. Es ist eine leichte Bräunung am Rand des Gewebes im Fall der Stämme 1 und 3 zu sehen. In den *SnRK1*-„Silencing“-Pflanzen wurde keine AvrBs1-HR mehr ausgelöst, dafür ist die AvrBs2-HR (Stämme 1 und 3) deutlicher zu sehen. Die AvrBsT-HR (Stamm 2) und auch die AvrBs3-HR (Stamm 4) sind ebenfalls deutlich sichtbar. Das „Silencing“-Experiment in ECW-123 wurde einmal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Der Einfluss des *SnRK1*-„Silencing“ scheint demnach spezifisch für die AvrBs1-vermittelte HR zu sein. Das T-*Abc*-„Silencing“ scheint ebenso keinen Einfluss auf die durch AvrBs2, AvrBs3 und AvrBsT vermittelten HR zu haben. Ob die AvrBs1-HR durch „Silencing“ des T-*Abc*-Gens reduziert wird, ist jedoch nicht sicher zu belegen.

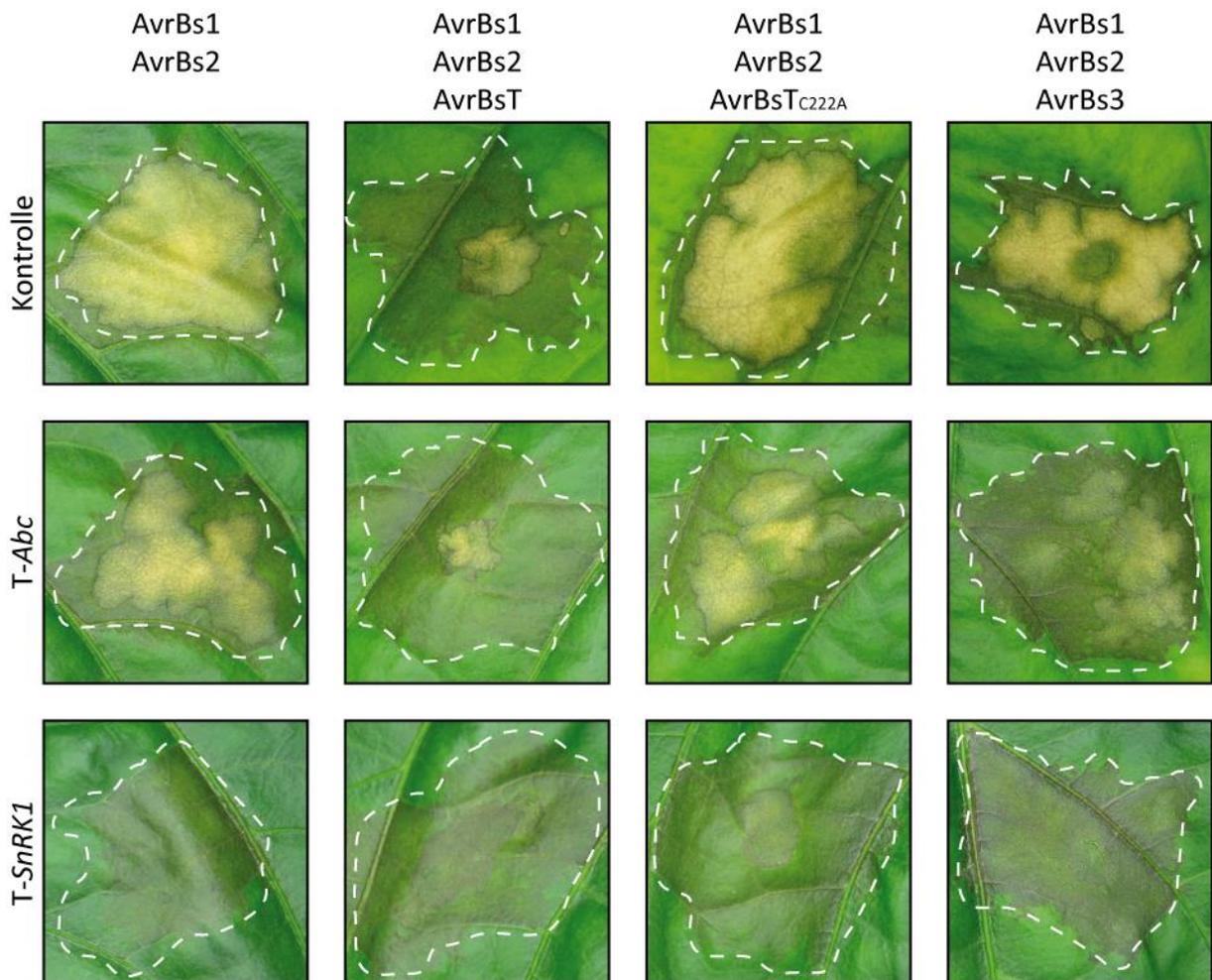


Abbildung 18: VIGS der Gene *SnRK1* und *T-Abc* in *C. annuum* ECW-123-Pflanzen.

Agrobacterium-Stämme mit den „Silencing“-Konstrukten (1×10^8 cfu/ml) wurden in *C. annuum* ECW-123 inokuliert. 14 Tage nach Inokulation wurden die oberen Blätter der Pflanzen mit den *Xcv*-Stämmen 85-10, 85-10 (pDSM400), 85-10 (pD400_{C222A}) und 85-10 (pDS300) (5×10^8 cfu/ml) inokuliert. Die pflanzlichen Phänotypen wurden 4 dpi dokumentiert. Die weiße Linie markiert den inokulierten Bereich.

3.6.3 Die Quantifizierung des *SnRK1*-„Silencing“

VIGS basiert auf posttranskriptionellem Gen-„Silencing“, sodass es nicht möglich ist, mit dieser Methode ein Gen zu 100 % stillzulegen. Daher sollte mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bestimmt werden, wie hoch die Reduktion des Transkriptes in *SnRK1*-„Silencing“-Pflanzen war. Zunächst mussten Primer auf Basis der bekannten *SnRK1*-Sequenz aus Tomate abgeleitet werden, die ein Stück des korrespondierenden *SnRK1*-Gens in Paprika amplifizieren. Um nicht das „Silencing“-Konstrukt selbst zu amplifizieren, musste dieses Fragment außerhalb des „Silencing“-Fragmentes liegen (Abbildung 19). Das Fragment wurde aus Paprika amplifiziert und sequenziert, um sicherzustellen, dass es sich um *SnRK1* aus Paprika handelt.

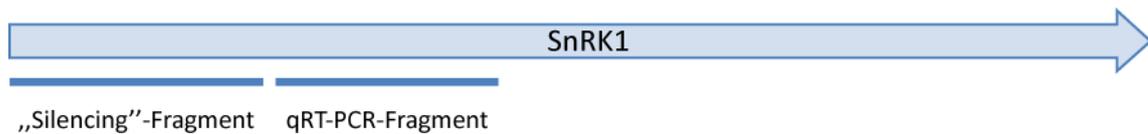


Abbildung 19: Schema des *SnRK1*-homologen Gens aus Paprika.

Basierend auf der Sequenz des *SnRK1*-homologen Gens aus Tomate sind hier die relevanten Bereiche angegeben, die für das „Silencing“ bzw. die qRT-PCR verwendet wurden.

In zwei unabhängigen *SnRK1*-„Silencing“-Experimenten wurde zum Zeitpunkt der *Xcv*-Inokulation RNA aus Blattgewebe von fünf Pflanzen isoliert. Die RNA-Mengen der fünf Proben wurden angeglichen und jeweils in Triplikaten als Matrize für qRT-PCR eingesetzt. Als Referenzwert diente RNA aus Pflanzen der Virus-Negativkontrolle. Schwankungen der generellen Genexpression wurden zusätzlich über das konstitutiv exprimierte *eEF1A*-Gen angeglichen (siehe 2.7.2.4). Wie die Abbildung 20 zeigt war das *SnRK1*-Transkript im Durchschnitt um mindestens 70 %, d. h. auf ca. 30 % reduziert.

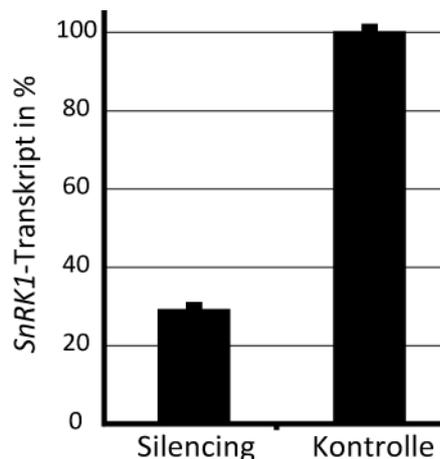


Abbildung 20: Quantifizierung des *SnRK1*-„Silencing“ mittels qRT-PCR.

Dargestellt ist die per qRT-PCR ermittelte *SnRK1*-Transkriptmenge in *SnRK1*-„Silencing“-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Die RNA wurde zum Zeitpunkt der *Xcv*-Inokulation isoliert und je Pflanze als Triplikat in die PCR eingesetzt. Der Mittelwert der *SnRK1*-Transkriptmengen von drei Kontrollpflanzen wurde als 100 %-Wert gesetzt. Von den *SnRK1*-Transkriptmengen aus fünf *SnRK1*-„Silencing“-Pflanzen wurde das Mittel bestimmt und ins Verhältnis zu den 100 % der Kontrollpflanzen gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von je drei Replikaten pro Pflanze.

3.7 Die Analyse der SnRK1 aus Tomate

Die SnRK1 scheint eine Rolle in der Initiation der AvrBs1-vermittelten HR zu spielen (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Für weitere Analysen sollte das *SnRK1*-Gen in voller Länge amplifiziert werden. Von der publizierten *SnRK1*-Sequenz aus Tomate (AF143743) wurden Oligonukleotide abgeleitet, mit denen zunächst versucht wurde, das bis dahin unbekannte Gen aus *C. annuum* zu amplifizieren. Da dies zunächst nicht gelang, wurde das gesamte *SnRK1*-Gen (1545 Bp) aus *S. lycopersicum* cv. Moneymaker-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert (Sequenz siehe Anhang).

3.7.1 Die Interaktionen von SnRK1 in Hefe

Nachdem sich SnRK1 durch VIGS als wichtige Komponente der AvrBs1-induzierten HR herausgestellt hatte, sollte nun die Interaktion des vollständigen SnRK1-Proteins mit AvrBsT und AvrBs1 getestet werden. Das *SnRK1*-Gen wurde in den GATEWAY-kompatiblen Beutevektor pGADT7attR rekombiniert. Die Hefestämme AH109 (pGADT7_avrBs1) und AH109 (pGADT7attR_avrBsT_{C222A}) wurden jeweils mit dem Plasmid pGADT7attR_SnRK1 transformiert und wie in 3.5 beschrieben auf Interaktion getestet. Das vollständige Protein SnRK1 interagiert mit AvrBsT_{C222A}, jedoch nicht mit AvrBs1 (Daten nicht gezeigt). Die Hefedaten lassen also vermuten, dass SnRK1 und AvrBs1 nicht direkt miteinander interagieren. Dennoch ist es möglich, dass ein, in Hefezellen nicht vorhandener, Kofaktor in der Pflanze eine Komplexbildung beider Proteine ermöglicht.

3.7.2 Die Interaktionen von SnRK1 *in planta* mittels KoIP

Um festzustellen, ob SnRK1 und AvrBs1 in der Pflanze in einem Komplex vorliegen, wurden *in planta*-Interaktionsstudien durchgeführt. Außerdem sollte die Interaktion von SnRK1 und AvrBsT *in planta* bestätigt werden.

Zunächst wurden Koimmunpräzipitationsexperimente (KoIP) durchgeführt. Dazu wurden die Effektorfusionsproteine AvrBs1-GFP und AvrBsT_{C222A}-GFP jeweils mit SnRK1-c-Myc und Kontrollproteinen transient in *N. benthamiana* koexprimiert. 48 hpi wurden Proteinextrakte hergestellt und SnRK1-c-Myc an einer IgG-Matrix mittels c-Myc-Antikörpers immunpräzipitiert.

Dabei stellte sich heraus, dass die Effektorproteine trotz Variation der Bedingungen ebenfalls an die Matrix binden. Ein umgekehrter Versuchsansatz zeigte, dass auch SnRK1-c-Myc unter verschiedenen Bedingungen mehr oder weniger stark an die Matrix bindet (Daten nicht gezeigt). Eine qualitative Aussage über Proteininteraktionen ließ sich mit diesem Ansatz demnach nicht treffen.

3.7.3 Die Interaktionen von SnRK1 *in planta* mittels BiFC

Eine andere Methode, Protein-Protein-Interaktion in Pflanzen zu untersuchen, ist das „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC). Dabei wird einer der zwei Interaktionspartner mit den ersten 155 As des gelb fluoreszierenden Proteins („yellow fluorescent protein“ (YFP)) (YFP_N) fusioniert und der andere Interaktionspartner mit den C-terminalen 84 As des YFP (YFP_C). Kommen beide Fusionsproteine durch direkte oder indirekte Interaktion in räumliche Nähe zueinander, bilden die beiden YFP-Teile einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 500 nm angeregt werden kann. Zur Überprüfung der Proteinstabilität enthält das YFP_N-Fusionskonstrukt eine c-Myc-Epitop-Markierung zwischen dem Protein und YFP_N.

Für die BiFC-Analysen wurde das *SnRK1*-Gen in den GATEWAY-kompatiblen Binärvektor pGWB735 (*YFP_C-Gen*) und die Effektorgene *avrBs1* und *avrBsT_{C222A}* in den Binärvektor pSPYNE (*Gen-YFP_N*) rekombiniert. Nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation und Expression der Fusionskonstrukte in *N. benthamiana* wurden Gewebeproben am LSM analysiert. Wie die Abbildung 21 zeigt, gibt es nach Expression von AvrBsT_{C222A}-YFP_N und YFP_C-SnRK1 Fluoreszenz im Zytoplasma, wodurch die Interaktion in Hefe bestätigt zu sein scheint. Im Gegensatz dazu gibt es in Gewebe, in dem AvrBs1-YFP_N und YFP_C-SNF1 exprimiert werden, keine Fluoreszenz. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen in den Hefe-Interaktionsstudien überein. Die Experimente wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Um zum einen die Funktionalität des AvrBs1-YFP_N-Konstrukts und zum anderen die Spezifität des AvrBsT_{C222A}-YFP_N-Konstrukts im BiFC zu untersuchen, wurden die Interaktoren *1-Tip*, *1-Tyr* und *T-Ef1* (vgl. Tabelle 5) ebenfalls auf Interaktion mit beiden Effektoren getestet. Dazu wurden die ORF der Kandidaten, basierend auf den Tomate-EST-Datenbankeinträgen mit der höchsten Homologie (*1-Tip* = TC192986, *1-Tyr* = TC203725, *T-Ef1* = TC205961) amplifiziert, kloniert und als YFP_C-Fusion in *N. benthamiana* exprimiert (Sequenzen siehe Anhang). Die Abbildung 21 zeigt am Beispiel von YFP_C-1-TYR, dass Fluoreszenz in allen Kombinationen, in denen AvrBsT_{C222A}-YFP_N kosynthetisiert wurde, messbar war. AvrBs1-YFP_N interagiert hingegen nur mit YFP_C-1-

TIP und YFP_C-1-TYR, nicht aber mit YFP_C-T-EF1. In Western-Blot-Analysen (siehe Abbildung 21 B) wurde die Stabilität des AvrBsT-YFP_N-Fusionsproteins bestätigt.

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass YFP_C-SnRK1 *in planta* nicht mit AvrBs1-YFP_N interagiert. Für die Interaktion zwischen AvrBsT_{C222A}-YFP_N und YFP_C-SnRK1 kann an dieser Stelle jedoch keine klare Schlussfolgerung gezogen werden, da AvrBsT_{C222A}-YFP_N auch mit anderen getesteten Proteinen interagiert.

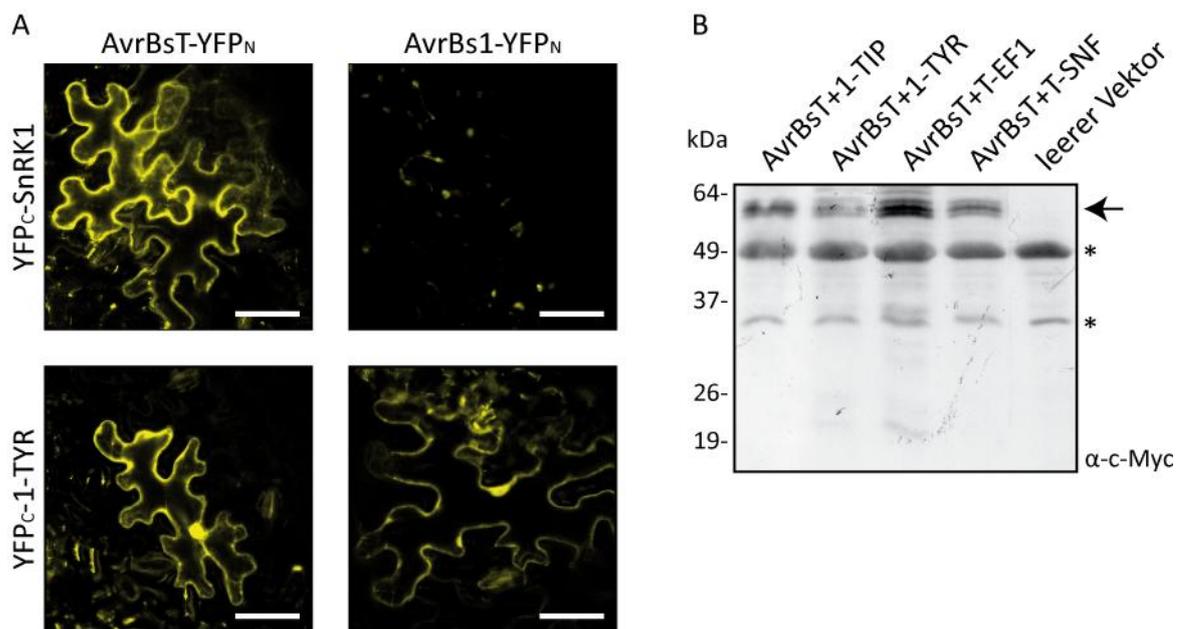


Abbildung 21: *In planta*-Interaktion von AvrBs1 und AvrBsT mit SnRK1 und 1-TYR.

(A) BiFC-Test: *Agrobacterium*-Stämme (2×10^9 cfu/ml) mit YFP_C-SnRK1 oder YFP_C-1-Tyr auf ihrer T-DNA wurden mit *Agrobacterium*-Stämmen (2×10^9 cfu/ml) mit *avrBs1*-YFP_N und *avrBsT*_{C222A}-YFP_N im Verhältnis 1:2 gemischt und in *N. benthamiana* inokuliert. 2 dpi wurde die YFP-Fluoreszenz in inokuliertem Blattgewebe am LSM analysiert. Der Größenstandard entspricht 50 µm.

(B) Immunologischer Nachweis von AvrBsT-YFP_N mit c-Myc-Antikörper. Die Proben wurden zum selben Zeitpunkt der LSM-Analyse genommen. Jeweils 20 µl Proteinextrakt wurden auf ein 10%iges SDS-Gel geladen, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem α-c-Myc-Antikörper inkubiert. Pfeil = AvrBsT-YFP_N, * = unspezifisches Signal

3.8 Die Klonierung des *SnRK1*-Gens aus Paprika

Im Laufe dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Firma Invitrogen eine normalisierte Paprika-cDNA-Bibliothek erstellt, in der große cDNA-Fragmente angereichert vorliegen (R. Szczesny, P. Römer, T. Lahaye und U. Bonas, unveröffentlicht). Diese Bibliothek wurde u. a. für Y2H-Sichtungen benutzt und im Rahmen der Diplomarbeit von Anja Seiferth erfolgreich mit AvrBsT_{C222A} als Köder gesichtet. Dabei wurden u. a. zwei Klone eines *Snf1*-Homologen aus

C. annuum isoliert. Die Inserts beider Kandidaten zeigen mehr als 97%ige DNA-Homologie zu *SnRK1* aus Tomate und lieferten gleichzeitig mehr Sequenzinformation im 5'-Bereich des Gens aus Paprika. Mittels dieser Information konnte eine DNA-Sequenz in der Datenbank des koreanischen „Plant Diversity Research Center“ (2.5.2) gefunden werden, die einer fast vollständigen *SnRK1*-Gensequenz entspricht (Abbildung 22). Zusätzliche Sequenzinformationen des vollständigen Gens wurden aus „5'-Rapid Amplification of cDNA ends“ (RACE)-Produkten (2.6.3) erhalten. Das bis dato unbeschriebene *Snf1*-homologe Gen aus *C. annuum* wurde der gängigen Nomenklatur nach als *SnRK1* bezeichnet. Das *SnRK1*-Gen aus Paprika ist 1545 Bp lang und 95 % homolog zu dem Gen aus Tomate. Die Identität der SnRK1-Proteine aus beiden Pflanzen beträgt 98 %.



Abbildung 22: Übersicht der *SnRK1*-Sequenz aus Paprika und homologen Fragmenten.

3.8.1 Die Struktur und Eigenschaften der SnRK1

SNF1-Homologe zeichnen sich durch drei typische Domänen aus: eine Serin/Threonin-Kinasedomäne, eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) und eine Kinase-assoziierte Domäne (KA1). Die Suche nach konservierten Domänen in der *SnRK1*-Sequenz mit dem Programm ScanProsite (Sigrist et al, 2002) zeigte, dass das Protein aus Paprika die drei Domänen SNF1-homologer Proteine enthält (siehe Abbildung 23). Die Proteinkinasedomäne befindet sich zwischen den As 19 – 271, beinhaltet eine ATP-Binderegion zwischen den As 25 und 33, ein ATP-bindendes Lys an Position 48 und eine Protonen-akzeptierende Asp an Position 142. Die UBA-Domäne befindet sich zwischen den As 292 und 332 und die Kinase-assoziierte Domäne liegt zwischen den As 465 und 513.

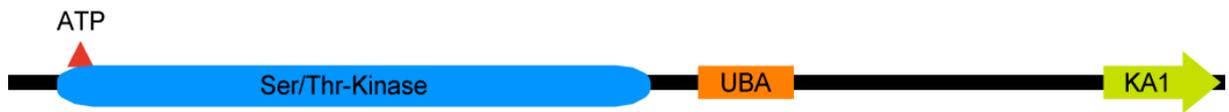


Abbildung 23: Annotation konservierter Motive der SnRK1 aus Paprika.

ScanProsite-Annotation der SnRK1-Sequenz aus *C. annuum*. Die charakteristischen Domänen der SNF1-Homologen sind wie folgt gekennzeichnet: ATP-Bindestelle (rotes Dreieck), Kinasedomäne (Ser/Thr-Kinase), die Ubiquitin assoziierte Domäne (UBA) und die Kinase-assoziierte Domäne (KA1).

3.8.2 Die SnRK1 akkumuliert im Zytoplasma und im Zellkern

Um Hinweise auf die Lokalisierung des SnRK1-Proteins zu bekommen, wurde ein GFP-Fusionskonstrukt im Vektor pGWB5 erstellt, nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer transient in *N. benthamiana* exprimiert und am LSM analysiert. Die Abbildung 24 A zeigt GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma und in Nuklei. Die Stabilität des SnRK1-GFP-Fusionsproteins wurde mittels Immunoblots überprüft (Abbildung 24 B). Es wurde kein Abbau des Proteins beobachtet. SnRK1 lokalisiert offenbar in denselben Kompartimenten wie AvrBsT und AvrBs1.

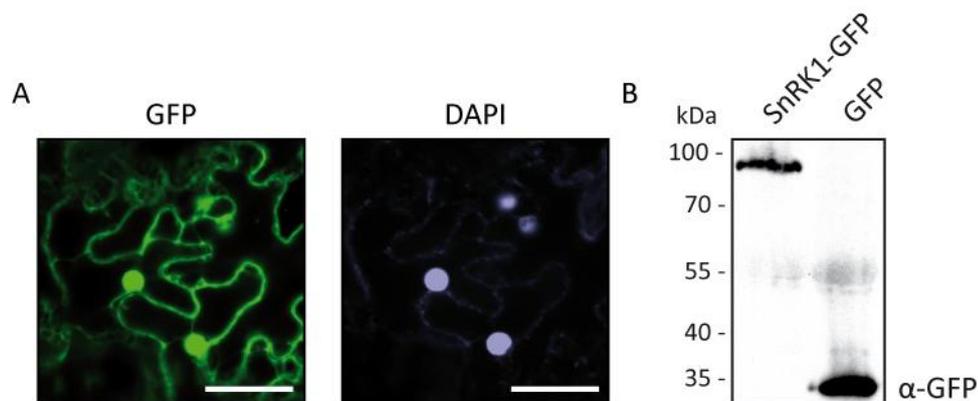


Abbildung 24: SnRK1 akkumuliert im Zytoplasma und im Zellkern.

SnRK1-GFP wurde transient in *N. benthamiana* exprimiert. 48 h nach Inokulation wurde DAPI zur Visualisierung von Zellkernen inokuliert. (A) GFP-Fluoreszenz des SnRK1-GFP-Fusionsproteins und DAPI-Färbung. Der Größenstandard entspricht 50 μm . (B) Western-Blot des SnRK1-GFP-Fusionsproteins und GFP. Proteinextrakte wurden zum Zeitpunkt der LSM-Analysen erstellt, 30 μl Extrakt wurden im Immunblot mit einem α -GFP-Antikörper analysiert.

3.9 Der Einfluss von AvrBsT auf die SnRK1

In planta lokalisieren SnRK1 und AvrBsT subzellulär in den gleichen Kompartimenten und interagieren wahrscheinlich miteinander (siehe Abbildung 16, Abbildung 21 und Abbildung 24). Daher ist es möglich, dass AvrBsT das SnRK1-Protein modifiziert. Wie, sollte im Folgenden untersucht werden.

3.9.1 AvrBsT besitzt Proteaseaktivität

Wie bereits erwähnt besitzt die YopJ-Familie Ähnlichkeit zur Adenovirusprotease und für die Effektoren AvrXv4, HopZ1, HopZ2 und HopZ3 wurde Proteaseaktivität gezeigt (Ding et al, 1996; Lewis et al, 2008; Roden et al, 2004a). Da für AvrBsT eine enzymatische Aktivität vermutet wurde, sollte untersucht werden, ob AvrBsT ebenfalls eine Proteaseaktivität besitzt. Das Wildtyp-Gen *avrBsT* und die Mutante *avrBsT_{C222A}* wurden mit N-terminaler His-Fusion (6 x Histidin) in *E. coli* BL21-Zellen exprimiert. Da das His-AvrBsT_{WT}-Protein trotz Optimierung der Expressionsbedingungen fast ausschließlich in Einschlusskörpern zu finden war, wurden die Zellen in denaturierendem Puffer aufgeschlossen und die His-Fusionsproteine mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen) angereichert und gereinigt. Die anschließenden Waschschrte wurden mit Waschpuffer für native Proteinreinigung durchgeführt, um eine Rückfaltung der Proteine zu ermöglichen. Die Reinheit der eluierten Proteine wurde im Coomassie-gefärbten SDS-Gel untersucht, wobei keine prominenten Hintergrundproteine beobachtet wurden. Die Proteinmengen wurden photometrisch bestimmt und angeglichen (siehe 2.14.2).

Der Proteaseaktivitätstest erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Casein als Substrat (Abbildung 25). In Wildtyp-AvrBsT-Proben war die Fluoreszenz zwar ca. 300x schwächer als in Proteinase K-Vergleichsproben, jedoch signifikant erhöht gegenüber den Proben mit AvrBsT_{C222A}. Demnach besitzt AvrBsT eine, wenngleich geringe, Proteaseaktivität.

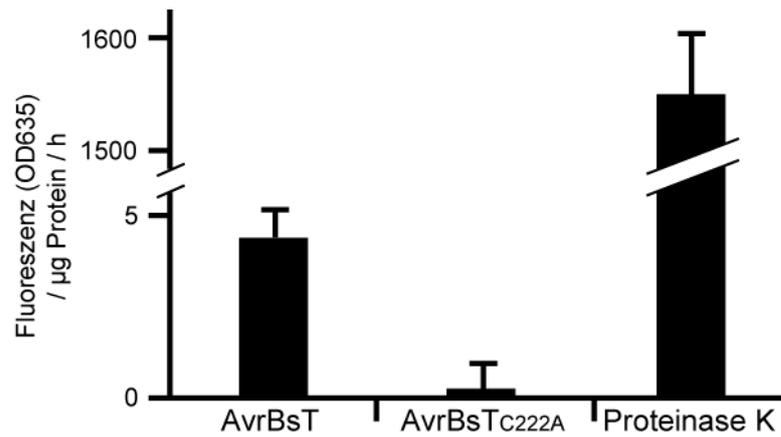


Abbildung 25: AvrBsT zeigt Proteaseaktivität.

AvrBsT_{WT} und AvrBsT_{C222A} wurden als 6xHis-Fusionsproteine gereinigt und mit Fluoreszenz-gekoppeltem Casein (RediPlate™ 96 EnzChek® Protease Assay Kit (Invitrogen)) inkubiert. Je 1 μg der gereinigten Proteine und Proteinase K wurden eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus je 5 Replikaten und deren Standardabweichung nach 1 h Inkubation.

3.9.1.1 AvrBsT besitzt keine SUMO-Proteaseaktivität

Die Effektorproteine YopJ und AvrXv4 zeigen SUMO-Isopeptidaseaktivität. Daher sollte überprüft werden, ob für AvrBsT ebenfalls eine Funktion als SUMO-Protease gezeigt werden kann. Dazu wurde SUMO aus Tomate amplifiziert und im Binärvektor pGWB21 mit einem N-terminalen c-Myc-Epitop fusioniert. Transiente Koexpression von c-Myc-SUMO und AvrBsT oder der Mutante AvrBsT_{C222A} in *N. benthamiana* und ein anschließender Immunoblot zum Nachweis SUMO-modifizierter Proteine sollte Aufschluss über eine eventuell vorhandene Aktivität geben. Ein Immunoblot mit einem α -c-Myc-Antikörper zeigte ein Muster an SUMO-konjugierten Proteinen (Abbildung 26). Es wurden jedoch keine Veränderungen in diesem Muster in Anwesenheit des Effektors AvrBsT detektiert. Die Funktionalität von AvrBsT wurde mittels HR-Induktion in *N. benthamiana* überprüft.

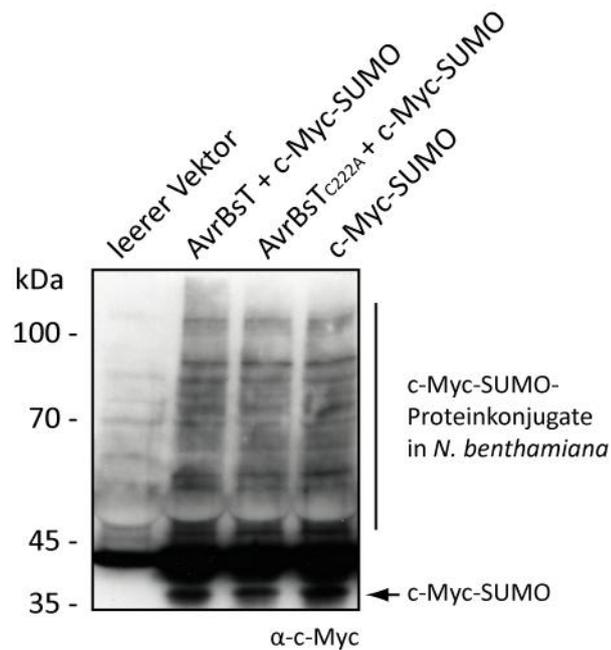


Abbildung 26: Immunoblot SUMO-konjugierter Pflanzenproteine.

Agrobacterium-Stämme mit c-Myc-SUMO und AvrBsT oder AvrBsT_{C222A} wurden im Verhältnis 1:2 (Endkonzentration 1×10^9 cfu/ml) in *N. benthamiana* inokuliert. 22 hpi wurden Proteinextrakte hergestellt und 50 μ l Extrakt per SDS-Gel aufgetrennt. Der Immunoblot wurde mit einem α -c-Myc-Antikörper inkubiert, um c-Myc-SUMO zu detektieren. Der Pfeil markiert freies c-Myc-SUMO, darüber ist ein Muster von SUMO-konjugierten Proteinen zu sehen.

3.9.2 Beeinflusst AvrBsT das pflanzliche SnRK1-Protein?

Nachdem gezeigt wurde, dass AvrBsT Proteaseaktivität besitzt, wurde getestet, ob SnRK1 ein mögliches Substrat von AvrBsT ist. Dazu wurde *SnRK1* in den Binärvektor pGWB20 rekombiniert, der eine zehnfache c-Myc-Markierung an den C-Terminus des Proteins fusioniert. Das *SnRK1*-c-Myc-Fusionskonstrukt wurde jeweils zusammen mit nicht markiertem *avrBsT*_{WT}, *avrBsT*_{C222A} und *avrBs1* in Paprika ECW-10R koexprimiert. 24 hpi wurden Proteinextrakte aus inokuliertem Blattgewebe erstellt und im Immunoblot mit einem c-Myc-Antikörper inkubiert, um c-Myc-markiertes SnRK1 zu detektieren. Die Abbildung 27 zeigt die Detektion des SnRK1-cMyc-Fusionsproteins in Paprika, in Anwesenheit einer leeren T-DNA, AvrBs1, AvrBsT_{WT} oder AvrBsT_{C222A}. Es wurden unter den getesteten Bedingungen keine differentiellen Proteinsignale beobachtet. Vermutlich haben also weder AvrBs1 noch AvrBsT einen Einfluss auf die Stabilität des SnRK1-c-Myc-Fusionsproteins.

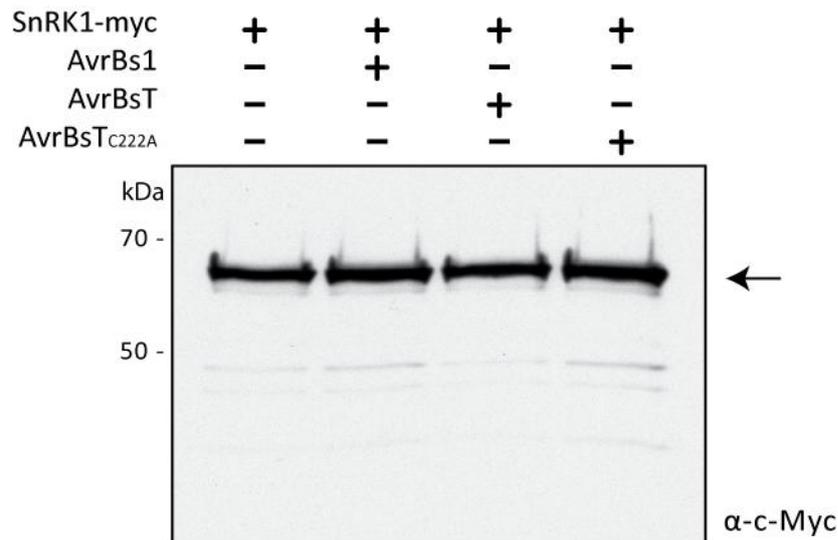


Abbildung 27: SnRK1-Proteinstabilität in Anwesenheit von AvrBs1 oder AvrBsT.

SnRK1-c-Myc wurde mit *avrBs1*, *avrBsT* oder *avrBsT_{C222A}* nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation (1×10^9 cfu/ml) in Paprika ECW-10R koexprimiert. 24 hpi wurden Proteinextrakte aus inokuliertem Blattgewebe erstellt. Je 20 μ l der Extrakte wurde auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen c-Myc-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers. Der Pfeil markiert das SnRK1-c-Myc-Fusionsprotein.

3.9.3 Der Einfluss der Effektoren AvrBs1 und AvrBsT auf das *SnRK1*-Transkript

Wie oben (3.6.1) beschrieben, korrelierte das „Silencing“ des *SnRK1*-Transkriptes mit einer stark reduzierten AvrBs1-HR. Daher sollte untersucht werden, ob die *SnRK1*-Transkriptmenge möglicherweise durch AvrBs1 oder AvrBsT reguliert wird. Dazu wurde die *SnRK1*-mRNA in Anwesenheit eines der beiden Effektoren mittels qRT-PCR analysiert (siehe 3.6.3). Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass sie einen *SnRK1*-spezifischen Bereich von 300 Basen amplifizieren sollten, der in *SnRK1* aus Paprika und aus Tomate identisch ist (siehe Abbildung 19). Die Effektorgene *avrBs1*, *avrBsT* und das mutierte *avrBsT_{C222A}* wurden ohne Epitop-Markierung *Agrobacterium*-vermittelt in Paprika ECW-10R exprimiert. 24 hpi wurde RNA aus dem inokulierten Blattgewebe isoliert, angeglichen und in die qRT-PCR eingesetzt. Die Abbildung 28 zeigt die Änderungen in der Transkriptmenge: Nach Expression von AvrBs1 bleibt das Transkript nahezu unverändert, die Expression von AvrBsT und AvrBsT_{C222A} reduzieren das *SnRK1*-Transkript auf ca. 85 %. Das Experiment wurde wiederholt, wobei das Transkript in Anwesenheit von AvrBs1 ca. 15 % reduziert war.

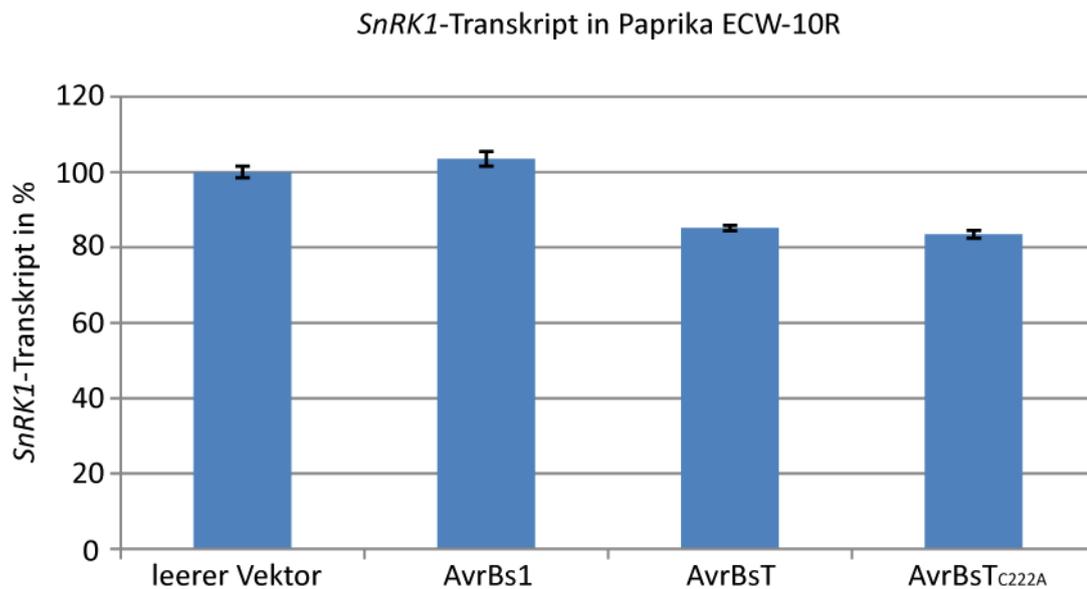


Abbildung 28: *SnRK1*-Transkript in Anwesenheit von AvrBs1 und AvrBsT in Paprika.

Die Effektoren *avrBs1*, *avrBsT* und *AvrBsT_{C222A}* wurden nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation in Paprika ECW-10R exprimiert. 24 hpi wurde RNA isoliert und in der qRT-PCR analysiert. Die Mittelwert aus Triplikaten und die Standardabweichung wurden bestimmt. Die *SnRK1*-Transkriptmenge in der Leervektorprobe wurde auf 100 % gesetzt, die übrigen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Es ist möglich, dass eine beginnende AvrBs1-HR oder die AvrBsT-HR die Transkriptmengen-Bestimmung in resistenten Paprika ECW-10R beeinflusst. Um die *SnRK1*-Transkripte unbeeinflusst von der HR-Induktion analysieren zu können, wurde das Experiment in Tomate wiederholt. Hierbei wurde angenommen, dass sich das *SnRK1*-Gen in Tomate ähnlich zu dem *SnRK1*-Gen in Paprika verhält. Die Effektorgene *avrBs1*, *avrBsT* und das mutierte *avrBsT_{C222A}* wurden *Agrobacterium*-vermittelt in Blättern von *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker exprimiert. 36 hpi wurde RNA aus dem Blattgewebe isoliert und in qRT-PCR analysiert. Die Abbildung 29 zeigt eine repräsentative Auswertung aus zwei Experimenten: In Anwesenheit von AvrBs1 sind ca. 75 % des *Snf1*-Transkripts im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle vorhanden, bei AvrBsT ca. 80 %, bei AvrBsT_{C222A} ca. 75 %. Die Expression der Effektorgene verursachte offenbar Varianzen in der Menge des *SnRK1*-Transkriptes. Diese scheinen jedoch nicht Effektor-spezifisch zu sein.

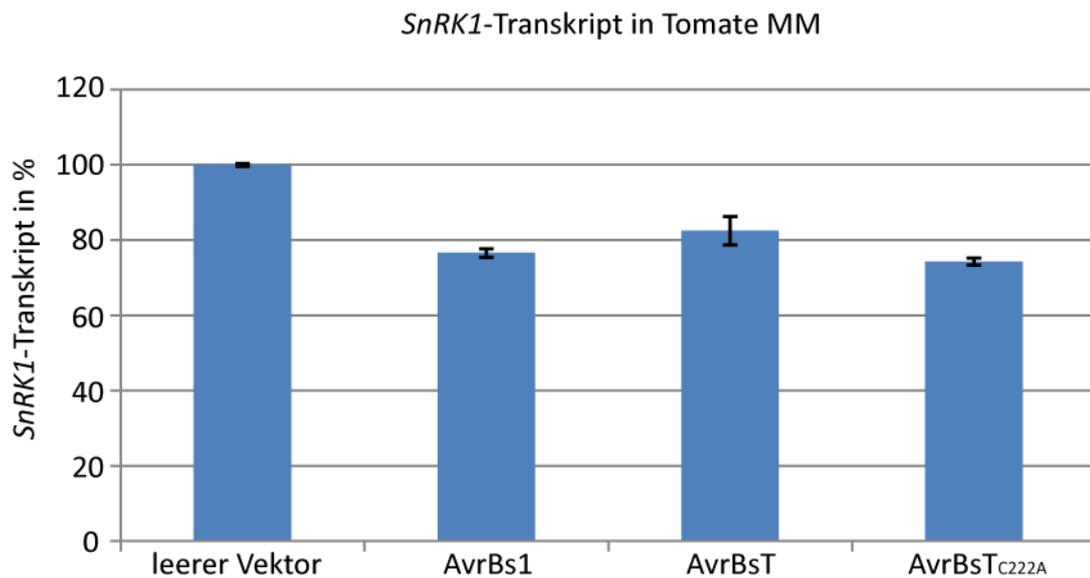


Abbildung 29: *SnRK1*-Transkript in Anwesenheit von AvrBs1 und AvrBsT in Tomate.

Die Effektoren *avrBs1*, *avrBsT* und *AvrBsT_{C222A}* wurden nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation in Tomate cv. MoneyMaker exprimiert. 36 hpi wurde RNA isoliert und in der qRT-PCR analysiert. Die Mittelwert aus Triplikaten und die Standardabweichung wurden bestimmt. Die *SnRK1*-Transkriptmenge in der Leervektorprobe wurde auf 100 % gesetzt, die übrigen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

3.10 Y2H-Analysen zur Identifizierung von *SnRK1*-Interaktoren

Wie oben beschrieben, scheint das *SnRK1*-Protein für die AvrBs1-vermittelte HR notwendig zu sein. Das *SnRK1*-Transkript und die *SnRK1*-Proteinstabilität werden aber nicht in erkennbarem Maße von den Effektoren AvrBs1 und AvrBsT beeinflusst. Daher wurde vermutet, dass weitere Proteine, möglicherweise Interaktionspartner der *SnRK1*, an der AvrBs1-Erkennung und / oder an der Auslösung der AvrBs1-vermittelten HR beteiligt sind. Um solche Proteine zu finden, wurden Y2H-Sichtungen mit *SnRK1* als Köder durchgeführt. Das *SnRK1*-Gen wurde in den Vektor pGBKT7attR rekombiniert. Das Köderplasmid pGBKT7attR_*SnRK1* wurde in die Stämme Y187 und AH109 transformiert. Der Test auf Autoaktivierung im Stamm AH109 (pGBKT7attR_*SnRK1*) zeigte keine Aktivierung der Reporter durch *SnRK1*. Der Köderstamm AH109 (pGBKT7attR_*SnRK1*) wurde mit dem Stamm Y187 gepaart, der die in 3.8 erwähnte cDNA-Bibliothek aus Paprika enthält. Aus ca. 5×10^6 gesichteten Diploiden wurden insgesamt 147 Kandidaten isoliert, von denen 35 spezifisch mit *SnRK1* und nicht mit Lamin C interagierten. Diese Kandidaten wurden sequenziert. Sequenzvergleiche mit EST-Datenbanken von *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *S. tuberosum* und *N. tabacum* ergaben in den meisten Fällen Homologien zu bekannten Genen (siehe Tabelle 6).

Eine Auswahl an spezifischen Kandidaten wurde im gerichteten Y2H-Ansatz auf Interaktion mit AvrBsT_{C222A} und auf Interaktion mit AvrBs1 getestet. Interessanterweise interagierten eine Papain-ähnliche Cysteinprotease, eine Ferredoxin-Nitrit-Reduktase, ein ABC-Transporter-Ähnliches und eine vermutete Endonuklease auch mit AvrBsT_{C222A}. Die vermutete Endonuklease war der einzige Kandidat, der auch mit AvrBs1 interagierte. Aus Zeitgründen liegen noch keine weiteren, relevanten Daten zu den Interaktoren vor.

Tabelle 6: Interaktoren der SnRK1 aus Paprika

Name	Homologie	AvrBsT	AvrBs1
iSF01	Papain-ähnliche Cystein-Protease C1A (2x) ^a	✓	✗
iSF02	Protein-Transporter	✗	ng
iSF08	Katalase (2x)	✗	✗
iSF10	Nukleinsäure bindendes Protein	✗	✗
iSF11	60S ribosomales Protein	ng	ng
iSF17	Cytochrom C Oxidase	✗	ng
iSF20	GAL83 (13x)	✗	✗
iSF21	Zink-Fingerprotein	✗	ng
iSF25	ThiC	ng	ng
iSF63	Ketolsäure-Reduktoisomerase	✗	✗
iSF66	nicht charakterisiertes Protein	ng	ng
iSF72	ABC-Transporter	✓	✗
iSF100	mögliche Ferredoxin-Nitrit-Reduktase	✓	ng
iSFB1	vermutete Endonuklease	✓	✓
iSFB3	ATPase-Untereinheit aus der Vakuole	ng	ng
iSFB4	Ethylenrezeptor-Homolog	ng	ng
iSFB6	E3-Ubiquitinligase	ng	ng
iSFB7	nicht charakterisiertes Protein	ng	ng
iSFB10	Pherophorin	ng	ng
iSFB13	RSH-ähnliches Protein	ng	ng
iSFB17	nicht charakterisiertes Protein	✗	✗
iSFB21	Protein mit Ankyrin-Wiederholungen	ng	ng
iSFB22	Prolylhydroxylase PHD4	ng	ng
iSFB27	Centromer-Protein C1	ng	ng

✓ = Interaktion, ✗ = keine Interaktion, ng = nicht getestet, a = Zahl der verschiedenen gefundenen Klone

4 Diskussion & Ausblick

4.1 XopJ besitzt ein N-Myristoylierungsmotiv und lokalisiert an der pflanzlichen Plasmamembran

Das Effektorprotein XopJ aus *Xcv* gehört zur C55-Familie YopJ-homologer Proteine und besitzt ein N-terminales N-Myristoylierungsmotiv. N-Myristoylierungsmotive kommen vereinzelt in Effektoren verschiedener Effektorfamilien vor, z. B. in der HopX-Superfamilie, zu der XopE1 und XopE2 aus *Xcv* zählen (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004; Nimchuk et al, 2000; Robert-Seilaniantz et al, 2006; Shan et al, 2000; Tampakaki et al, 2002; Thieme et al, 2007). Neuere Studien belegen, dass HopZ1 und HopZ2 ebenfalls ein N-Myristoylierungssignal besitzen und in Membranfraktionen nachweisbar sind (Lewis et al, 2008). Möglicherweise stellt die Verbindung aus katalytischer Triade der C55-Familie und N-Myristoylierungsmotiv eine vorteilhafte Kombination für Effektoren phytopathogener Bakterien dar.

N-Myristoylierung ist ein, in Eukaryoten weit verbreiteter, Prozess und fördert die Bindung von Proteinen an Membranen (Maurer-Stroh et al, 2002). Die Membranbindung bestimmter Proteine kann der Regulation von Stoffwechselprozessen dienen (Pierre et al, 2007). An N-Myristoylierungsmotiven wird in eukaryotischen Zellen von der N-Myristoyltransferase (NMT) kovalent Myristinsäure, eine gesättigte 14C-Fettsäure, über eine Amid-Bindung an die N-terminale As (vorzugsweise Gly) gebunden (Farazi et al, 2001; Zha et al, 2000). Es gibt ebenfalls Hinweise auf N-Myristoylierung in Prokaryoten, die jedoch vermutlich nicht von einer NMT katalysiert wird (Jyomoto et al, 2006).

Mit verschiedenen mikroskopischen Analysen wurde gezeigt, dass XopJ an der Plasmamembran eukaryotischer Zellen lokalisiert. Die Membranlokalisierung von XopJ ist vom konservierten Glycinrest an der As-Position 2 abhängig. Die Ursache für die Membranlokalisierung und ein verändertes Laufverhalten im Gel ist wahrscheinlich auf die Acylierung des N-terminalen Gly von XopJ mit Myristinsäure zurückzuführen. Um festzustellen, ob es sich bei der Modifikation tatsächlich um Myristinsäure handelt, wurde versucht, die N-terminale Region massenspektroskopisch zu analysieren (Mann & Jensen, 2003). Diese Experimente blieben jedoch aufgrund des zu großen N-terminalen Fragments von XopJ nach Trypsin-Verdau ergebnislos (R. Szczesny, F. Thieme, U. Bonas, unveröffentlicht). Alternativ kann man die Acylierung über Immunblot und Autoradiografie nachweisen (Nimchuk et al, 2000). Dazu wird radioaktive H^3 -Myristinsäure in Blattgewebe inokuliert, welches *xopJ* mit Epitopmarkierung exprimiert. H^3 -Myristinsäure dient als Substrat der eukaryotischen NMT und wird

möglicherweise kovalent an XopJ gebunden. Der Effektor kann dann mittels Immunpräzipitation gereinigt und die Modifikation im Autoradiogramm nachgewiesen werden.

N-Myristoylierung ist häufig ein kotranslationaler Prozess in Eukaryoten, der frei werdendes Gly direkt nach der Met-Abspaltung am Ribosom modifiziert. Da die Lokalisierungsstudien in transformiertem Blattgewebe durchgeführt wurden, fehlt bislang der Nachweis, ob T3SS-abhängig translozierte Effektoren ebenfalls myristoyliert werden. Wahrscheinlich ist aber auch eine Modifikation translozierter Proteine möglich. So gibt es Beispiele von posttranslationaler N-Myristoylierung z. B. nach Caspase-vermittelter proteolytischer Spaltung von Proteinen (Zha et al, 2000). Subzelluläre Lokalisierungsstudien zeigten, dass die NMT aus *A. thaliana* zwar zu ca. 60 % in der ribosomalen Fraktion, aber auch zu ca. 33 % im Zytoplasma vorkommt (Qi et al, 2000). Ein Effektor, der das T3SS vermutlich in ungefaltetem Zustand passiert, könnte vor seiner Rückfaltung von der zytoplasmatischen NMT myristoyliert werden. Es wäre auch möglich, dass das N-Myristoylierungssignal, das noch vor oder innerhalb des Sekretionssignals liegt, generell ungefaltet vorliegt.

Neben der Myristoylierung gibt es noch andere Prozesse, die die Verankerung eines Proteins in der Membran vermitteln können. An den Cysteinrest an Position 4 im N-Myristoylierungsmotiv kann bspw. posttranslational und reversibel Palmitinsäure kovalent über eine Thioester-Verbindung gekoppelt werden, die die Membranbindung stabilisiert und Protein-Protein-Interaktionen begünstigt (Linder & Deschenes, 2007; Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004). XopJ trägt ebenfalls einen Cysteinrest an Position 4. In künftigen Arbeiten kann das XopJ-Protein auf Palmitoylierung untersucht werden. Durch die Zugabe von Hydroxylamin könnte z. B. die Thioester-Bindung zwischen Palmitinsäure und Protein gelöst werden und man könnte ein verändertes Laufverhalten im SDS-PAGE beobachten (Linder & Deschenes, 2007; Morrison et al, 1991; Thieme et al, 2007).

Vorläufige vergleichende Untersuchungen zwischen einem erst kürzlich sequenzierten *Xcv*-Stamm und *Xcv* 85-10 legen die Vermutung nahe, dass die DNA-Sequenz des N-Myristoylierungssignals möglicherweise über ein Transposon in der DNA-Sequenz des Bakteriums verbreitet wird (R. Szczesny, U. Bonas, unveröffentlicht). Ein Sequenzbereich, der die ersten 50 Bp des *xopE2*-ORF und weitere 500 Bp des 5'-Bereichs vor der kodierenden Region umfasst, wurde mehrmals in beiden Stämmen gefunden und zeigt u. a. Homologie zu einem Transposon-verursachten Kointegrat. Unter anderem wurden verschiedene große Teile dieser 550 Bp-Sequenz vor den Effektorgenen *xopJ*, *xopB* und *avrBsT* gefunden. Jedoch existiert nur bei *xopJ* eine korrekte translationale Fusion der N-Myristoylierungssignal-Sequenz zur kodierenden Region des Gens. Die Proteine XopB und AvrBsT enthalten also kein N-Myristoylierungssignal.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisierung der Effektoren XopJ, AvrBsT und AvrBs1 und ihre Erkennung in Pflanzen

Alle drei in dieser Arbeit untersuchten Effektorproteine lokalisieren in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzenzelle. Während XopJ mit der Plasmamembran assoziiert ist, lokalisiert AvrBsT im Zytoplasma und im Zellkern. AvrBs1 hingegen befindet sich nur im Zytoplasma und ist vom Zellkern ausgeschlossen.

Am Beispiel von XopJ wird deutlich, dass sich die subzelluläre Lokalisierung der Effektoren auf ihre Erkennung und möglicherweise auch auf ihre Virulenzfunktion in der Pflanze auswirkt. Das Membran-lokalisierte XopJ löst in vier von 17 getesteten Nachtschattenspezies die HR aus, das zytoplasmatisch lokalisierte XopJ_{G2E} wird jedoch nur in einer der vier Pflanzenspezies erkannt. Dahingegen wurde in keiner der untersuchten Pflanzen die XopJ-Mutante im Cysteinrest an Position 235 der katalytischen Triade erkannt. Die Abhängigkeit der HR-Induktion von der intakten katalytischen Triade wurde auch für die YopJ-Homologen AvrXv4, AvrRxv und AvrBsT gezeigt (Orth et al, 2000; Roden et al, 2004a; Whalen et al, 2008). Der *Xcv*-Effektor AvrXv4 lokalisiert ausschließlich im Zytoplasma (Roden et al, 2004a). Das homologe AvrRxv-Protein ist trotz Kernlokalisierungssignals ebenfalls nur im Zytoplasma lokalisiert, wird aber auch in Assoziation mit Membranen vermutet (Bonshtien et al, 2005). Die vier Effektorproteine XopJ, AvrBsT, AvrRxv und AvrXv4 aus *Xcv* gehören alle zur YopJ-Familie, ihre Virulenzziele finden sich demnach vermutlich aber in verschiedenen Zellkompartimenten.

Wahrscheinlich sind die Substrate von XopJ in *Nicotiana* spp. Membranproteine. Möglicherweise wird in *Nicotiana* spp. die Modifizierung eines oder mehrerer Substrate aus der Membran durch ein R-Gen/R-Protein erkannt. Nicht-membranassoziiertes XopJ_{G2E} kann das Substrat nicht modifizieren, weshalb keine Erkennung stattfindet. Der Mechanismus der Erkennung in *Physalis peruviana* unterscheidet sich womöglich von dem in *Nicotiana* spp., da zytoplasmatisch lokalisiertes XopJ_{G2E} ebenfalls erkannt wird. In *P. peruviana* wird XopJ möglicherweise von einem zytoplasmatischen NB-LRR-Protein erkannt, bevor es mit der Membran assoziiert. So findet die Erkennung des Kern-lokalisierten AvrBs4 im Zytoplasma statt, vermittelt auf noch unbekannte Weise vom zytoplasmatisch lokalisierten R-Protein Bs4 (Schornack et al, 2004). Ein Vergleich der Zielproteine der einzelnen der YopJ-Homologen aus *Xcv* könnte interessante Einblicke in deren Funktion geben und beleuchten, warum Vertreter dieser Familie in vielen verschiedenen Bakterien vorkommen.

Interessanterweise scheint die AvrBsT-vermittelte Resistenz sehr weit verbreitet zu sein. Von 17 getesteten Pflanzenspezies reagierten zehn auf AvrBsT mit der HR. Über die AvrBsT-Resistenz ist noch wenig bekannt. Entweder handelt es sich bei dem postulierten *BsT*-Gen um ein ubiquitär verbreitetes *R*-Gen, oder AvrBsT löst durch seine Aktivität in der Zelle selbst den Zelltod aus. Erst kürzlich konnte die Suszeptibilität von *A. thaliana* gegenüber AvrBsT aufgeklärt werden (Cunnac et al, 2007). *A. thaliana*-Pflanzen, die nicht auf AvrBsT reagieren, tragen das Suszeptibilitätsgen *SOBER1* (Cunnac et al, 2007). Das Protein SOBER1 ist homolog zu α/β -Hydrolasen und zeigte *in vitro* Carboxylesterase-Aktivität. Es wird vermutet, dass AvrBsT und SOBER1 in der Zelle antagonistisch auf gemeinsame Substrate wirken (Cunnac et al, 2007). Tomatenpflanzen des Kultivars Moneymaker sind suszeptibel gegenüber dem *Xcv*-Stamm 75-3 der u. a. AvrBsT transloziert. Die Suszeptibilität von Moneymaker gegenüber AvrBsT könnte ebenfalls von einem *SOBER1*-homologen Gen abhängen. In vorläufigen Arbeiten wurde ein *SOBER1*-Homologes aus den suszeptiblen Tomatenpflanzen kloniert, dass bei Koexpression mit *avrBsT* in *N. benthamiana* ebenfalls die HR verzögerte (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlicht).

4.2 Die Identifizierung von Virulenzzielen von AvrBs1 und AvrBsT

Eine Virulenzfunktion von AvrBsT ist die Suppression der AvrBs1-vermittelten HR in Paprika ECW-10R Pflanzen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die molekulare Charakterisierung der Ursachen der Suppression. Dazu wurde mit Hefe-Interaktionsstudien nach pflanzlichen Virulenzzielen gesucht. Die Suppression der AvrBs1-HR durch AvrBsT findet innerhalb der Pflanzenzelle statt und beide Effektoren lokalisieren im Zytoplasma. Deshalb wurden AvrBs1 und AvrBsT als Köder in Y2H-Sichtungen eingesetzt, um potentielle Virulenzziele beider Effektoren zu identifizieren. Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek aus suszeptiblen Tomatenpflanzen benutzt und potentielle Virulenzziele beider Effektoren identifiziert. Es wurden verschiedene Interaktor-Kandidaten isoliert unter denen sich jedoch kein gemeinsames Zielprotein befand.

4.2.1 Die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen *in planta*

Die Interaktion von Proteinen im Y2H-System gibt einen Hinweis auf eine Interaktion im natürlichen System. Jedoch bestehen wesentliche Unterschiede zwischen dem heterologen Hefesystem und der *in vivo*-Situation. Diese liegen zum einen in der Expression von Genfragmenten aus den verwendeten cDNA-Bibliotheken statt kompletten Genen und zum anderen im forcierten Transport aller Proteine/Proteinfragmente in den Zellkern der Hefezelle. Eine Bestätigung der Interaktionen in der Pflanze ist deshalb notwendig. Die Verwendung von KoIP zur Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen war wegen der unspezifischen Bindung von AvrBs1, AvrBsT und SnRK1 an die Protein G-Matrix unmöglich. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zur *in planta*-Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen BiFC genutzt (Hu et al, 2002). Die Interaktionen von AvrBs1 mit der Tyr-Kinase und mit dem δ -TIP konnten im BiFC bestätigt werden. Beide Proteine interagieren im Zytoplasma mit AvrBs1. Die Interaktion von AvrBs1 mit der Tyr-Kinase zeigte auch Fluoreszenz im Zellkern. In Lokalisierungsstudien bleibt AvrBs1-GFP jedoch vom Zellkern ausgeschlossen. Vielleicht agiert die Tyr-Kinase als Kernimportshelfer für AvrBs1, ist aber unter natürlichen Bedingungen zu schwach exprimiert, sodass die Fluoreszenz von AvrBs1-GFP im Zellkern nicht detektierbar ist. Möglicherweise kann durch gemeinsame Überexpression des nichtmarkierten Tyr-Kinase-Gens und *avrBs1-GFP* Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden.

In den durchgeführten BiFC-Tests fluoreszierte jede mit AvrBsT getestete Proteinkombination. Hier offenbart sich wahrscheinlich eine Schwäche des verwendeten BiFC-Systems. Nach der Verbindung der beiden YFP-Teile bleiben diese dauerhaft zusammen und fluoreszieren fortwährend, was zwar die Detektionssensibilität gegenüber schwachen und instabilen Interaktionen stark erhöht, jedoch auch flüchtige Bindungen dauerhaft erscheinen lässt (Bhat et al, 2006; Magliery et al, 2005; Ohad et al, 2007). Die Hefe-Interaktionsdaten zeigen eine Interaktion zwischen AvrBsT und dem Deckelkomplex des 26S Proteasoms, über das der intrazelluläre Proteinabbau erfolgt. Es ist also möglich, dass zum Abbau bestimmte YFP_C-Fusionsproteine kurzzeitig in räumliche Nähe zu AvrBsT-YFP_N gelangen, wodurch sich die beiden YFP-Teile dauerhaft verbinden und Fluoreszenzsignale abgeben. Für die Analyse instabiler Proteinkomplexe könnten die YFP-Teile so modifiziert werden, dass sie sich wieder trennen und nur im Moment der Komplexbildung Fluoreszenz emittiert wird. Eine alternative Methode zur *in vivo*-Analyse von Interaktionen bietet der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) (Karpova et al, 2003). Die beiden potentiellen Interaktionspartner werden an zwei verschiedenen fluoreszierende Proteine fusioniert, von denen das Emissionsspektrum des einen mit dem Extinktionsspektrum des anderen überlappt (bspw. CFP und YFP). Befindet sich ein Interaktionspartner in räumlicher Nähe des anderen, wird nach

Anregung des ersten Fluoreszenzmoleküls dessen Emissionsenergie auf das zweite Molekül übertragen, woraufhin die Emission des zweiten Moleküls detektierbar wird. Findet eine Interaktion nur flüchtig statt, kann nur die Fluoreszenz des ersten angeregten Moleküls detektiert werden. FRET wurde in unserem Labor bereits erfolgreich verwendet, um die Interaktion von AvrBs3 und Importin α zu bestätigen (D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlicht).

Keine der in Hefezellen beobachteten Protein-Protein-Interaktionen wurde durch die *in planta*-Interaktionstests widerlegt. Über die Spezifität der AvrBsT-Interaktionen kann nach den BiFC-Ergebnissen jedoch nur spekuliert werden. Entscheidend für die Beurteilung der Protein-Protein-Interaktionen ist deshalb die Untersuchung der biologischen Relevanz der interagierenden Pflanzenproteine bezüglich HR-Induktion durch AvrBs1 und AvrBsT.

4.2.2 Die mögliche Bedeutung der Interaktoren für die Virulenz

Die AvrBs1-Interaktoren aus dem Y2H konnten keiner funktionellen Gruppe und keinem Signalnetzwerk zugeordnet werden. Die Interaktion von zwei Kandidaten mit AvrBs1 wurde *in planta* bestätigt. Sie stellen interessante Virulenzziele von AvrBs1 dar. Tonoplast-intrinsische Proteine (TIP) sind Aquaporine, Wassertransporter in Membranen von Vakuolen. TIP vom Typ δ befinden sich u. a. in Vakuolen von Tomaten-Epidermiszellen, die Protease-Inhibitoren enthalten (Jauh et al, 1998). Möglicherweise besteht eine Virulenzfunktion von AvrBs1 darin, die Pflanzenzelle an der Freisetzung der Protease-Inhibitoren zu hindern. AvrBs1 verursacht Zellvergrößerungen in Paprika- und *N. benthamiana*-Epidermiszellen in Form von Pusteln, die der AvrBs3-vermittelten Hypertrophie ähnlich sind (Gürlebeck et al, 2008). Eine Zellvergrößerung bedarf eines Aquaporin-vermittelten Wassereinstroms in die Zelle (Preston et al, 1992). Unter natürlichen Bedingungen werden δ -TIP besonders stark in Hypokotylen und Kotyledonen exprimiert und sind im Tagesrhythmus gleichzeitig mit Expansinen und Zellwandhydrolasen induziert (Daniels et al, 1996; Harmer et al, 2000). Möglicherweise wird die AvrBs1-vermittelte Hypertrophie über eine verstärkte Aktivierung des δ -TIP in Blättern verursacht. Um einen Einfluss des δ -TIP auf die Hypertrophie zu untersuchen, könnte ein homologes *Tip*-Gen in *N. benthamiana* mittels VIGS stillgelegt und die Pustelbildung nach transienter *avrBs1*-Expression untersucht werden.

Das andere *in planta* mit AvrBs1 interagierende Protein zeigt Homologie zu Tyrosinkinase mit Ankyrin-Wiederholungen. Unter den entfernten Homologen der Tyr-Kinasen gibt es Ankyrin-Tyr-Kinasen mit Homologie zu MAPK-Kinase-Kinasen der Raf-Familie (Champion et al, 2004).

Interessanterweise ist das Resistenzprotein PBS1 aus *A. thaliana* ebenfalls eine Ankyrin-Tyr-Kinase (Swiderski & Innes, 2001). Die mit AvrBs1 isolierte Tyrosinkinase ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Resistenzgen, da die Überexpression keine HR induzierte und das „Silencing“ keinen Einfluss auf die AvrBs1-HR hatte. Die Identifizierung von Proteinen, die von der mit AvrBs1 interagierenden Tyr-Kinase phosphoryliert werden, könnte die Frage beantworten, ob sie eine Rolle in der Signalweiterleitung nach Pathogenbefall spielt.

In Y2H-Sichtungen mit dem Köderprotein AvrBsT wurden u. a. ein ABC-Transporter, ein Protein aus dem Deckelkomplex des 26S-Proteasoms, der eEF1A und ein SnRK1-Homologes identifiziert. Der Versuch die Interaktionen *in planta* zu bestätigen gelang nicht, da mit den zur Verfügung stehenden Tests keine eindeutige Aussage über die Spezifität der Interaktionen von AvrBsT mit den Kandidaten in der Pflanze getroffen werden konnte. Die Interaktion von AvrBsT mit der SnRK1 und mit dem eEF1A wurde im BiFC aber auch nicht widerlegt. Da zumindest die Hefe-Interaktionsdaten den Spezifitätstests standhielten und aus der Literatur Interaktionen zwischen den im Y2H gefundenen Kandidaten beschrieben wurden, dienten sie der Erstellung eines Modells (Abbildung 30). SnRK1 interagiert über ein KEKE (Lys- und Glu-reich)-Motiv mit der 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms (Farras et al, 2001). Das mit AvrBsT interagierende Protein der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms verfügt ebenfalls über ein KEKE-Motiv (Realini et al, 1994). Der eEF1A wurde als Interaktor eines Proteins aus dem Deckelkomplex des 26S-Proteasoms identifiziert und treibt wahrscheinlich den Abbau kotranslational beschädigter Proteine an (Chuang et al, 2005). Die mit AvrBsT gefundenen Interaktionspartner deuten auf eine 26S-Proteasom-assoziierte Funktion des Effektors hin. Möglicherweise stört AvrBsT den geregelten Proteinabbau am Proteasom.

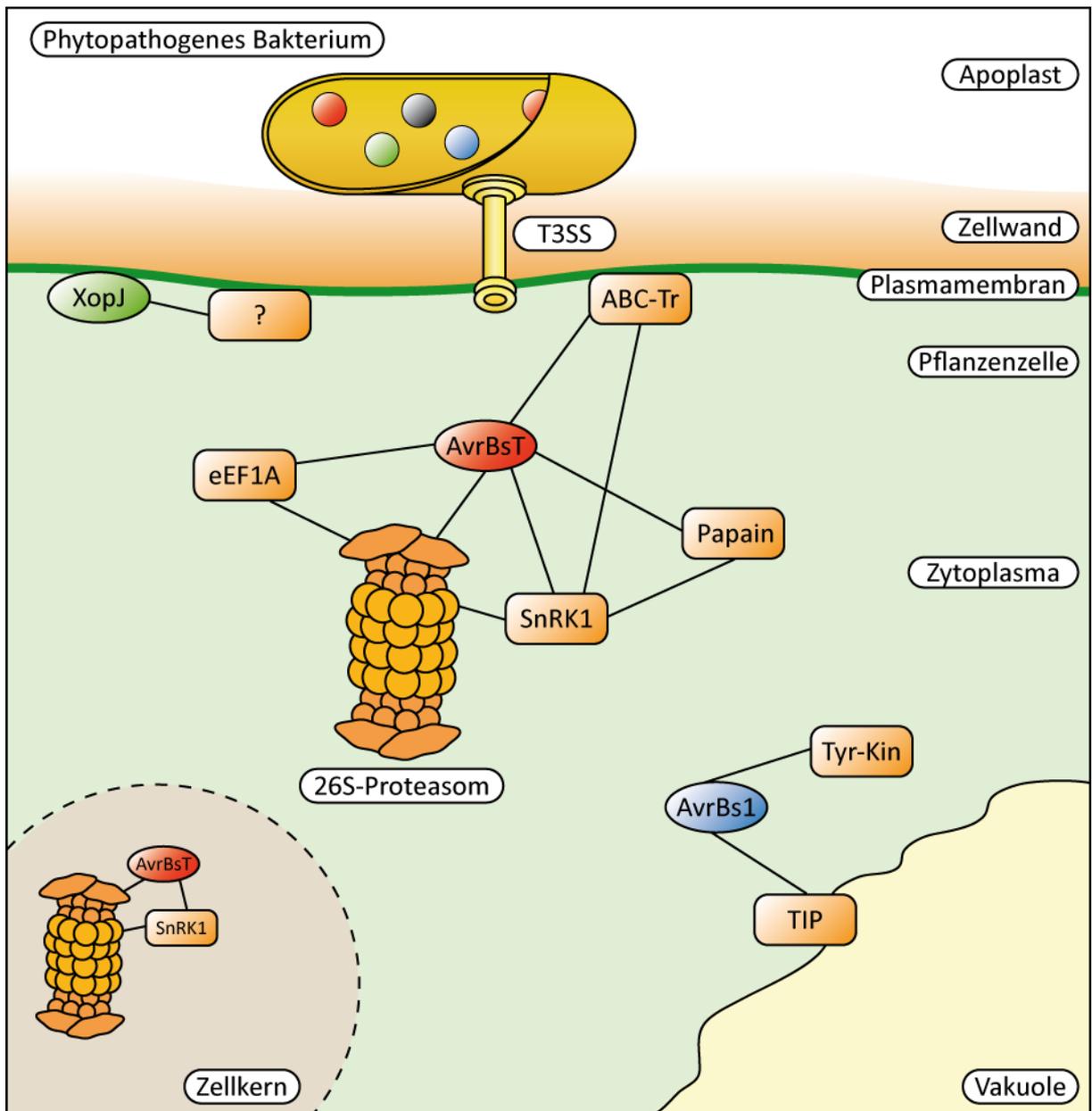


Abbildung 30: Interaktionsschema der Effektoren AvrBs1, AvrBsT und XopJ in der Pflanzenzelle.

Nach der Translokation der Effektoren von *Xcv* durch Zellwand und Plasmamembran der Pflanzenzelle suchen sie ihre Virulenzziele in unterschiedlichen Kompartimenten. Die Substrate von XopJ sind noch nicht identifiziert worden, bestehen aber wahrscheinlich überwiegend aus Membranproteinen. AvrBs1 interagiert mit einem Aquaporin, das in Vakuolen gefunden wurde. Außerdem bindet AvrBs1 eine Tyrosinkinase. Die Interaktoren von AvrBsT bilden vermutlich ein 26S-Proteasom-assoziiertes Netzwerk und interagieren z. T. wahrscheinlich auch untereinander. AvrBsT und SnRK1 können sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern interagieren. Eine Funktion von AvrBsT wird in der Manipulation des Proteasom-vermittelten Abbaus von Proteinen vermutet.

4.2.3 Die biologische Relevanz der Interaktoren für die AvrBs1-HR

Um die biologische Relevanz der Kandidaten aus den Y2H-Sichtungen zu überprüfen, wurden die Transkripte von zwei AvrBs1-Interaktoren und vier AvrBsT-Interaktoren mittels VIGS in Paprika ECW-10R-Pflanzen reduziert. Mit AvrBs1-translozierenden *Xcv* wurde der Einfluss des „Silencing“ auf die AvrBs1-vermittelte HR überprüft. Generell waren die Reaktionen aller VIGS-Pflanzen auf die *Xcv*-Infektion schwächer als in nicht behandelten Pflanzen. Krankheitssymptome (wässrige Läsionen) wurden sehr selten beobachtet. Resistenzreaktionen waren sichtbar, verzögerten sich aber um 24 bis maximal 48 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen. Möglicherweise ist die Verzögerung der Reaktionen auf Virus-Symptome zurückzuführen, wie sie bspw. für das Kartoffel-X-Virus und das Tabakmosaik-Virus beschrieben wurden (Ratcliff et al, 2001). Obwohl das in dieser Arbeit verwendete TRV geringere Symptome als PVX und TMV zeigt, könnten diese für eine Verzögerung der Reaktionen ausreichend sein (Burch-Smith et al, 2004).

„Silencing“ der Gene für δ -TIP, Tyr-Kinase, eEF1A und das GYF-Domänen-Protein hatte in mehreren Versuchen keinen Einfluss auf die AvrBs1-HR. „Silencing“ des *SnRK1*-Gens führte dagegen reproduzierbar zu einer starken Reduktion der AvrBs1-HR. Offenbar ist *SnRK1* für die AvrBs1-vermittelte HR notwendig. Nach *SnRK1*-„Silencing“ in Paprika ECW-123-Pflanzen wurden auch andere Erkennungsreaktionen untersucht. Die Inokulation verschiedener *Xcv*-Stämme zeigte, dass die AvrBs3-HR nicht von der *SnRK1* abhängig ist. Die Bonitur der sich langsamer entwickelnden AvrBs2- und AvrBsT-HR in VIGS-Pflanzen gab Hinweise darauf, dass auch diese beiden HR nicht *SnRK1*-abhängig sind. Das „Silencing“ des ABC-Transporters führte sporadisch und schlecht reproduzierbar zu einer leichten Reduktion der AvrBs1-HR. Möglicherweise ist der ABC-Transporter eine weniger wichtige Komponente in der *SnRK1*-abhängigen Signalkette der AvrBs1-HR-Induktion. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass ein ABC-Transporter-homologes Kandidatengen in der Y2H-Sichtung mit *SnRK1* als Köder identifiziert wurde. Pflanzen besitzen zahlreichen ABC-Transporter-Gene (103 annotierte in *A. thaliana*) (Sanchez-Fernandez et al, 2001). Vielleicht kann eines der homologen Gene die Aufgabe des ABC-Transporters nach dessen „Silencing“ übernehmen. Das quantifizierbare „Silencing“ eines bestimmten ABC-Transporters ist also wahrscheinlich schlecht möglich.

Im Gegensatz dazu ist jeweils nur ein *SnRK1*-homologes Gen in Tomate und Paprika gefunden worden, sodass das „Silencing“ des *SnRK1*-Gens quantifiziert werden konnte. Wie die Quantifizierung der verbliebenen *SnRK1*-Transkriptmenge nach VIGS des Gens in Paprika ECW-10R ergab, war das *SnRK1*-Transkript um ca. 70 % im Vergleich zu Kontrollpflanzen reduziert. In

den durchgeführten qRT-PCR wurde ein Fragment von 300 Bp amplifiziert. Da das 300 Bp-Fragment auch von unvollständigen und bereits partiell degradierten Transkripten amplifiziert werden kann, liegt die Menge an vollständigen Transkripten wahrscheinlich bei noch weniger als 30 %. Das VIGS des *SnRK1*-Gens in Paprika ergab eines der sehr seltenen aussagekräftigen Ergebnisse für „Silencing“ von Interaktor-Kandidaten in unserer Abteilung.

Es bleibt die Frage, ob *SnRK1* das Resistenzgen *Bs1* sein könnte. Vermutlich ist es das nicht, da die Überexpression des *SnRK1*-Gens keinen Zelltod verursachte. Außerdem sind die *SnRK1*-Proteine hoch homolog in verschiedenen Pflanzenspezies, die *AvrBs1*-HR hingegen ist nicht sehr weit verbreitet. Dennoch ist es möglich, dass in Paprika-ECW-10R-Pflanzen ein *Bs1* als „guard“ das „gardee“ *SnRK1* überwacht. Die Identifizierung von *Bs1* würde die Aufklärung der Signalwege von der *AvrBs1*-Erkennung bis hin zur HR wesentlich erleichtern.

4.3 *AvrBsT* ist ein Effektor mit Proteasefunktion

In einem *in vitro*-Proteasetest zeigte gereinigtes rekombinantes *AvrBsT*-Protein die Fähigkeit, das als Substrat angebotene Casein zu spalten. Da die Aktivität signifikant gegenüber einer *AvrBsT*-Mutante in der katalytischen Triade erhöht war, ist die Proteasefunktion von *AvrBsT*, wie die HR-Induktion, also abhängig von diesem konservierten Motiv. Im Vergleich zur Serin-Proteinase K, die als allgemeine Endo- und Exopeptidase wirkt und als Kontrolle diente, war die Aktivität von *AvrBsT* um ein Vielfaches schwächer. Vermutlich agiert *AvrBsT* in Pflanzenzellen sehr spezifisch und lysiert nur bestimmte Substrate. Ma und Kollegen zeigten, dass die *AvrBsT*-homologen Proteine HopZ1, HopZ2 und HopZ3 aus *P. syringae* ebenfalls proteolytisch aktiv sind (Ma et al, 2006). Die Aktivität von HopZ1 und HopZ2 lässt sich außerdem über die Zugabe von Pflanzenextrakt steigern (Ma et al, 2006). Die Zugabe von Pflanzenextrakt zu *AvrBsT* bewirkte jedoch keine Steigerung der Proteaseaktivität, sondern sogar eine Minderung. Die Aktivitätsminderung konnte auch bei der *AvrBsT*-Mutante beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass *AvrBsT* andere Proteasen in der Pflanzenzelle zu seinen Substraten zählt und diese durch Proteolyse oder durch Bindung inaktiviert. Das *Avr*-Protein *Avr2* aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Cladosporium* bindet bspw. die Cys-Protease RCR3 aus Tomate und verhindert so die HR-Induktion (Rooney et al, 2005). Mögliche Substrate von *AvrBsT* konnten im Y2H gefunden werden. Unter den Interaktoren aus den Y2H-Sichtungen mit *AvrBsT* als Köder befand sich jedoch keine Protease. In einer Y2H-Sichtung mit dem Köder *SnRK1* wurde jedoch ein Interaktor gefunden, der auch mit *AvrBsT* interagiert. Dieser Kandidat zeigt Homologie zu einer Papain-ähnlichen Protease.

Da die AvrBsT-homologen Effektorproteine YopJ und AvrXv4 SUMO-Proteaseaktivität zeigen, könnte auch AvrBsT als SUMO-Protease wirken (Orth et al, 2000; Roden et al, 2004a). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Koexpression von c-Myc-markiertem SUMO und AvrBsT bzw. der AvrBsT-Mutante ergab jedoch kein verändertes Muster SUMO-konjugierter Proteine. Auch ein in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Andreas Bachmair (Max F. Perutz Laboratories, Wien) durchgeführter Test ob AvrBsT SUMO, Ubiquitin oder ähnliche Modifikationen von Proteinen abtrennen kann, zeigte keine Aktivität für AvrBsT (R. Szczesny, R. Hermkes, A. Bachmair und U. Bonas, unpubliziert).

Für YopJ wurde erst kürzlich eine Acetyltransferase-Aktivität beschrieben (Mukherjee et al, 2006). YopJ acetyliert die As Ser207 und Thr211 der Aktivierungsschleife der MAPKK6 und unterbindet so deren Phosphorylierung. Die Abbildung 31 verdeutlicht, dass der vermutete Mechanismus der Acetylierung von Proteinen durch YopJ dem Mechanismus der Proteolyse prinzipiell ähnlich ist (Mukherjee et al, 2007). Der Unterschied zwischen den Aktivitäten scheint also auf der Wahl der Substrate zu basieren. Ob es sich bei der proteolytischen Aktivität von AvrBsT also um einen Nebeneffekt handelt und seine Hauptfunktion in der Acetylierung von Substraten besteht, muss noch untersucht werden. Acetylierung lässt sich bspw. mittels radioaktiv markiertem Acetyl-CoA nachweisen (Mukherjee et al, 2006). Dazu müssen jedoch die Substrate, also Kinasen, bekannt sein. Ein mögliches Substrat von AvrBsT stellt somit SnRK1 dar, die bisher einzige bekannte Kinase, die mit AvrBsT interagiert.

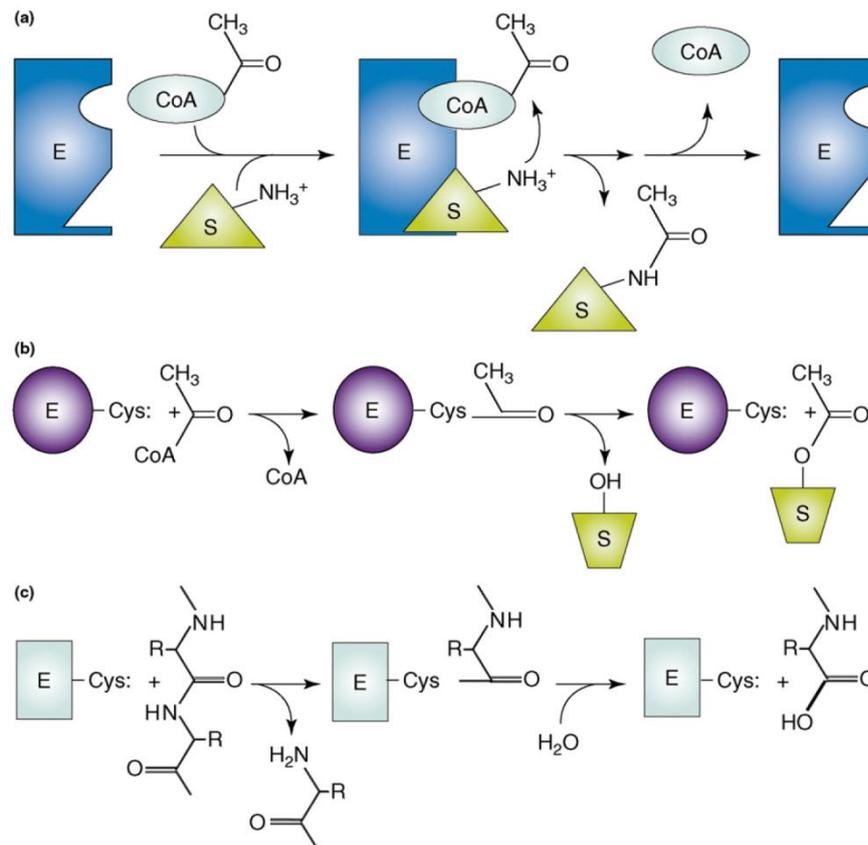


Abbildung 31: Vergleich von Acetylierung und Proteolyse.

(a) **Acetylierung im Enzym-Komplex.** Ein tertiärer Komplex bildet sich aus Enzym (E), Substrat (S) und Acetyl-CoA. Das gebundene Substrat wird für den nukleophilen Angriff des Acetyl-CoA positioniert. Nach der Acetylierung des Substrats verlässt dieses zuerst den Komplex, gefolgt vom CoA.

(b) **Acetylierung nach dem Ping-Pong-Prinzip.** Das Enzym (E) bindet Acetyl-CoA über einen katalytischen Cysteinrest, wodurch ein kovalentes Enzym-Acetyl-Intermediat unter Freisetzung von CoA gebildet wird. Das Substrat (S) bindet das Enzym-Acetyl-Intermediat, woraufhin die Acetyl-Gruppe unter Freisetzung des Enzyms auf das Substrat übertragen wird.

(c) **Proteolyse nach dem Ping-Pong-Prinzip.** Das Enzym (E) bindet ein Protein und greift mit dem katalytischen Cysteinrest eine Peptidbindung an, wodurch ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat unter Freisetzung des C-terminalen Peptidendes gebildet wird. Im Folgenden greift ein Wassermolekül das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat an und setzt das N-terminale Ende des Peptids frei.

Prinzipiell ist die Acetylierung nach dem Ping-Pong-Prinzip (b) der Proteolyse (c) mechanistisch ähnlich. Der wesentliche Unterschied besteht in den gebundenen Substraten. Die Substrate der Acetylierung sind Acetyl-CoA gefolgt von einer Hydroxylgruppe eines Ser oder Thr. Die Substrate der Proteolyse sind ein Peptid gefolgt von Wasser. Abbildung verändert nach (Mukherjee et al, 2007).

4.4 Die SnRK1, ein multifunktionaler Regulator in Pflanzen

In Y2H-Sichtungen mit dem Effektor AvrBsT als Köder wurden SnRK1-Homologe aus Tomate und aus Paprika als Interaktoren identifiziert (siehe 3.5.3). SnRK1 ist Homolog zum gut charakterisierten Protein SNF1 aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. SNF1-ähnliche Proteine kommen in Tieren und Pflanzen vor und besitzen drei konservierte Domänen: eine Ser/Thr-Kinasedomäne, eine Ubiquitin-assoziierte und eine Kinase-assoziierte Domäne. Die Aminosäuresequenzen der SNF1-homologen Proteine sind bis zu 48 % identisch, betrachtet man jedoch nur die konservierten Domänen, steigt die Identität auf 60 – 65 % (Polge & Thomas, 2007). SNF1 aus Hefe ist eine Proteinkinase, die bei niedriger Glukose-Verfügbarkeit im Medium aktiviert wird (Celenza & Carlson, 1986). *Snf1*-Hefemutanten sind ohne Glukose als Kohlenstoffquelle im Medium nicht überlebensfähig, lassen sich allerdings mit *SnRK1*-Genen aus verschiedenen Pflanzen komplementieren (Alderson et al, 1991; Bouly et al, 1999; Lovas et al, 2003; Muranaka et al, 1994).

Die SNF1-homologen Kinasen agieren im heterotrimeren Komplex, der jeweils aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht. In tierischen Zellen sind die Untereinheiten dieses Komplexes als AMPK α (AMP-aktivierte Proteinkinase), AMPK β und AMPK γ bekannt. AMPK α enthält die Ser/Thr-Kinasedomäne, ist das SNF1-Homologe und homolog zu SnRK1 aus dem SnRK1-Komplex in Pflanzen. Die erste pflanzliche SnRK1 wurde aus Roggen kloniert und erfolgreich zur Komplementation einer *snf1*-Hefemutante eingesetzt (Alderson et al, 1991).

Die Homologen der β -Untereinheit heißen in Hefe und in Pflanzen GAL83. Neben GAL83 existieren in Hefe weitere β -Untereinheiten, genannt SIP1 (SNF1 interagierendes Protein 1) und SIP2, die gegen GAL83 austauschbar sind und den Komplex vermutlich zu verschiedenen Substraten dirigieren (Yang et al, 1994). Homologe der γ -Untereinheit heißen in Hefe und in Pflanzen SNF4 (Kleinow et al, 2000). Die Interaktion von SNF4 mit SNF1 in Hefe ist abhängig vom Glukose-Gehalt des Mediums (Celenza et al, 1989). Es wird angenommen, dass SNF1 bei hohem Glukose-Spiegel durch seine Kinase-assoziierte Domäne inhibiert wird. Bei niedrigem Glukose-Spiegel interagiert SNF4 mit der Kinase-assoziierten Domäne von SNF1 und hebt dadurch die Auto-Inhibierung des Proteins auf (Jiang & Carlson, 1996).

Mehrere Klone eines GAL83-Homologen wurden in der Y2H-Sichtung mit SnRK1 als Köder aus einer Paprika-cDNA-Bibliothek (siehe Tabelle 6) isoliert. Die Interaktion von SnRK1 und GAL83 wurde ebenfalls in Kartoffel beschrieben (Lakatos et al, 1999). Dies beweist zum einen die Verlässlichkeit der Y2H-Sichtung und zum anderen, dass GAL83 auch in Paprika existiert und vermutlich zusammen mit SnRK1 und einem SNF4-Homologen einen Komplex bildet. Allerdings

scheint die Komplexbildung aus α -, β -, und γ -Untereinheit in Pflanzen komplizierter zu sein, als in Hefe. Aus *A. thaliana* und aus Mais sind SNF4-Homologe identifiziert worden, die eine *snf4*-Mutante in Hefe komplementieren können (Kleinow et al, 2000; Lumbreras et al, 2001). Jedoch sind in Interaktionsstudien mit SnRK1 auch SNF4-homologe Kandidaten aus *A. thaliana* und Gerste identifiziert worden, die zwar mit SnRK1 interagieren, die *snf4*-Mutante aber nicht komplementieren können (Bouly et al, 1999; Slocombe et al, 2002).

4.4.1 Die mögliche Regulation der SnRK1-Aktivität durch Effektoren

Über die Regulation der SnRK1 in Pflanzen ist noch wenig bekannt. Untersuchungen an Kartoffelpflanzen zeigten, dass die SnRK1-Transkriptmengen in der Pflanze gewebeabhängig unterschiedlich sind. Die Transkriptmenge ist in frühen Stolonen am höchsten, in reifenden Knollen relativ gering und am niedrigsten in Blättern (Man et al, 1997). Allerdings gibt es offenbar nur eine geringe Korrelation zwischen Transkriptmenge und Aktivität der SnRK1. Die Phosphorylierung des artifiziellen SAMS-Peptides durch SnRK1 war in winzigen Knollen ca. 40 x höher als in reifen Knollen, wohingegen die *SnRK1*-Transkriptmenge in beiden Organen ungefähr gleich groß war (Man et al, 1997). Die Reduktion des *SnRK1*-Transkriptes mittels VIGS in dieser Arbeit war allerdings ausreichend, um die SnRK1-Aktivität zu inhibieren. Wie Untersuchungen an der SnRK1 aus Spinat zeigten, wird die SnRK1-Aktivität wahrscheinlich posttranslational über die Phosphorylierung ihrer Kinasedomäne reguliert (Sugden et al, 1999).

SnRK1 wirkt vermutlich nicht autophosphorylierend, sondern wird wahrscheinlich, wie die Homologen aus Hefe und Tieren, über Kinasen phosphoryliert, die in Pflanzen bislang nicht identifiziert worden sind (Hardie & Sakamoto, 2006; Polge & Thomas, 2007; Wilson et al, 1996). Dafür spricht auch, dass die pflanzliche SnRK1 durch die tierische AMPK phosphoryliert wurde (MacKintosh et al, 1992). Die Inaktivierung der SnRK1 erfolgt über Phosphatasen (Ball et al, 1994; MacKintosh et al, 1992). Außerdem kann sie bei hohem Glukose-Spiegel durch Glukose-6-Phosphat inhibiert werden (Toroser et al, 2000).

Wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, führte VIGS des *SnRK1*-Transkriptes zu einer Reduktion der AvrBs1-HR, die phänotypisch vergleichbar mit der Suppression der HR durch AvrBsT ist. Deshalb wurde untersucht, ob in An- oder Abwesenheit der Effektoren AvrBs1 und AvrBsT Veränderungen in der *SnRK1*-Transkriptmenge oder der SnRK1-Proteinmenge auftreten. Dadurch könnten Rückschlüsse auf eine Effektor-bedingte Regulation der SnRK1 gezogen werden. Die Quantifizierung des *SnRK1*-Transkriptes nach Expression von *avrBs1*, *avrBsT* und *avrBsT_{C222A}* in resistenten Paprikapflanzen (siehe Abbildung 28) ergab keine eindeutigen

Resultate, da in den verschiedenen Experimenten eine unregelmäßige Reduktion beobachtet wurde. Da die Unregelmäßigkeiten mit der HR-Induktion von AvrBs1 und AvrBsT zusammenhängen könnte, wurden die Experimente in suszeptiblen Tomatenpflanzen wiederholt. Im Vergleich zur Leervektorkontrolle führte die Expression von avrBs1, avrBsT oder avrBsT_{C222A} jeweils zu einer Reduktion des *SnRK1*-Transkriptes um ca. 20 – 25 %. In Tomate ist deshalb nicht von einem Effektor-spezifischen Einfluss auf das *SnRK1*-Transkript auszugehen.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der SnRK1 könnte indirekt über Primärmetaboliten erfolgen. So wurde gezeigt, dass die SnRK1-Aktivität in Spinat von Glukose-6-Phosphat (G6P) inhibiert werden kann (Toroser et al, 2000). Es wurden erste Untersuchungen zur Änderung von Primärmetaboliten in Paprikapflanzen nach Infektion mit *Xcv* mit und ohne *avrBs1* durchgeführt (R. Szczesny, A. Fernie und U. Bonas, unveröffentlicht). Ein Vergleich der Primärmetaboliten in Paprikablättern aus zwei unabhängigen Experimenten zeigte eine 15fache Reduktion der G6P in Anwesenheit von AvrBs1. Diese Änderung scheint unabhängig von der Anwesenheit von AvrBsT zu sein (R. Szczesny, A. Fernie und U. Bonas, unveröffentlicht). Es ist möglich, dass AvrBs1 die G6P herunterreguliert und dadurch eine G6P-bedingte Hemmung des SnRK1-Proteins aufgehoben wird. Vielleicht schaltet SnRK1 nach seiner Derepression in Blättern AvrBs1-resistenter Pflanzen direkt oder indirekt Abwehrgene an. In Anwesenheit von AvrBsT würde die SnRK1 und damit die Induktion dieser Gene erneut gehemmt. Ein möglicherweise geändertes pflanzliches Transkriptionsprofil könnte mittels Microarray analysiert werden.

4.4.2 Die Rolle der SnRK1 bei abiotischem Stress

Mittels Microarray-Experimenten in *A. thaliana* nach Applikation verschiedener Stressoren wurden überlappende Sets von induzierten Genen identifiziert, die auch von SnRK1 induziert werden (Baena-González et al, 2007; Kilian et al, 2007; Ma & Bohnert, 2007; Walley et al, 2007). Möglicherweise ist die SnRK1 nicht nur an der Zucker- sondern an multiplen Stressantworten beteiligt.

Eines dieser SnRK1-induzierten Gene ist bspw. RSH2 (RelA/SpoT-Homolog) aus *A. thaliana*. RSH synthetisieren Guanosin-3',5'-bis-Pyrophosphat (ppGpp), ein Signalmolekül der „stringent response“, einer schnellen Antwort von pro- und eukaryotischen Zellen auf bestimmte Stresssituationen. Die „stringent response“ in Bakterien äußert sich in erhöhter Stresstoleranz, vermindertem Wachstum und verlangsamtem Stoffwechsel (Dozot et al, 2006). In Pflanzen wurde ppGpp mit ähnlichen Funktionen wie in Bakterien gefunden (Takahashi et al, 2004; Van

der Biezen et al, 2000). Interessanterweise wurde bei der Y2H-Sichtung der Paprika-Bibliothek mit SnRK1 als Köder RSH2 als Interaktor identifiziert (siehe Tabelle 6).

Unter den SnRK1-induzierten Genen aus *A. thaliana* befindet sich eine Reihe von Zn-Finger-Transkriptionsfaktoren (Baena-González et al, 2007). Auch in dieser Arbeit wurden Transkriptionsfaktoren der Zn-Finger-Familie als Interaktoren der SnRK1 identifiziert (Tabelle 6). Einer der induzierten Transkriptionsfaktoren, AZF2 (*Arabidopsis*-Zink-Finger-Protein 2), ist neben der Stressantwort auf Kälte, Salz und Trockenheit auch an der Pathogen-Abwehr beteiligt (Pauwels et al, 2008; Sakamoto et al, 2004). SnRK1 scheint also nicht nur an abiotischen, sondern auch an der biotischen Stressantwort beteiligt zu sein.

4.4.3 Die Rolle der SnRK1 bei biotischem Stress

Es gibt bisher nur wenige Beispiele für eine Beteiligung der SnRK1 an Pathogen-vermittelten Abwehrreaktionen, z. B. gegen die Geminiviren „tomato golden mosaic virus“ (TGMV) und „beet curly top virus“ (BCTV). Die Proteine AL2 des TGMV und L2 des BCTV sind Pathogenitätsfaktoren, die zur erhöhten Suszeptibilität von *N. benthamiana* und *N. tabacum* gegenüber TGMV und BCTV beitragen (Sunter et al, 2001). In Y2H-Analysen wurde AKIN11, ein SnRK1-Homolog aus *A. thaliana*, als Interaktionspartner von AL2 und L2 identifiziert (Hao et al, 2003). Erhöhte Suszeptibilität konnte auch in transgenen *N. benthamiana* beobachtet werden, die ein antisense *SnRK1*-Konstrukt exprimierten. *SnRK1*-überexprimierende Pflanzen waren hingegen resistenter gegen TGMV und BCTV (Hao et al, 2003). In diesem Beispiel war die Bindung der Virusproteine an SnRK1 der entscheidende Schritt: Virusproteine, die im SnRK1-Bindemotiv mutiert sind, ermöglichten keine Erhöhung der Suszeptibilität (Hao et al, 2003). Allerdings reicht im Fall von AvrBsT und SnRK1 eine Interaktion beider Proteine nicht aus, um die AvrBs1-induzierte HR zu supprimieren. Denn obwohl die AvrBsT-Mutante im Hefesystem und im BiFC mit der SnRK1 interagiert (siehe Tabelle 5 und Kapitel 3.7.3), ist sie nicht in der Lage, die AvrBs1-HR zu supprimieren (siehe 3.3). Erst kürzlich wurde *SnRK1* als Pathogen-induziertes Gen in *Citrus* spp. nach Applikation von *X. axonopodis*, dem bakteriellen Erreger des Zitruskrebses, identifiziert (Cernadas et al, 2008).

Auch andere Komponenten des SnRK1-Komplexes könnten an einer Resistenzantwort beteiligt sein. So interagiert bspw. die chimäre Untereinheit AKIN $\beta\gamma$ (ein SNF4-Homolog aus Mais) mit zwei Proteinen, die Homologie zum Nematoden-Resistenzprotein HS1 aus Rübe (*Beta vulgaris*) zeigen (Gissot et al, 2006).

Eine interessante Möglichkeit der Verknüpfung unterschiedlicher Signalwege bietet die bioinformatische Analyse mittels „*Arabidopsis*-Interaktionen-Betrachter“ („*Arabidopsis* interaction viewer“) (Geisler-Lee et al, 2007). Ein Set von Pathogen-induzierten Pflanzengen wurde in der Interaktion des Pilzes *Fusarium virguliforme* mit *A. thaliana* identifiziert (Yuan et al, 2008). Aus diesen Genen wurden bioinformatisch mittels MAPMAN Gruppen von Signalwegen generiert (Thimm et al, 2004; Yuan et al, 2008). Eine dieser Gruppen wurde der Signaltransduktion zugeordnet und enthält als zentrale Elemente neben den MAP-Kinasen 2 und 3 auch SnRK1 (Yuan et al, 2008). Einige Homologe der Gene, die durch SnRK1 induziert worden sind, wurden auch in unserer Y2H-Sichtung mit SnRK1 als Köder gefunden. Dazu gehören ATPasen, Zn-Finger-Proteine und „HUA ENHANCER 3“. Die Induktion von Ubiquitin-assoziierten Genen und SUMO stellt eine Verbindung zum Proteasom und zu AvrBsT her.

Unbeantwortet ist noch die wichtige Frage, wie AvrBsT die SnRK1-Aktivität beeinflusst. Die bisherigen Experimente gaben keine Hinweise auf einen Abbau des SnRK1-Proteins durch AvrBsT, obwohl AvrBsT Proteaseaktivität besitzt. Ebenfalls konnte keine AvrBsT-spezifische Reduktion des SnRK1-Transkriptes beobachtet werden. Eine mögliche Modifizierung der SnRK1 durch AvrBsT unterliegt womöglich einem anderen Mechanismus. In zukünftigen Experimenten sollte der Phosphorylierungsstatus der SnRK1 aus Paprika in Anwesenheit von AvrBsT bzw. AvrBsT_{C222A} untersucht werden. Es wäre denkbar, dass AvrBsT als Acetyltransferase wirken kann, wie es für das homologe Protein YopJ aus *Yersinia* beschrieben wurde (Mukherjee et al, 2006).

YopJ bindet MAPK und inhibiert deren Phosphorylierung durch vorherige Acetylierung (Mukherjee et al, 2006; Orth et al, 1999). In den Y2H-Sichtungen mit AvrBsT als Köder wurde keine Kinase aus dem MAPK-Kaskadeweg als Interaktionspartner identifiziert. Tatsächlich ist die SnRK1 die einzige Kinase, die in diesen Sichtungen gefunden wurde. Die Abbildung 32 zeigt ein vereinfachtes Modell der möglichen Interaktion von SnRK1, AvrBs1 und AvrBsT unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus publizierten Microarray-Daten, Interaktionsstudien und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise verhindert AvrBsT die Aktivierung der SnRK1, indem es die Kinase acetyliert.

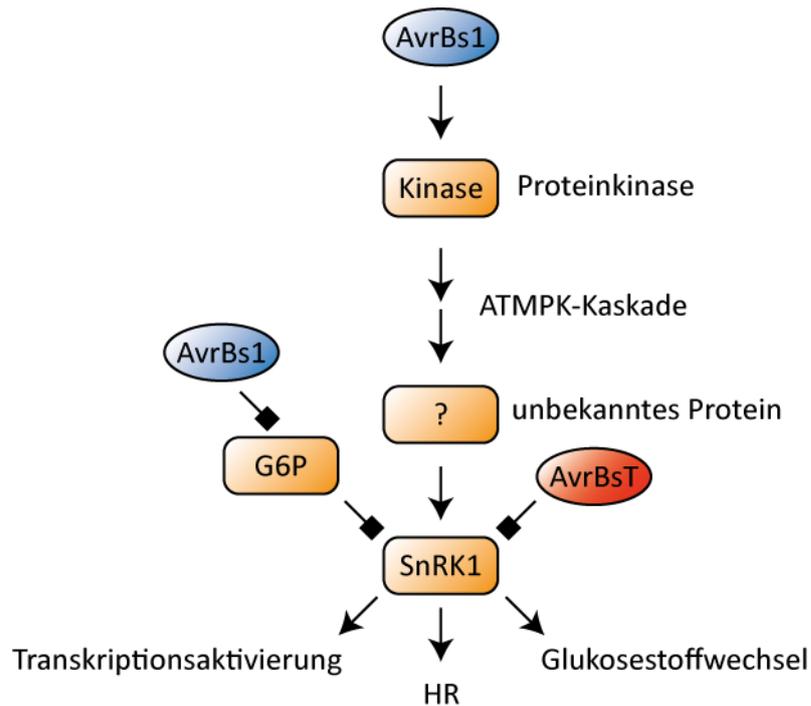


Abbildung 32: Modell einer möglichen SnRK1-Signalkaskade.

Nach Pathogenbefall erfolgt die Signalleitung über verschiedene unbekannte Proteinkinasen bis hin zu SnRK1, dem generellen Regulator der Stressantwort. SnRK1 moduliert den Glukose-Stoffwechsel, interagiert aber auch mit Proteinen, die an der Resistenzantwort beteiligt sind. Möglicherweise induziert SnRK1 direkt oder indirekt weitere Gene der generellen und Pathogen-assoziierten Stressantwort. AvrBs1 hemmt Glukose-6-Phosphat (G6P), wodurch die Hemmung der SnRK1 aufgehoben wird und die Gene der Stressantwort induziert werden können. AvrBsT greift möglicherweise durch Acetylierung des Proteins in die Aktivierung der SnRK1 ein und unterbindet so die Resistenzantwort auf AvrBs1.

Die vorliegende Arbeit erbrachte neue Erkenntnisse über die Lokalisierung bakterieller Effektorproteine in Pflanzenzellen. In Kombination mit den isolierten Interaktionspartnern der Effektoren lassen sich Modelle ihrer Wirkungsweise in Pflanzen erstellen. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung der Virulenzfunktion von AvrBsT: die Suppression der AvrBs1-vermittelten HR. In Hefe-Interaktionsstudien wurden verschiedene interagierende Proteine identifiziert, von denen einige Virulenzziele sein könnten. Ein Virulenzziel von AvrBsT ist die Ser/Thr-Kinase SnRK1, die eine entscheidende Rolle in der Induktion der AvrBs1-HR spielt. Auch wenn der Mechanismus der Modifikation der SnRK1 durch AvrBsT noch unklar ist, bereiten die neuen Erkenntnisse den Weg für weitere Experimente.

Literaturverzeichnis

- Abramovitch R. B., Janjusevic R., Stebbins C. E. and Martin G. B. (2006) Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2851-2856
- Abramovitch R. B., Kim Y.-J., Chen S., Dickman M. B. and Martin G. B. (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **22**(1): 60-69
- Agrios G. N. (2005) *Plant Pathology*: Academic Press.
- Alderson A., Sabelli P. A., Dickinson J. R., Cole D., Richardson M., Kreis M., Shewry P. R. and Halford N. G. (1991) Complementation of *snf1*, a Mutation Affecting Global Regulation of Carbon Metabolism in Yeast, by a Plant Protein Kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8602-8605
- Alfano J. R. and Collmer A. (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell* **8**(10): 1683-1698
- Alfano J. R. and Collmer A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* **179**(18): 5655-5662
- Alfano J. R. and Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414
- Alvarez A. M. (2000) Black rot of crucifers. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*: 21-52
- Anderson D. M., Fouts D. E., Collmer A. and Schneewind O. (1999) Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12839-12843
- Anderson D. M. and Schneewind O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science (Wash D C)* **278**(5340): 1140-1143
- Angot A., Peeters N., Lechner E., Vailleau F., Baud C., Gentzbittel L., Sartorel E., Genschik P., Boucher C. and Genin S. (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(39): 14620-14625
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W.-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M. and Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**(6875): 977-983
- Astua-Monge G., Minsavage G. V., Stall R. E., Davis M. J., Bonas U. and Jones J. B. (2000a) Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

- is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**(9): 911-921
- Astua-Monge G., Minsavage G. V., Stall R. E., Vallejos C. E., Davis M. J. and Jones J. B. (2000b) *Xv4-avrXv4*: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**(12): 1346-1355
- Ausubel F. M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**: 973-979
- 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**(6): 1537-1546
- Badel J. L., Nomura K., Bandyopadhyay S., Shimizu R., Collmer A. and He S. Y. (2003) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Mol Microbiol* **49**(5): 1239-1251
- Badel J. L., Shimizu R., Oh H. S. and Collmer A. (2006) A *Pseudomonas syringae* pv. tomato *avrE1/hopM1* Mutant Is Severely Reduced in Growth and Lesion Formation in Tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**(2): 99-111
- Baena-González E., Rolland F., Thevelein J. M. and Sheen J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature (Lond)* **448**(7156): 938-942
- Bai J., Choi S.-H., Ponciano G., Leung H. and Leach J. E. (2000) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**(12): 1322-1329
- Ball K. L., Dale S., Weekes J. and Hardie D. G. (1994) Biochemical characterization of two forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase from cauliflower (*Brassica oleracea*). *Eur J Biochem* **219**(3): 743-750
- Bell K. S., Sebahia M., Pritchard L., Holden M. T., Hyman L. J., Holeva M. C., Thomson N. R., Bentley S. D., Churcher L. J., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M. A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G. P., Birch P. R., Parkhill J. and Toth I. K. (2004) Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(30): 11105-11110
- Berger C., Krüger A., Weber E. and Koebnik R. (2006) Das Typ III-Sekretionssystem von *Xanthomonas*. *Biospektrum* **12**(6): 592

- 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**: 12
- Bieber D., Ramer S. W., Wu C. Y., Murray W. J., Tobe T., Fernandez R. and Schoolnik G. K. (1998) Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**(5372): 2114
- Biffen R. H. (1905) Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *The Journal of Agricultural Science* **1**: 1-48
- Binet R., L  toff   S., Ghigo J. M., Delepelaire P. and Wandersman C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene* **192**(1): 7-11
- Bittel P. and Robatzek S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **10**(4): 335-341
- Bogdanove A. J., Beer S. V., Bonas U., Boucher C. A., Collmer A., Coplin D. L., Cornelis G. R., Huang H. C., Hutcheson S. W., Panopoulos N. J. and Van Gijsegem F. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**(3): 681-683
- Bologna G., Yvon C., Duvaud S. and Veuthey A. L. (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics* **4**(6): 1626-1632
- 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*. *Molecular & General Genetics* **238**(1-2): 261-269
- Bonas U., Schulte R., Fenselau S., Minsavage G. V., Staskawicz B. J. and Stall R. E. (1991) Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas-campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**(1): 81-88
- Bonas U., Stall R. E. and Staskawicz B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular & General Genetics* **218**(1): 127-136
- Bonshtien A., Lev A., Gibly A., Debbie P., Avni A. and Sessa G. (2005) Molecular properties of the *Xanthomonas AvrRxv* effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**(4): 300-310
- Bouly J. P., Gissot L., Lessard P., Kreis M. and Thomas M. (1999) Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINa1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J* **18**(5): 541-550
- Bradford K. J., Downie A. B., Gee O. H., Alvarado V., Yang H. and Dahal P. (2003) Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol* **132**(3): 1560-1576

- Bretz J. R., Mock N. M., Charity J. C., Zeyad S., Baker C. J. and Hutcheson S. W. (2003) A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol Microbiol* **49**(2): 389-400
- Brown I., Mansfield J. and Bonas U. (1995) *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**(6): 825-836
- Buell C. R., Joardar V., Lindeberg M., Selengut J., Paulsen I. T., Gwinn M. L., Dodson R. J., Deboy R. T., Durkin A. S., Kolonay J. F., Madupu R., Daugherty S., Brinkac L., Beanan M. J., Haft D. H., Nelson W. C., Davidsen T., Zafar N., Zhou L., Liu J., Yuan Q., Khouri H., Fedorova N., Tran B., Russell D., Berry K., Utterback T., Van Aken S. E., Feldblyum T. V., D'Ascenzo M., Deng W. L., Ramos A. R., Alfano J. R., Cartinhour S., Chatterjee A. K., Delaney T. P., Lazarowitz S. G., Martin G. B., Schneider D. J., Tang X., Bender C. L., White O., Fraser C. M. and Collmer A. (2003) The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10181-10186
- Burch-Smith T. M., Anderson J. C., Martin G. B. and Dinesh-Kumar S. P. (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* **39**(5): 734-746
- Bustin S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-193
- Büttner D. and Bonas U. (2002) Port of entry – the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* **10**(4): 186-192
- Büttner D. and Bonas U. (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9**(2): 193-200
- Büttner D., Gürlebeck D., Noël L. D. and Bonas U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* **54**(3): 755-768
- Büttner D., Lorenz C., Weber E. and Bonas U. (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **59**(2): 513-527
- Büttner D., Noël L., Thieme F. and Bonas U. (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J Biotechnol* **106**(2-3): 203-214
- Canteros B., Minsavage G., Bonas U., Pring D. and Stall R. (1991) A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**(6): 628-632

- Cascales E. and Christie P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**(2): 137-149
- Celenza J. L. and Carlson M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* **233**(4769): 1175-1180
- Celenza J. L., Eng F. J. and Carlson M. (1989) Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol* **9**(11): 5045-5054
- Cernadas R. A., Rodrigues L., Celso C. and Benedetti E. (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol Plant Pathol* **9**(5): 609-631
- Champion A., Picaud A. and Henry Y. (2004) Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci* **9**(3): 123-129
- Chang J. H., Urbach J. M., Law T. F., Arnold L. W., Hu A., Gombar S., Grant S. R., Ausubel F. M. and Dangel J. L. (2005) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7): 2549-2554
- Chesnokova O., Coutinho J. B., Khan I. H., Mikhail M. S. and Kado C. I. (1997) Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Mol Microbiol* **23**(3): 579-590
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B. J. (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**(4): 803-814
- Chuang S.-M., Chen L., Lambertson D., Anand M., Kinzy T. G. and Madura K. (2005) Proteasome-Mediated Degradation of Cotranslationally Damaged Proteins Involves Translation Elongation Factor 1A. *Mol Cell Biol* **25**(1): 403-413
- Ciesiolka L. D., Hwin T., Gearlds J. D., Minsavage G. V., Saenz R., Bravo M., Handley V., Conover S. M., Zhang H., Caporgno J., Phengrasamy N. B., Toms A. O., Stall R. E. and Whalen M. C. (1999) Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**(1): 35-44
- Collmer A., Lindeberg M., Petnicki-Ocwieja T., Schneider D. and Alfano J. (2002) Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol* **10**(10): 462-469
- Coplin D. L. and Cook D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**(5): 271-279
- Cornelis G. R. and Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**(1): 735-774

- 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**(1): 115-128
- Cunnac S., Wilson A., Nuwer J., Kirik A., Baranage G. and Mudgett M. B. (2007) A conserved carboxylesterase is a SUPPRESSOR OF AVRBT-ELICITED RESISTANCE in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**(2): 688-705
- Da Silva A. C. R., Ferro J. A., Reinach F. C., Farah C. S., Furlan L. R., Quaggio R. B., Monteiro-Vitorello C. B., Sluys M. A. V., Almeida N. F., Alves L. M. C., Amaral A. M. d., Bertolini M. C., Camargo L. E. A., Camarotte G., Cannavan F., Cardozo J., Chambergo F., Ciapina L. P., Cicarelli R. M. B., Coutinho L. L., Cursino-Santos J. R., El-Dorry H., Faria J. B., Ferreira A. J. S., Ferreira R. C. C., Ferro M. I. T., Formighieri E. F., Franco M. C., Greggio C. C., Gruber A., Katsuyama A. M., Kishi L. T., Leite R. P., Lemos E. G. M., Lemos M. V. F., Locali E. C., Machado M. A., Madeira A. M. B. N., Martinez-Rossi N. M., Martins E. C., Meidanis J., Menck C. F. M., Miyaki C. Y., Moon D. H., Moreira L. M., Novo M. T. M., Okura V. K., Oliveira M. C., Oliveira V. R., Pereira H. A., Rossi A., Sena J. A. D., Silva C., Souza R. F. d., Spinola L. A. F., Takita M. A., Tamura R. E., Teixeira E. C., Tezza R. I. D., Santos M. T. d., Truffi D., Tsai S. M., White F. F., Setubal J. C. and Kitajima J. P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**(6887): 459-465
- Dahlbeck D. and Stall R. E. (1979) Mutations for change of race in cultures of *Xanthomonas vesicatoria* [on pepper cultivars]. *Phytopathology* **69**(6): 634-636
- Dangl J. L. and Jones J. D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**(6839): 826-833
- Daniels M. J., Chaumont F., Mirkov T. E. and Chrispeels M. J. (1996) Characterization of a New Vacuolar Membrane Aquaporin Sensitive to Mercury at a Unique Site. *Plant Cell* **8**(4): 587-599
- de Torres M., Mansfield J. W., Grabov N., Brown I. R., Ammouneh 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**(3): 368-382
- DebRoy S., Thilmony R., Kwack Y. B., Nomura K. and He S. Y. (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9927-9932
- Delepelaire P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *BBA-Molecular Cell Research* **1694**(1-3): 149-161
- Denny T. P. and Baek S. R. (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 198-206

- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D. X., Khounlotham 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 U S A* **100**(13): 8024-8029
- DeYoung B. J. and Innes R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* **7**: 1243-1249
- Ding J., McGrath W. J., Sweet R. M. and Mangel W. F. (1996) Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **15**(8): 1778
- Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U. and Hacker J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**(5): 414-424
- Dow J. M., Osbourn A. E., Wilson T. J. G. and Daniels M. J. (1995) A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**(5): 768-777
- Dozot M., Boigegrain R. A., Delrue R. M., Hallez R., Ouahrani-Bettache S., Danese I., Letesson J. J., De Bolle X. and Kohler S. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell Microbiol* **8**(11): 1791-1802
- Eisenhaber F., Eisenhaber B., Kubina W., Maurer-Stroh S., Neuberger G., Schneider G. and Wildpaner M. (2003) Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-[PI], NMT and PTS1. Article. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3631-3634
- Escolar L., Van Den Ackerveken G., Pieplow S., Rossier O. and Bonas U. (2001) Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol* **2**(5): 287-296
- Espinosa A., Guo M., Tam V. C., Fu Z. Q. and Alfano J. R. (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol* **49**(2): 377-387
- Eulgem T., Rushton P. J., Schmelzer E., Hahlbrock K. and Somssich I. E. (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **18**(17): 4689-4699
- Eulgem T. and Somssich I. E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* **10**(4): 366-371
- Farazi T. A., Waksman G. and Gordon J. I. (2001) The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. ASBMB, Vol. 276, pp. 39501-39504.

- Farras R., Ferrando A., Jasik J., Kleinow T., Okresz L., Tiburcio A., Salchert K., del Pozo C., Schell J. and Koncz C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J* **20**(11): 2742-2756
- Felix G. and Boller T. (2003) Molecular Sensing of Bacteria in Plants THE HIGHLY CONSERVED RNA-BINDING MOTIF RNP-1 OF BACTERIAL COLD SHOCK PROTEINS IS RECOGNIZED AS AN ELICITOR SIGNAL IN TOBACCO. *J Biol Chem* **278**(8): 6201-6208
- Felix G., Duran J. D., Volko S. and Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**(3): 265-276
- Flor H. H. (1955) Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680-685
- Flor H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296
- Fritig B., Heitz T. and Legrand M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* **10**(1): 16-22
- Fujikawa T., Ishihara H., Leach J. E. and Tsuyumu S. (2006) Suppression of defense response in plants by the avrBs3/pthA gene family of Xanthomonas spp. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**(3): 342-349
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D. and Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*: 571-607
- Gaudriault S., Paulin J. P. and Barny M. A. (2002) The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Mol Plant Pathol* **3**(5): 313-320
- Geisler-Lee J., O'Toole N., Ammar R., Provart N. J., Millar A. H. and Geisler M. (2007) A Predicted Interactome for Arabidopsis. *Plant Physiology* **145**(2): 317
- Ghosh P. (2004) Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 771-795
- Gissot L., Polge C., Jossier M., Girin T., Bouly J. P., Kreis M. and Thomas M. (2006) AKINbeta {gamma} Contributes to SnRK1 Heterotrimeric Complexes and Interacts with Two Proteins Implicated in Plant Pathogen Resistance through Its KIS/GBD Sequence. *Plant Physiol (Rockv)* **142**(3): 931
- Goldman R. D., Gruenbaum Y., Moir R. D., Shumaker D. K. and Spann T. P. (2002) Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* **16**(5): 533-547
- Gómez-Gómez L. and Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**(6): 251-256
- Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**(3): 277-284

- Goode M. J. and Sasser M. (1980) Prevention-the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Dis* **64**: 831-834
- Graham J. H., Gottwald T. R., Cubero J. and Achor D. S. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol* **5**(1): 1-15
- Greenberg J. and Vinatzer B. (2003) Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr Opin Microbiol* **6**(1): 20-28
- Greenberg J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**(1): 525-545
- Greenberg J. T., Guo A., Klessig D. F. and Ausubel F. M. (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551-563
- Gürlebeck D., Jahn S., Gürlebeck N., Szczesny R., Szurek B., Hahn S., Hause G. and Bonas U. (2008) Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4. *Mol Plant Pathol* **Published Online: Nov 2008**
- Hann D. R. and Rathjen J. P. (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **49**(4): 607-618
- Hao L., Wang H., Sunter G. and Bisaro D. M. (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* **15**(4): 1034-1048
- Hardie D. G. (1999) PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**(1): 97-131
- Hardie D. G. and Sakamoto K. (2006) AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology* **21**(1): 48-60
- Harmer S. L., Hogenesch J. B., Straume M., Chang H. S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J. A. and Kay S. A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science (Wash D C)* **290**(5499): 2110-2113
- Hauck P., Thilmony R. and He S. Y. (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(14): 8577-8582
- 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**(6): 1385-1396
- He S. Y., Nomura K. and Whittam T. S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *BBA-Molecular Cell Research* **1694**(1-3): 181-206
- Heesemann J., Algermissen B. and Laufs R. (1984) Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **46**(1): 105-110
- Holland I. B., Schmitt L. and Young J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Mol Membr Biol* **22**(1): 29-39

- Hotson A., Chosed R., Shu H., Orth K. and Mudgett M. B. (2003) Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol* **50**(2): 377-389
- 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**(4): 789-798
- Huguet E., Hahn K., Wengelnik K. and Bonas U. (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* **29**(6): 1379-1390
- Jakobek J. L., Smith J. A. and Lindgren P. B. (1993) Suppression of Bean Defense Responses by *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell Online* **5**(1): 57-63
- Jamir Y., Guo M., Oh H. S., Petnicki-Ocwieja T., Chen S., Tang X., Dickman M. B., Collmer A. and Alfano J. R. (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* **37**(4): 554-565
- Janjusevic R., Abramovitch R. B., Martin G. B. and Stebbins C. E. (2006) A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase. *Science* **311**(5758): 222-226
- Jauh G. Y., Fischer A. M., Grimes H. D., Ryan C. A., Jr. and Rogers J. C. (1998) delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 12995-12999
- Jiang R. and Carlson M. (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes and Development* **10**(24): 3105
- Jin H., Axtell M., Dahlbeck D., Ekwenna O., Zhang S., Staskawicz B. and Baker B. (2002) NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev Cell* **3**(2): 291
- Johnson R. (1983) Genetic background of durable resistance.
- Johnson T. L., Abendroth J., Hol W. G. J. and Sandkvist M. (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* **255**(2): 175-186
- 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**(6): 755-762
- Jones J. D. G. and Dangl J. L. (2006) The plant immune system. *Nature (Lond)* **444**(7117): 323
- Jyomoto T., Azuma M., Islam N. N., Fujinami R., Takao T., Ogawa T., Tabuchi M., Igarashi K., Kato J. and Ooshima H. (2006) Purification and characterization of enzyme responsible for N-myristoylation of octapeptide in aqueous solution without ATP and coenzyme a from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biosci Bioeng* **102**(3): 193-197

- Kang Y., Liu H., Genin S., Schell M. A. and Denny T. P. (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* **46**(2): 427-437
- Kao C. C., Barlow E. and Sequeira L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **174**(3): 1068-1071
- Karpova T. S., Baumann C. T., He L., Wu X., Grammer A., Lipsky P., Hager G. L. and McNally J. G. (2003) Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc (Oxf)* **209**(Pt 1): 56-70
- 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**(5850): 648-651
- Kearney B. and Staskawicz B. J. (1990a) Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J Bacteriol* **172**(1): 143-148
- Kearney B. and Staskawicz B. J. (1990b) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene, *avrBs2*. *Nature (Lond)* **346**: 385-386
- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. and Harter K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* **50**(2): 347-363
- Kim J. G., Taylor K. W., Hotson A., Keegan M., Schmelz E. A. and Mudgett M. B. (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in xanthomonas-infected tomato leaves. *Plant Cell* **20**(7): 1915-1929
- Kim M. G., da Cunha L., McFall A. J., Belkhadir Y., DebRoy S., Dangl J. L. and Mackey D. (2005) Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**(5): 749-759
- Kleinow T., Bhalerao R., Breuer F., Umeda M., Salchert K. and Koncz C. (2000) Functional identification of an *Arabidopsis* Snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant J* **23**(1): 115-122
- Kniskern J. M., Traw M. B. and Bergelson J. (2007) Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**(12): 1512-1522
- Koebnik R. (2001) The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol* **9**(12): 586-590
- Koebnik R., Krüger A., Thieme F., Urban A. and Bonas U. (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol* **188**(21): 7652-7660

- Kunkel B. N. and Chen Z. (2006) Virulence Strategies of Plant Pathogenic Bacteria. *Prokaryotes* **2**: 421-440
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. and Felix G. (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell* **16**(12): 3496
- Lakatos L., Klein M., Hofgen R. and Banfalvi Z. (1999) Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J* **17**(5): 569-574
- Lee J., Klessig D. F. and Nürnberger T. (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* **13**(5): 1079-1093
- Lewis J. D., Abada W., Ma W., Guttman D. S. and Desveaux D. (2008) The HopZ Family of *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Require Myristoylation for Virulence and Avirulence Functions in *Arabidopsis thaliana*?†. *J Bacteriol* **190**(8): 2880-2891
- Li H., Xu H., Zhou Y., Zhang J., Long C., Li S., Chen S., Zhou J. M. and Shao F. (2007) The Phosphothreonine Lyase Activity of a Bacterial Type III Effector Family. *Science's STKE* **315**(5814): 1000
- Li S. J. and Hochstrasser M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**(6724): 246-251
- Lindeberg M., Cartinhour S., Myers C. R., Schechter L. M., Schneider D. J. and Collmer A. (2006) Closing the Circle on the Discovery of Genes Encoding Hrp Regulon Members and Type III Secretion System Effectors in the Genomes of Three Model *Pseudomonas syringae* Strains. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**(11): 1151-1158
- Lindeberg M., Stavrinides J., Chang J. H., Alfano J. R., Collmer A., Dangl J. L., Greenberg J. T., Mansfield J. W. and Guttman D. S. (2005) Proposed Guidelines for a Unified Nomenclature and Phylogenetic Analysis of Type III Hop Effector Proteins in the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**(4): 275-282
- Linder M. E. and Deschenes R. J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 74
- Lindgren P. B., Peet R. C. and Panopoulos N. J. (1986) Gene-cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol* **168**(2): 512-522
- Lindow S. E. and Brandl M. T. (2003) Microbiology of the Phyllosphere. Am Soc Microbiol, Vol. 69, pp. 1875-1883.

- Liu H., Kang Y., Genin S., Schell M. A. and Denny T. P. (2001) Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Soc General Microbiol*, Vol. 147, pp. 3215-3229.
- Liu Y., Schiff M. and Dinesh-Kumar S. P. (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**(6): 777-786
- Lopez-Solanilla E., Bronstein P. A., Schneider A. R. and Collmer A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol* **54**(2): 353-365
- Lorenz C., Kirchner O., Egler M., Stuttmann J., Bonas U. and Büttner D. (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol*
- Losada L. C. and Hutcheson S. W. (2005) Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol* **55**(3): 941-953
- Lovas Á., Sós-Hegedus A., Bimbó A. and Bánfalvi Z. (2003) Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **321**: 123-129
- Lumbreras V., Alba M. M., Kleinow T., Koncz C. and Pages M. (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep* **2**(1): 55-60
- Ma S. and Bohnert H. J. (2007) Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biol* **8**(4): R49
- Ma W., Dong F. F., Stavrinides J. and Guttman D. S. (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet* **2**(12): e209
- 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**(3): 379-489
- 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**(6): 743-754
- MacKintosh R. W., Davies S. P., Clarke P. R., Weekes J., Gillespie J. G., Gibb B. J. and Hardie D. G. (1992) Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. *Eur J Biochem* **209**(3): 923-931
- 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**(1): 146-157
- Man A. L., Purcell P. C., Hannappel U. and Halford N. G. (1997) Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements. *Plant Mol Biol* **34**(1): 31-43

- Mann M. and Jensen O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**(3): 255-261
- Marco G. M. and Stall R. E. (1983) Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitive to copper. *Plant Dis* **67**(7): 779-781
- 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**(7): 637-646
- Maurer-Stroh S., Eisenhaber B. and Eisenhaber F. (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* **317**(4): 541-557
- Maurer-Stroh S. and Eisenhaber F. (2004) Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends Microbiol* **12**(4): 178-185
- McInnes T. B., Gitaitis R. D., McCarter S. M., Jaworski C. A. and Phatak S. C. (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Dis* **72**(7): 575-579
- Metz M., Dahlbeck D., Morales C. Q., Al Sady B., Clark E. T. and Staskawicz B. J. (2005) The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **41**(6): 801-814
- Meyer A., Pühler A. and Niehaus K. (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**(2): 214-222
- Mindrinis M., Katagiri F., Yu G. L. and Ausubel F. M. (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**(6): 1089-1099
- 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**(1): 41-47
- Morales C. Q., Posada J., Macneale E., Franklin D., Rivas I., Bravo M., Minsavage J., Stall R. E. and Whalen M. C. (2005) Functional Analysis of the Early Chlorosis Factor Gene. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**(5): 477-486
- Morrison D. F., O'Brien P. J. and Pepperberg D. R. (1991) Depalmitoylation with hydroxylamine alters the functional properties of rhodopsin. *J Biol Chem* **266**(30): 20118-20123
- Mudgett M. B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 509-531
- Mudgett M. B., Chesnokova O., Dahlbeck D., Clark E. T., Rossier O., Bonas U. and Staskawicz B. J. (2000) Molecular signals required for type III secretion and translocation of the

- Xanthomonas campestris AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13324-13329
- Mukherjee S., Hao Y. H. and Orth K. (2007) A newly discovered post-translational modification-- the acetylation of serine and threonine residues. *Trends Biochem Sci* **32**(5): 210-216
- Mukherjee S., Keitany G., Li Y., Wang Y., Ball H. L., Goldsmith E. J. and Orth K. (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**(5777): 1211-1214
- Muller P. Y., Janovjak H., Miserez A. R. and Dobbie Z. (2002) Short Technical Report Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. *BioTechniques* **32**(6)
- Müller S., Hoeghe C., Pyrowolakis G. and Jentsch S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-210
- Muranaka T., Banno H. and Machida Y. (1994) Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**(5): 2958-2965
- Newman M.-A., Roepenack-Lahaye E. v., Parr A., Daniels M. J. and Dow J. M. (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* **29**(4)
- Newman M.-A., Von Roepenack E., Daniels M. and Dow M. (2000) Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* **1**(1): 25-31
- Niepol F., Anderson D. and Mills D. (1985) Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(2): 406-410
- Nimchuk Z., Marois E., Kjemtrup S., Leister R. T., Katagiri F. and Dangl J. L. (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**: 353-363
- Nino-Liu D. O., Ronald P. C. and Bogdanove A. J. (2006) Xanthomonas oryzae pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol* **7**(5): 303-324
- Noël L., Thieme F., Gäbler J., Büttner D. and Bonas U. (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *J Bacteriol* **185**(24): 7092-7102
- Noël L., Thieme F., Nennstiel D. and Bonas U. (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *Mol Microbiol* **41**(6): 1271-1281
- Noël L., Thieme F., Nennstiel D. and Bonas U. (2002) Two novel type III-secreted proteins of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol* **184**(5): 1340-1348

- Nomura K., DebRoy S., Lee Y. H., Pumphin N., Jones J. and He S. Y. (2006) A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* **313**(5784): 220-223
- Nomura K., Melotto M. and He S. Y. (2005) Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**(4): 361-368
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266
- Nürnberg T. and Kemmerling B. (2006) Receptor protein kinases—pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* **11**(11): 519-522
- Nürnberg T. and Scheel D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**(8): 372-379
- O Garro L. W., Gibbs H. and Newton A. (1997) Mutation in the *avrBs1* avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* influences survival of the bacterium in soil and detached leaf tissue. *Phytopathology* **87**(9): 960-966
- Ohad N., Shichrur K. and Yalovsky S. (2007) The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiol (Rockv)* **145**(4): 1090-1099
- Orth K., Palmer L. E., Bao Z. Q., Stewart S., Rudolph A. E., Bliska J. B. and Dixon J. E. (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* **285**(5435): 1920-1923
- Orth K., Xu Z., Mudgett M. B., Bao Z. Q., Palmer L. E., Bliska J. B., Mangel W. F., Staskawicz B. and Dixon J. E. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**(5496): 1594-1597
- Parsot C., Hamiaux C. and Page A. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**(1): 7-14
- Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inze D. and Goossens A. (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(4): 1380
- Pierre M., Traverso J. A., Boisson B., Domenichini S., Bouchez D., Giglione C. and Meinel T. (2007) N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**(9): 2804-2821
- Polge C. and Thomas M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci* **12**(1): 20-28
- Preston G. M., Carroll T. P., Guggino W. B. and Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science (Wash D C)* **256**(5055): 385-387

- Qi Q., Rajala R. V. S., Anderson W., Jiang C., Rozwadowski K., Selvaraj G., Sharma R. and Datla R. (2000) Molecular Cloning, Genomic Organization, and Biochemical Characterization of Myristoyl-CoA: Protein N-Myristoyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **275**(13): 9673-9683
- Ratcliff F., Montserrat A., Martin-Hernandez and Baulcombe D. C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* **25**(2): 237-245
- Rawlings N. D., Morton F. R., Kok C. Y., Kong J. and Barrett A. J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**(Database issue): D320-325
- Ray S. K., Rajeshwari R., Sharma Y. and Sonti R. V. (2002) A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol Microbiol* **46**(3): 637-647
- Realini C., Rogers S. W. and Rechsteiner M. (1994) KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett* **348**(2): 109-113
- Ritter C. and Dangl J. L. (1995) The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**(3): 444-453
- Robert-Seilaniantz A., Shan L., Zhou J. M. and Tang X. (2006) The *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Type III Effector HopF2 Has a Putative Myristoylation Site Required for Its Avirulence and Virulence Functions. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**(2): 130-138
- Roden J., Eardley L., Hotson A., Cao Y. and Mudgett M. B. (2004a) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**(6): 633-643
- Roden J. A., Belt B., Ross J. B., Tachibana T., Vargas J. and Mudgett M. B. (2004b) A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16624-16629
- Rojas C. M., Ham J. H., Deng W. L., Doyle J. J. and Collmer A. (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13142-13147
- 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 (Wash D C)* **318**(5850): 645
- Ronald P. C. and Staskawicz B. J. (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol Plant-Microbe Interact* **1**(5): 191-198

- Rooney H. C., Van't Klooster J. W., van der Hoorn R. A., Joosten M. H., Jones J. D. and de Wit P. J. (2005) Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**(5729): 1783-1786
- Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions 1. *Plant Physiology* **136**(1): 2734-2746
- Salmeron J. M., Oldroyd G. E. D., Rommens C. M. T., Scofield S. R., Kim H. S., Lavelle D. T., Dahlbeck D. and Staskawicz B. J. (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene-cluster. *Cell* **86**(1): 123-133
- Sanchez-Fernandez R., Davies T. G., Coleman J. O. and Rea P. A. (2001) The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**(32): 30231-30244
- Sandkvist M. (2001) Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect Immun* **69**(6): 3523
- Schechter L. M., Roberts K. A., Jamir Y., Alfano J. R. and Collmer A. (2004) Pseudomonas syringae type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J Bacteriol* **186**(2): 543-555
- Schornack S., Ballvora A., Gurlebeck D., Peart J., Baulcombe D., Ganai M., Baker B., 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**(1): 46-60
- Shan L., Oh H., Chen J., Guo M., Zhou J., Alfano J. R., Collmer A., Jia X. and Tang X. (2004) The HopPtoF Locus of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Encodes a Type III Chaperone and a Cognate Effector. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**(5): 447-455
- Shan L., Thara V. K., Martin G. B., Zhou J.-M. and Tang X. (2000) The Pseudomonas AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* **12**(12): 2323-2337
- Shipton P. J. (1977) Monoculture and Soilborne Plant Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **15**(1): 387-407
- Sigrist C. J., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A. and Bucher P. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**(3): 265-274
- Simpson A. J., Reinach F. C., Arruda P., Abreu F. A., Acencio M., Alvarenga R., Alves L. M., Araya J. E., Baia G. S., Baptista C. S., Barros M. H., Bonaccorsi E. D., Bordin S., Bove J. M., Briones M. R., Bueno M. R., Camargo A. A., Camargo L. E., Carraro D. M., Carrer H., Colauto N. B., Colombo C., Costa F. F., Costa M. C., Costa-Neto C. M., Coutinho L. L., Cristofani M., Dias-Neto E., Docena C., El-Dorry H., Facincani A. P., Ferreira A. J., Ferreira V. C., Ferro J. A.,

- Fraga J. S., Franca S. C., Franco M. C., Frohme M., Furlan L. R., Garnier M., Goldman G. H., Goldman M. H., Gomes S. L., Gruber A., Ho P. L., Hoheisel J. D., Junqueira M. L., Kemper E. L., Kitajima J. P., Krieger J. E., Kuramae E. E., Laigret F., Lambais M. R., Leite L. C., Lemos E. G., Lemos M. V., Lopes S. A., Lopes C. R., Machado J. A., Machado M. A., Madeira A. M., Madeira H. M. and Marino C. L. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature (Lond)* **406**(6792): 151-157
- Slocombe S. P., Laurie S., Bertini L., Beaudoin F., Dickinson J. R. and Halford N. G. (2002) Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol Biol* **49**(1): 31-44
- Staskawicz B. J., Dahlbeck D. and Keen N. T. (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race specific incompatibility on *Glycine max.* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(19): 6024-6028
- Stebbins C. E. and Galan J. E. (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**(6859): 77-81
- Strange R. N. (2007) Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat Prod Rep* **24**(1): 127-144
- Sugden C., Crawford R. M., Halford N. G. and Hardie D. G. (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J* **19**(4): 433-439
- Sun W., Dunning F. M., Pfund C., Weingarten R. and Bent A. F. (2006) Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and Its Impact on Elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-Dependent Defenses [W]. *The Plant Cell Online* **18**(3): 764-779
- Sunter G., Sunter J. L. and Bisaro D. M. (2001) Plants Expressing Tomato Golden Mosaic Virus AL2 or Beet Curly Top Virus L2 Transgenes Show Enhanced Susceptibility to Infection by DNA and RNA Viruses. *Virology* **285**(1): 59-70
- Swanson J., Kearney B., Dahlbeck D. and Staskawicz B. J. (1988) Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Mol Plant-Microbe Interact* **1**(1): 5-9
- 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**(7): 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**(1): 101-112
- Swings J., Vauterin L. and Kersters K. (1993) The bacterium *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, Swings J, Civerolo EL (eds), pp 121-156. Chapman & Hall, London

- Swords K. M., Dahlbeck D., Kearney B., Roy M. and Staskawicz B. J. (1996) Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* avrBs2. *J Bacteriol* **178**(15): 4661-4669
- Tai T. H., Dahlbeck D., Clark E. T., Gajiwala P., Pasion R., Whalen M. C., Stall R. E. and Staskawicz B. J. (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 14153-14158
- Takahashi K., Kasai K. and Ochi K. (2004) Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4320
- Tampakaki A. P., Bastaki M., Mansfield J. W. and Panopoulos N. J. (2002) Molecular determinants required for the avirulence function of AvrPphB in bean and other plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**(3): 292-300
- Tampakaki A. P., Fadouloglou V. E., Gazi A. D., Panopoulos N. J. and Kokkinidis M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**(9): 805-816
- Tans-Kersten J., Brown D. and Allen C. (2004) Swimming Motility, a Virulence Trait of *Ralstonia solanacearum*, Is Regulated by FlhDC and the Plant Host Environment. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**(6): 686-695
- Thieme F., Koebnik R., Bekel T., Berger C., Boch J., Büttner D., Caldana C., Gaigalat L., Goesmann A., Kay S., Kirchner O., Lanz C., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Mittenhuber G., Nies D. H., Niesbach-Klöggen U., Patschkowski T., Ruckert C., Rupp O., Schneiker S., Schuster S. C., Vorhölter F. J., Weber E., Pühler 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**(21): 7254-7266
- Thieme F., Szczesny R., Urban A., Kirchner O., Hause G. and Bonas U. (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**(10): 1250-1261
- Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L. A., Rhee S. Y. and Stitt M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**(6): 914-939
- 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**(4): 417-425
- Tichopad A., Dzidic A. and Pfaffl M. W. (2002) Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnol Lett* **24**(24): 2053-2056

- Toroser D., Plaut Z. and Huber S. C. (2000) Regulation of a Plant SNF1-Related Protein Kinase by Glucose-6-Phosphate. *Plant Physiol (Rockv)* **123**(1): 403-412
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Y., Cherdyntseva T. A. and Netrusov A. I. (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Appl Biochem Microbiol* **42**(2): 117-126
- 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**(7): 1307-1316
- Van der Biezen E. A. and Jones J. D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**(12): 454-456
- 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 U S A* **97**(7): 3747-3752
- van der Hoorn R. A. L. and Kamoun S. (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell Online* **20**(8): 2009
- 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**(5479): 169-170
- Vauterin L., Rademaker J. and Swings J. (2000) Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* **90**(7): 677-682
- Walley J. W., Coughlan S., Hudson M. E., Covington M. F., Kaspi R., Banu G., Harmer S. L. and Dehesh K. (2007) Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element. *PLoS Genet* **3**(10): 1800-1812
- Wehling M. D., Guo M., Fu Z. Q. and Alfano J. R. (2004) The *Pseudomonas syringae* HopPtoV Protein Is Secreted in Culture and Translocated into Plant Cells via the Type III Protein Secretion System in a Manner Dependent on the ShcV Type III Chaperone. *J Bacteriol* **186**(11): 3621-3630
- Wei Z. M., Laby R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He S. Y., Collmer A. and Beer S. V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**(5066): 85
- Wengelnik K. and Bonas U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **178**(12): 3462-3469
- Whalen M. C., Richter T., Zakharevich K., Yoshikawa M., Al-Azzeh D., Adefioye A., Spicer G., Mendoza L. L., Morales C. Q. and Klassen V. (2008) Identification of a host 14-3-3 protein that interacts with *Xanthomonas* effector AvrRxv. *Physiol Mol Plant Pathol*

- Whalen M. C., Stall R. E. and Staskawicz B. J. (1988) Characterization of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6743-6747
- Whalen M. C., Wang J. F., Carland F. M., Heiskell M. E., Dahlbeck D., Minsavage G. V., Jones J. B., Scott J. W., Stall R. E. and Staskawicz B. J. (1993) Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**(5): 616-627
- 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**(2): 693-706
- Wilson W. A., Hawley S. A. and Hardie D. G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* **6**(11): 1426-1434
- Xiao Y., Heu S., Yi J., Lu Y. and Hutcheson S. W. (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol* **176**(4): 1025-1036
- 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**(11): 1192-1200
- Yang X., Jiang R. and Carlson M. (1994) A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **13**(24): 5878
- Ye Q. and Worman H. J. (1995) Protein-Protein Interactions between Human Nuclear Lamins Expressed in Yeast. *Exp Cell Res* **219**(1): 292-298
- Yuan J., Zhu M., Lightfoot D. A., Iqbal M. J., Yang J. Y. and Meksem K. (2008) In silico comparison of transcript abundances during Arabidopsis thaliana and Glycine max resistance to Fusarium virguliforme. *BMC Genomics* **9 Suppl 2**: S6
- Yun M. H., Torres P. S., Oirdi M. E., Rigano L. A., Gonzalez-Lamothe R., Marano M. R., Castagnaro A. P., Dankert M. A., Bouarab K. and Vojnov A. A. (2006) Xanthan Induces Plant Susceptibility by Suppressing Callose Deposition. *Plant Physiol (Rockv)* **141**(1): 178
- Zha J., Weiler S., Oh K. J., Wei M. C. and Korsmeyer S. J. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**(5497): 1761-1765
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L. and Chai J. (2007) A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **1**(3): 175-185

- Zhang S. and Klessig D. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**(11): 520-527
- Zipfel C. and Felix G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**(4): 353-360
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E. J., Jones J. D. G., Felix G. and Boller T. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**(6984): 764-767

Danksagung

Ulla, ich danke Ihnen, dass sie mich in ihrem Labor willkommen heißen, ihren reichen Erfahrungsschatz mit mir geteilt und nie das Vertrauen in meine Fähigkeiten verloren haben. Ich danke Ihnen auch für die Unterstützung bei Problemen theoretischer und praktischer Natur.

Ich danke „meiner“ Diplomandin Anja Seiferth, meinen Studenten und HiWi Franziska Haufe, Franziska Götsch und Nguyen Hoa Binh für die geleistete Arbeit und die hervorragende Hilfe bei der Bewältigung umfangreicher Experimente. Ich hoffe, dass ich Euch einiges beibringen konnte!

Eine wissenschaftliche Arbeit lebt vom gegenseitigen Austausch und deshalb bedanke ich mich für die vielen Diskussionen und Gespräche ganz besonders bei: Daniela Büttner, die für mich immer ein offenes Ohr hat, bei Ernst Weber für all die „ja, ABER...“, beim „Effektor-Guru“ Frank Thieme und bei Cornelius Schubert, nicht zuletzt auch für mehr als 42 km. Ein extra Dankeschön geht an Annett Strauß, die mir in all den Jahren eine gute Kollegin und eine noch bessere Freundin geworden ist. Gerd Hause danke ich für die hervorragende Arbeit am Mikroskop und die hilfreichen Vorschläge in unseren Seminaren.

Ich danke auch der besten Gärtnerin - Bianca Rosinsky, ohne ihre grandiosen Bemühungen wäre vieles nicht möglich gewesen. Danke Carola Kretschmer für die Anstrengungen, das letzte Bisschen an Information aus meinen Sequenzen herauszupressen. Für die freundliche Laboratmosphäre, welche die Arbeit angenehm begleitet hat, bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Bonas und namentlich bei Thomas Lahaye, Simone Hahn, Carolin Berger, Tina Jordan und Doreen Gürlebeck.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie für die vielseitige Unterstützung. Allen voran danke ich meinen Eltern Helga und Hans-Jürgen, die mir mein Studium ermöglicht haben und stets davon überzeugt waren, dass ich das Richtige tue.

Mein Leben wäre trister ohne meine Frau Claudia, die mit ihrer Geduld, ihre Wärme und ihrer Motivation entscheidend zu meiner Arbeit beigetragen hat. Danke!

Publikationen

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

Thieme F., Szczesny R., Urban A., Kirchner O., Hause G. and Bonas U. (2007) **New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif.** Mol Plant-Microbe Interact 20(10): 1250-1261

Gürlebeck D., Jahn S., Gürlebeck N., Szczesny R., Szurek B., Hahn S., Hause G. and Bonas U. (2008) **Visualization of novel virulence activities of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4.** Mol Plant Pathol Published Online: Nov 2008

Szczesny R., Seiferth A., Escolar L. and Bonas U.: **The type III effector AvrBsT from *Xanthomonas* possesses proteolytic activity and suppresses the AvrBs1-HR in resistant pepper plants.** In preparation

Anhang

DNA-Sequenz: *SnRK1* aus *Capsicum annuum*

ATGGATGGGTCAACAGTCCAAGGCACCAGCAGCGTGGACTCATTTTTACGGAACTATAAGCTCGGGAAAACCTTT
 GGCATTGGATCGTTTGGCAAAGTTAAAATAGCTGAACATACCTAACAGGGCACAAAGTTGCTGTCAAGATTCTT
 AATCGTCGAAAAATCAGGAACATGGACATGGAAGAAAAAGTCCGAAGAGAAATCAAATATTGAGATTGTTGATG
 CATCCTCACATTATACGGCTTTATGAGGTCATAGAGACACCATCAGATATATATGTTGTGATGGAGTATGTGAAA
 TCTGGCGAGCTGTTTGATTACATTGTGCGAGAAGGGAAGATTGCAGGAGGATGAAGCTCGTAATTTTTTTTCAGCAG
 ATAATATCTGGTGTGGAGTACTGCCATAGAAACATGGTGGTTCATAGAGACCTTAAGCCTGAAAACCTCCTCCTG
 GATTCCAAATGGAATGTGAAGATAGCAGATTTTTGGTTTGAGCAATATCATGCGCGATGGTCATTTTCTGAAGACA
 AGTTGCGGAAGCCCAAACCTATGCTGCCCCAGAGGTTATATCAGGTAATTTGTATGCTGGCCCTGAGGTAGATGTA
 TGGAGCTGTGGCGTTATTCTTTATGCTCTTCTGTGGCACCCTTCCATTTGACGATGAAAACATTCCCAATCTT
 TTTAAGAAAATAAAGGGCGGAATATATACTTTACCCAGCCATTTATCAGCTGGTGCAGGGGATTTGATTCCAAGG
 ATGCTTATAGTCGACCCAATGAAGCGAATGACTATTCCTGAGATTCGCCTGCACCCTTGGTTCCAGGCTCATTTG
 CCACGTTATTTGGCCGTGCCCTCCACCAGATACAATGCAACAAGCAAAGAAGATCGATGAAGAGATTCTTCAGGAG
 GTGGTTAAGATGGGATTTGACAGGAACAACCTTACTGAATCTCTTCGCAATAGAGTTCAAATGAGGGCACTGTT
 GCGTACTATTTGCTACTTGACAATCGCCATCGTGTTCCTACTGGCTATCTTGGAGCTGAATTTCAGGAGTCCATG
 GAATATGGTTACAACCCAGATCAATTCAAATGAAAACGTTGCTTCTCCTGTTGGTCAACGCTTCCCAGGAATAATG
 GATTATCAGCAAGCTGGTGTAGGCAGTTTCCCGTCGAAAGAAAATGGGCTCTCGGCCTCCAGTCTCGCGCGCAT
 CCACGTGAAAATAATGACTGAAGTTCTGAAAGCTCTGCAAGAAGTGAATGTATGTTGGAAAAAGATTGGTCAGTAT
 AACATGAAATGTCGCTGGGTTCCCTAGCATACCCGGTCATCATGAAGGCATGGGTATTAATTCCATGCACGGGAGT
 CAGTTCTTTGGAGACGATTACGCCATCATTGAGAATGATGGTGTACTAAATTAACAAATGTGGTCAAATTTGAA
 GTTCAGCTTTACAAAACCTAGGGAGGAAAAGTACCTGCTTGACCTTCAGAGGCTTCAGGGTCCACAGTTCCTCTTC
 TTGGATCTCTGTGCTGCTTTTCTTGCTCAGCTTCGGGTCCTTTGA

DNA-Sequenz: *SnRK1* aus *Solanum lycopersicum*

ATGGACGGAACAGCAGTGCAGGGCACCAGCAGTGTGACTCATTTTTACGGAACTATAAACTCGGGAAAACACTT
 GGCATTGGATCGTTTCGGCAAAGTTAAAATAGCTGAACATACGTTAACAGGGCACAAAGTTGCTGTCAAGATTCTT
 AATCGTCGAAAAATCAGGAATATGGACATGGAGGAGAAAGTCCGTAGAGAAATCAAATATTGAGATTGTTGATG
 CATCCTCATATTATACGGCTTTATGAGGTCATAGAGACACCATCAGATATATATGTTGTGATGGAGTATGTGAAA
 TCTGGCGAGTTATTTGATTACATTGTTGAGAAGGGCAGATTGCAGGAGGATGAAGCTCGTAATTTTTTTTCAGCAG
 ATAATTTCTGGTGTGGAGTACTGCCATAGAAACATGGTGGTTCATAGAGACCTTAAGCCTGAAAACCTCCTTCTG
 GACTCCAAATGGAATGTGAAGATCGCAGATTTTTGGTTTGAGCAATATCATGCGCGATGGTCATTTTCTGAAGACA
 AGTTGCGGAAGCCCAAACCTATGCTGCCCCAGAGGTTATATCAGGTAATTTGTATGCTGGCCCTGAGGTAGATGTA
 TGGAGCTGTGGTGTATTCTTTATGCTCTTCTGTGGCACCCTTCCGTTTGACGATGAAAACATACCCAATCTT
 TTTAAGAAAATAAAGGGTGAATATATACTCTGCCAGCCATTTATCAGCTGGTGCAGGGGATTTGATTCCGAGG
 ATGCTTATAGTCGACCCAATGAAGCGAATGACTATTCCTGAGATTCGCCTGCACCCTTGGTTCCAAGCTCATTTG
 CCACGCTATTTGGCCGTGCCCTCCACCAGATACAACCAACAAGCAAAGAAGATCGATGAAGAGATTCTTCAAGAG
 GTGGTTAAGATGGGATTTGACAGGAACAACCTTACTGAGTCTCTTCGCAATAGAGTTCAAATGAGGGCACTGTT
 GCATACTATCTGCTCCTGGACAATCGCCATCGTGTTCCTACTGGCTATCTTGGAGCTGAATTTCAGGAGTCCATG
 GAATATGGTTACAACCCGATCAATTCCTAATGAAACCGTCTTCCCCTGTTGGTCAACGTTTCCCAGGAATAATG
 GATTATCAGCAAGCTGGTGAAGACAGTTCCTTGAAGAAAATGGGCTCTTGGCCCTCCAGTCTCGAGCGCAT
 CCACGTGAAAATAATGACTGAAGTTTTGAAAGCTCTGCAAGAAGTGAATGTATGTTGGAAAAAGATTGGTCAGTAT
 AACATGAAATGTCGATGGGTTCCCTAGCTTACCTGGTTCATCATGAAGGCATGGGTGTTAATTCCATGCATGGGAAT
 CAGTTCTTTGGAGATGATTACATCCATCATTGAGAATGATGGGGCCACAAAGTTAACAATGTGGTCAAGTTTGA
 GTTCAGCTTTACAAAACCCAGGGAGGAGAAGTACTTGTGACCTTCAGAGACTTCAGGGTCCACAATTCCTCTTC
 CTGGATCTCTGTGCTGCTTTTCTTGCTCAGCTTCGAGTACTTTAA

DNA-Sequenz: δ -TIP aus *Solanum lycopersicum*

ATGGCTGGCATTGCTTTTGGACGTGTTGATGATTATTAGTGCTGGGTCTCTTAAGGCCTATCTTGCTGAATTC
 ATCTCCACTTTGCTCTTTGTCTTCGCTGGTGTGGCTCCGCCATTGCTTACAACAAGTTGACAGTAAATGCTGCA
 CTTGACCCGGCTGGGCTCGTAGCTATTGCAGTTTGCCATGGATTGGTCTCTTCGTGGCTGTTTCAATTGCTGCT
 AACATCTCTGGTGGTCATGTTAACCCTGCTGTACCTTCGGATTGGCCCTTGGTGGTCAAATTACCCTTCTTACT
 GGCCTTTTTTACACCATTGCTCAACTTTTTGGGCTCCATTGTAGCTTGATCCTCCTCAAATTGCTCACCGGAGGA
 TTGGCTATTCCAACCATGGAGTGGCAGCTGGTGTGGTGCCATTGAAGGAGTTGTGATGGAATAATTGTCACC
 TTTGCTTTGGTATACACTGTATACGCAACAGCAGCTGACCCAAAGAAGGGCTCATTGGGCACAATTGCACCTATT
 GCTATTGGTTTCATTGTTGGTGCTAACATTTTGGCTGCTGGCCATTCTCTGGTGGATCAATGAACCCAGCCCGT
 TCATTTGGCCTGCAGTTGCTGCCGTAACTTTGTGGTCACTGGATTTACTGGGTTGGCCACTCGTTGGTGGT
 GGATTGGCTGGCCTTATTTACAGCAATGTGTTTCAATGAACCAAGAGCATGCTCCTCTCTCCAGTGATTTCTAA

DNA-Sequenz: Tyrosinkinase aus *Solanum lycopersicum*

ATGAGTGCAAGTGAAGGGAGCTCCGGCTCATCGGCTGCCGCCGGCGCCGTCGAAATACCGGTGGTATCGACGGAA
 AAGAAGAAGGAAAAGTCAAGAGTGAGCAAGACTTCGCAAATACTCTGGCACGCTCATCATAACGATGCGACTGCC
 GTACGGAAGCTTCTAGAAGAAGATCGGACGCTTGTTCAGCTAGAGATTACGATAATCGAATCCACTCCACGTT
 GCAGCGTTACATGGCTGGATCGATGTTGCAAAGTGCTTGATTGACTATGGTGCCGATGTCAACGCTCAGGATCGT
 TGGAGAAAACGCCTCTAGCCGATGCAGAAGGCGCTAAGAAATCTGGCATGATTGAATTGTTAAAGACGTATGGT
 GGGCTATCTTATGGACAAAATGGAAGCCATTTTGAACCAAGGCCTGTTGCCCCACCTCTACCAAAGAAATGTGAT
 TGGGAGATTGATCCTACTGAGCTGGACTTCTCAAATCTGCAATCATTGGAAAGGGGTCTTTTGGTGAGATCTTA
 AAAGCTTGCTGGCGTGGAACACCCGTAGCTGTTAAACGCATCCTCCCAAACCTGTGAGATGATCGATTGGTATT
 CAGGATTTAGGCATGAGGTAATTTGCTGGTGAAGCTCCGTCATCCAAATATAGTGAATTTCTTGGAGCTGTT
 ACTGAGAAAAAACCTTAATGTTAATAACTGAATACTTCCGAGGGGGCGATCTGCATCAGCACCTCAAGGAAAA
 GGTCTCTTACTCCATCTACAGCAGTCAATTTTGTATGGATATAGCAAGAGGCATGACTTATCTTCAATGAG
 CCAAATGTTATAATCCACAGAGATCTAAAGCCCAGGAATGTTCTTCTTGTCAATTCGAATGAGACCAATTTGAAA
 GTTGGAGATTTTCGGATTAAGCAAATAATCAGGGTTTCAAGAACTCCCATGATGTTTATAAGATGACTGGGGAGACA
 GGGAGCTACCGCTATATGGCACCTGAAGTATTCAAGCACCGGAAGTATGACAAGAAGTTGATGTTTTCTCTTTT
 GCCATGATCTTATATGAGATGCTAGAGGGTATCCACCATTATCCCACTATGAACCATATGAAGCAGCCAAGTAT
 GTGGCAGAAGGACACAGGCCCTATGTTTCCAGGGCAAAGGTTTTTACCCAGAAATTGAAAGAGTTGGTAGAGGAATGT
 TGGGCACCAGATATGAACAAGAGGCCCTCATTTTTGGATATTCTAAAAAGACTTGAAAAAATTAAGAAGCTCTA
 CCCTCAGAGCATCATTGGCACTTTTTCACTTCATGA

DNA-Sequenz: eEF1A aus *Solanum lycopersicum*

ATGGGTAAAGAGAAGATTCATATCAGCATTGTTGTCTTGGACATGTCGACTCTGAAAAGTCGACCACTACTGGT
 CACTTGATCTACAAGCTTGGTGGTATTGACAAGCGTGTGATCGAGAGGTTTGAAGAAAGCAGCTGAGATGAAC
 AAGAGGTCATTCAAGTATGCATGGGTGCTTGACAAGCTTAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATTACCATTGATATT
 GCCTTGTTGGAAGTTTGGAGACCACAAAGTACTACTGCATGATTGATGCTCCTGGACACAGAGATTTTCAATCAAG
 AACATGATTACTGGTACCTCTCAGGCTGACTGTGCTGTCTCATCATTGACTCCACAACCTGGTGGTTTCAAGCT
 GGTATTTTCAAGGATGGACAGACCCGTGAGCACGCATTGCTTGTCTTACCCTTGGTGTCAAGCAAATGATTTGC
 TGCTGTAACAAGATGGATGCTACCACCCCAAGTACTCCAAGGCTAGGTACGATGAAATTGTCAAGGAAGTTTCT
 TCCTACCTCAAGAAAGTAGGATACAACCCTGACAAAATCCCCTTTGTCCCATCTCTGGTTTTGAAGGAGACAAC
 ATGATTGAGCGATCAACCAACCTTGACTGGTACAAGGGCCCAACCCTACTTGAGGCTCTTGACCAGATTAATGAG
 CCAAGAGGCCCTCAGACAAGCCCTCCGTCTTCACTTCAGGATGTCTACAAGATTGGAGGTATTGGAAGTGA
 CCTGTCCGCTCGTGTGAAACTGGTGTGATTAAGCCTGGTATGGTTGTCACTTTTGGTCCAACCTGGTCTGACCACT
 GAGGTTAAATCTGTGGAGATGCACCACGAGGCTCTTCCAGGAGGCATCTCCTGGTGAACAATGTTGGGTTCAACGTC
 AAGAAGTTGCAGTTAAGGATCTTAAGAGAGGTTACGTTGCCTCCAACCTCAAAGATGACCCAGCGAAGGGTGT
 GCTAGCTTCACTGCCAAGTTATCATCATGAACCACCCTGGTCAAGATTGGAACCGGATATGCCCCAGTGTCTGAC
 TGCCACACCTCCACATTGCTGTCAAGTTTGTGAGATCTTGACCAAGATTGACAGACGTTCTGGTAAGGAACCT
 GAGAAGGAGCCCAAGTTTTTGAAGAATGGTGTGATGCCGGTATGGTTAAGATGATTCCCACCAAGCCCATGGTTGTT
 GAGACCTTTGCTGAGTACCCACCATTGGGACGTTTTGCCGTGAGGGACATGCGTCAGACTGTTGCTGTTGGAGTT
 GTCAGAAGCGTCGACAAGAAAGACCCTACTGGTGTAAAGTCACCAAGGCTGCCCAAAGAAGAAGTGA

Ca_SnRK1 TATCTTGGAGCTGAATTTTCAGGAGTCCATGGAATATGGTTACAACCAGATCAATTCAAAT 1080
Sl_SnRK1 TATCTTGGAGCTGAATTTTCAGGAGTCCATGGAATATGGTTACAACCGGATCAATTCTAAT 1080
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 GAAAACGTTGCTTCTCCTGTTGGTCAACGCTTCCCAGGAATAATGGATTATCAGCAAGCT 1140
Sl_SnRK1 GAAACCGCTGCTTCCCCTGTTGGTCAACGTTTCCCAGGAATAATGGATTATCAGCAAGCT 1140
**** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 GGTGCTAGGCAGTTTCCCGTCGAAAGAAAATGGGCTCTCGGCCTCCAGTCTCGCGCGCAT 1200
Sl_SnRK1 GGTGCAAGACAGTTCCCATTTGAAAGAAAATGGGCTCTTGGCCTCCAGTCTCGAGCGCAT 1200
***** * ***** * * ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 CCACGTGAAATAATGACTGAAGTTCTGAAAGCTCTGCAAGAAGTGAATGTATGTTGGAAA 1260
Sl_SnRK1 CCACGTGAAATAATGACTGAAGTTTTGAAAGCTCTGCAAGAAGTGAATGTATGTTGGAAA 1260
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 AAGATTGGTCAGTATAACATGAAATGTCGCTGGGTTCTTAGCATACCCGGTCATCATGAA 1320
Sl_SnRK1 AAGATTGGTCAGTATAACATGAAATGTCGATGGGTTCTTAGCTTACCTGGTCATCATGAA 1320
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 GGCATGGGTATTAATTCCATGCACGGGAGTCAGTTCTTTGGAGACGATTAGCCATCATT 1380
Sl_SnRK1 GGCATGGGTGTTAATTCCATGCATGGGAATCAGTTCTTTGGAGATGATTCATCCATCATT 1380
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 GAGAATGATGGTGTCACTAAATTAACAAATGTGGTCAAATTTGAAGTTTCAGCTTTACAAA 1440
Sl_SnRK1 GAGAATGATGGGGCCACAAAGTTAACAAATGTGGTCAAGTTTGAAGTTTCAGCTTTACAAA 1440
***** * * * * ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 ACTAGGGAGGAAAAGTACCTGCTTGACCTTCAGAGGCTTCAGGGTCCACAGTTCCTCTTC 1500
Sl_SnRK1 ACCAGGGAGGAGAAGTACTTGCTTGACCTTCAGAGACTTCAGGGTCCACAATTCCTCTTC 1500
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Ca_SnRK1 TTGATCTCTGTGCTGCTTTTCTTGCTCAGCTTCGGGTCCTTTGA 1545
Sl_SnRK1 CTGGATCTCTGTGCTGCTTTTCTTGCTCAGCTTCGAGTACTTTAA 1545
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Lebenslauf

Name: Robert Szczesny
Anschrift: Fischer-von-Erlach-Str. 49 in 06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 29. 07. 1977
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben
Familienstand: verheiratet mit Claudia Szczesny
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1984 – 1991 Polytechnische Oberschule in Wimmelburg
1991 – 1996 Gymnasium in der Lutherstadt Eisleben
Abschluss: Abitur

1996 – 1996 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 – 1997 Grundwehrdienst im Zentrum für Nachwuchsgewinnung Ost
1997 – 2003 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2003 – 2003 Diplomarbeit im Fachbereich Genetik am Institut für Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Thema: „Analyse eines Virus-induzierten Gen-„Silencing“-Systems für Mutationsstudien in *Capsicum annuum* mittels quantitativer Echtzeit-PCR“
Abschluss: Diplom-Biologe

12/2003 – 12/2008 Promotionsarbeit im Fachbereich Genetik am Institut für Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

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

Halle, 25. Jan. 2009

Robert Szczesny