

# **DNA-Bindenspezifität von TAL-Effektoren aus Xanthomonaden**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I

BIOWISSENSCHAFTEN

DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von Heidi Scholze

geboren am 27.01.1982 in Dresden

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. PD Dr. Jens Boch – Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens – Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Fr. Christiane Gatz – Georg-August-Universität Göttingen

Halle/ Saale, 18.10.2011

Tag der Verteidigung: 19.12.2011

## Veröffentlichungen

**Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:**

**J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, und U. Bonas**, 2009, "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science **326**(5959): 1509-12.

**H. Scholze und J. Boch**, 2010, "TAL effector-DNA specificity." Virulence **1**(5): 428-32.

**R. Geißler<sup>1</sup>, H. Scholze<sup>1</sup>, S. Hahn, J. Streubel, U. Bonas, S.-E. Behrens und J. Boch**, 2011, "Transcriptional Activators of Human Genes with Programmable DNA-Specificity." PLoS One **6**(5): e19509. <sup>1</sup> Diese Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

### Reviews:

**H. Scholze und J. Boch**, 2010, "TAL effectors are remote controls for gene activation." Curr Opin Microbiol **14**(1): 47-53.

## Zusammenfassung

TAL-Effektoren stellen eine besondere Klasse der Effektorproteine phytopathogener *Xanthomonas* spp. dar und werden über das Typ-III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle transloziert. Die TAL-Effektoren werden in den Wirtszellkern transportiert und induzieren die Transkription von Wirtsgenen. Als Gemeinsamkeit weisen alle TAL-Effektoren in der zentralen Region eine Anzahl von Wiederholungen eines meist 34 Aminosäure umfassenden nahezu identischen Sequenzmotivs, die sogenannten *repeats*, auf. Die fast identische Abfolge der Aminosäuren der *repeats* variiert hauptsächlich in der Aminosäureposition 12 und 13. Die Kombination der *repeat*-Typen bestimmt die DNA-Sequenzspezifität der TAL-Effektoren. In dieser Arbeit wurde das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren untersucht, welches besagt, dass je ein Basenpaar von einem *repeat* erkannt wird und dass die zwei hypervariablen Aminosäuren 12 und 13 (z.B. NG) die Spezifität des *repeats* bestimmen. Spezifische DNA-Sequenzen (Boxen) für die TAL-Effektoren Hax2, Hax3, Hax4 und AvrXa10 wurden anhand deren *repeat*-Abfolge generiert und in Reporterkonstrukte inseriert. Die TAL-Effektoren induzierten spezifisch die Reporterexpression von Konstrukten mit ihren Boxen. Weiterhin wurde die Bedeutung und die Erkennungsspezifität des dem ersten *repeat* vorangestellten Sequenzmotivs (nullter *repeat*) bestimmt und die Erkennungssequenz auf diesen *repeat* ausgeweitet. Die Spezifität für die am häufigsten vorkommenden *repeat*-Typen (NI, NG, HD, NN, NS) wurde untersucht und es konnten unterschiedliche *repeat*-Spezifitäten für ein, zwei oder alle vier Nukleotide festgestellt werden. Anhand der Untersuchung künstlicher TAL-Effektoren konnten 6,5 *repeats* als Mindestanzahl für die transkriptionelle Induktion durch TAL-Effektoren ermittelt werden. Fortführend wurde an künstlich generierten TAL-Effektoren gezeigt, dass die Abfolge der *repeat*-Typen innerhalb der *repeat*-Region offenbar beliebig variiert werden kann und dass die Erkennungsspezifität des TAL-Effektors vorhersagbar bleibt. Sequenzanalysen stromabwärts der Box zeigten, dass für die Geninduktion durch einen TAL-Effektor mehr als die Box benötigt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Reporterkonstrukte sowie Endogene auch in humanen Zellen durch TAL-Effektoren spezifisch induziert werden können. Dagegen scheint die TAL-Effektor-vermittelte Geninduktion in *S. cerevisiae* vermutlich komplexer gestaltet zu sein, da sie in diesen Experimenten nicht vermittelt werden konnte. TAL-Effektoren sind DNA-Bindeproteine mit nahezu beliebiger und vorhersagbarer Erkennungssequenz und können ein vielseitig anwendbares, molekularbiologisches Werkzeug darstellen.

## Summary

TAL effectors represent a special class of effector proteins of phytopathogenic *Xanthomonas* bacteria and are translocated via the type III secretion system into the plant host cell, where they localize to the host cell nucleus and induce the transcription of host genes. A common feature of TAL effectors is their central repeat domain, consisting of a variable number of 34-amino acid motif repetitions. These single repeats are almost identical in sequence and vary mainly in the amino acid position 12 and 13. The combination of repeat types determines the DNA specificity of the TAL effectors. In this work the model of TAL effector sequence specificity was examined. According to this model each repeat recognizes one base pair and the hypervariable amino acids at position 12 and 13 (e.g. NG) determine repeat specificity. Based on this rule specific DNA recognition sequences (boxes) for the TAL effectors Hax2, Hax3, Hax4, and AvrXa10 were inserted into a reporter vector. The TAL effectors specifically induced reporter gene expression in constructs containing their boxes. Furthermore, the influence and recognition specificity of a region (repeat zero) preceding the first repeat was determined and the recognition sequence was extended. The DNA specificity of the most frequent repeat types (NI, NS, HD, NN, NS) was investigated and specificities for one, two or all four nucleotides were found. Based on the investigation of artificial TAL effectors the minimum number of 6.5 repeats could be determined for transcriptional induction by TAL effectors. Artificially generated TAL effectors were used to show that the order of repeat types within the repeat region can be randomly varied, and that the recognition specificity of the TAL effector remains predictable. Sequence analysis downstream of TAL effector binding boxes revealed that additional flanking DNA sequence is required for TAL mediated reporter gene induction. Furthermore it was shown that reporter constructs and native genes were also specifically induced in human cells by corresponding TAL effectors. TAL effector-mediated gene induction in yeast is probably more complex, because it could not be achieved in the course of this work. TAL effectors are DNA-binding proteins with predictable recognition sequence and customizable specificity and represent a versatile, molecular biological tool.

# Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen.....	I
Zusammenfassung.....	II
Summary.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis & Übersetzungen.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Pflanzliche Resistenzmechanismen gegen mikrobielle Pathogene.....	1
1.2 Phytopathogene der Gattung <i>Xanthomonas</i> spp.....	3
1.3 Die AvrBs3-/TAL-Effektor-Familie.....	6
1.3.1 Struktureller Aufbau von TAL-Effektorproteinen.....	7
1.3.2 Charakteristik der <i>repeats</i> , eine neue DNA-Bindedomäne.....	9
1.4 Induktion pflanzlicher Gene durch TAL-Effektoren.....	10
1.5 Die Regulation der Transkription im Eukaryoten und der potentielle Einfluss der TAL-Effektoren.....	12
1.6 Das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren.....	16
1.7 Zielstellung.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Verwendete Stämme und deren Kultivierung.....	19
2.1.1 Bakterien- und Hefestämme.....	19
2.1.2 Nährmedien und Antibiotika.....	19
2.2 Verwendete Vektoren und Oligonukleotide.....	20
2.3 Verwendete Pflanzen und Anzuchtbedingungen.....	27
2.4 Inokulationsexperimente.....	27
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	27

2.5.1	Die PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	27
2.5.2	Die Erstellung der unterschiedlichen Reporterkonstrukte .....	28
2.5.3	Die Klonierung mittels des GATEWAY®-Systems.....	29
2.5.4	Die Klonierung von künstlichen TAL-Effektoren .....	29
2.5.5	Die Klonierung von AvrBs3- und Hax3-Derivaten .....	29
2.5.6	Die Klonierung von TAL-Effektoren mittels <i>golden TAL technology</i> (Geißler <i>et al.</i> , 2011) .....	30
2.5.7	Die RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	31
2.5.8	Die Synthese von Erststrang-cDNA.....	31
2.5.9	Kompetente Zellen: Herstellung und Transformation .....	32
2.6	Methoden für den Nachweis der Genexpression.....	34
2.6.1	Die GFP-Fluoreszenzmikroskopie .....	34
2.6.2	Die Histochemische $\beta$ -Glucuronidase-Färbung .....	34
2.6.3	Der Quantitative $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitätstest über 4-MUG.....	34
2.6.4	Der Qualitative $\beta$ -Galactosidase-Nachweis .....	35
2.6.5	Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und der Immunoblot.....	36
3	Ergebnisse .....	37
3.1	TAL-Effektoren und das Modell der Sequenzspezifität.....	37
3.1.1	Untersuchung von Zielsequenzen ausgewählter TAL-Effektoren.....	37
3.1.2	Hax2 induziert vorhergesagte Zielsequenzen in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
3.2	Künstliche TAL-Effektoren.....	44
3.2.1	Generierung und Untersuchung künstlicher TAL-Effektoren.....	44
3.2.2	Induktion eines Endogens durch einen künstlichen TAL-Effektor.....	48
3.3	Charakterisierung der <i>repeat</i> -Region als DNA-Bindedomäne.....	50
3.3.1	Ermittlung von Spezifitäten einzelner <i>repeat</i> -Typen.....	50
3.3.2	Bestimmung der minimalen Länge der benötigten <i>repeat</i> -Region für die transkriptionelle Aktivierung .....	53

3.3.3	Der Einfluss von Fehlpaarungen auf die Geninduktion durch einen TAL-Effektor .....	57
3.4	Untersuchung der Sequenzumgebung der Box .....	67
3.4.1	Der Einfluss des ersten Nukleotids stromabwärts der Box auf die transkriptionelle Induktion durch Hax3 .....	67
3.4.2	Der Einfluss der Box stromabwärts gelegenen Sequenz auf die transkriptionelle Induktion durch Hax3 .....	68
3.5	Untersuchung der Funktionalität von TAL-Effektoren in heterologen, biologischen Systemen.....	73
3.5.1	Untersuchung der Geninduktion durch TAL-Effektoren in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	77
3.5.2	TAL-Effektoren induzieren die Transkription in <i>Homo sapiens</i> .....	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren.....	84
4.2	Generation und Analyse künstlicher TAL-Effektoren .....	86
4.3	Eine minimale Länge der <i>repeat</i> -Region ist essentiell für die Geninduktion durch einen TAL-Effektor .....	88
4.4	Der Einfluss von Fehlpaarungen auf das Modell der Sequenzspezifität .....	90
4.5	Der Einfluss der Promotorsequenz auf die Induktion durch einen TAL-Effektor ....	94
4.6	Die TAL-Effektor-vermittelte Geninduktion in verschiedenen Organismen.....	99
4.7	Biotechnologische Aspekte von TAL-Effektoren .....	104
5	Literaturverzeichnis .....	107
6	Anhang.....	117
	Danksagung.....	154
	Lebenslauf .....	155
	Erklärung.....	156

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Bakterielle Effektoren verändern die Abwehrmechanismen und die Signalweiterleitung in der Pflanzenzelle. ....	3
Abbildung 1-2: Zick-Zack-Modell der Ko-Evolution von Pflanzen und Pathogenen. ....	4
Abbildung 1-3: Der Aufbau von TAL-Effektoren. ....	8
Abbildung 1-4: Übersicht der unterschiedlichen <i>repeat</i> -Typen und deren Häufigkeit sowie Vorkommen in <i>Xanthomonas</i> spp. ....	10
Abbildung 1-5: Modellhafte Darstellung des Pol II-Präinitiationskomplex und der <i>core</i> -Promotor-Elemente. ....	15
Abbildung 1-6: Modell der <i>repeat</i> -Spezifität von TAL Effektoren. ....	17
Abbildung 3-1: Abgeleitete Effektorerkennungssequenzen für Hax2, Hax3, Hax4 und AvrXa10. ....	39
Abbildung 3-2: Vergleich der DNA-Zielsequenzen in Promotoren von induzierten Genen mit den RVDs der TAL-Effektoren. ....	40
Abbildung 3-3: Strukturvorhersagen mit PSIPRED des „nullten“ und ersten <i>repeats</i> von AvrBs3. ....	41
Abbildung 3-4: Erkennungsspezifität eines potentiellen „nullten <i>repeats</i> “ in Hax3. ....	42
Abbildung 3-5: Hax2 induziert die Expression von <i>PAP1</i> in <i>A. thaliana</i> . ....	44
Abbildung 3-6: Klonierung künstlicher TAL-Effektoren. ....	46
Abbildung 3-7: Künstliche TAL-Effektoren mit neuer <i>repeat</i> -Zusammensetzung induzieren die Transkription. ....	47
Abbildung 3-8: Der TAL-Effektor ArtBs4: Positivkontrolle und Aktivator eines Endogens. ....	49
Abbildung 3-9: Erkennungsspezifität der <i>repeat</i> -Typen an Basenpaaren. ....	52
Abbildung 3-10: Künstliche TAL-Effektoren induzieren die Transkription in Abhängigkeit von der Anzahl der <i>repeats</i> . ....	55
Abbildung 3-11: Künstliche ArtX-Effektoren induzieren die Transkription in Abhängigkeit von der Anzahl der <i>repeats</i> . ....	57
Abbildung 3-12: Eingeschränkte transkriptionelle Induktion bei Fehlpaarungen im Randbereich der ArtX2-Box. ....	59
Abbildung 3-13: Übersicht der TAL-Effektoren ArtX2, Hax2 und ArtX5 mit Fokus auf die ersten und letzten drei <i>repeats</i> . ....	60



Abbildung 3-14: Eingeschränkte transkriptionelle Geninduktion bei Fehlpaarungen im Randbereich der TAL-Box bei unterschiedlichen TAL-Effektoren.....	62
Abbildung 3-15: Fehlpaarungen wirken negativ auf die spezifische Induktion der TAL-Effektoren.....	64
Abbildung 3-16: Spezifische Induktion der TAL-Effektoren vermindert durch Fehlpaarungen am HD-repeat.....	66
Abbildung 3-17: Einfluss der Induktionsstärke durch das Hax3-Box 3'-flankierende Nukleotid.....	68
Abbildung 3-18: Beeinflussung der Hax3-Induktion durch unterschiedliche Sequenzen stromabwärts der Hax3-Box.....	69
Abbildung 3-19: Untersuchung der transkriptionellen Induktion durch Hax3 in Abhängigkeit der stromabwärts gelegenen Sequenz.....	72
Abbildung 3-20: Übersicht der TAL-Effektor-Derivate und deren Lokalisation in der Pflanze. ....	75
Abbildung 3-21: Expression und Induktion durch die TAL-Effektor-Derivate in der Pflanze. ....	76
Abbildung 3-22: Modelhafte Darstellung der Reporterkonstrukte und TAL-Effektorkonstrukte für die Aktivitätsstudien in <i>S. cerevisiae</i> .....	78
Abbildung 3-23: Keine deutliche Induktion des Reportergens in <i>S. cerevisiae</i> durch einen TAL-Effektor, unabhängig der Kopienzahl. ....	80
Abbildung 3-24: Keine deutliche Induktion des Reportergens in <i>S. cerevisiae</i> durch einen TAL-Effektor unabhängig von der Promotorsequenz.....	82
Abbildung 4-1: Modellhafte Darstellung der Interaktion des TAL-Effektors mit Wirtsfaktoren am Promotor.....	99
Abbildung 6-1: Ausschnitt der intergenischen Sequenz stromaufwärts von At1G56650 aus <i>A.thaliana</i> . ....	117
Abbildung 6-2: Sequenzvergleich von At1G56650 mit der Hax2-Box.....	117
Abbildung 6-3: Sequenz von <i>Bs4</i> . ....	118
Abbildung 6-4: Sequenzvergleich von <i>Bs4</i> aus <i>L. esculentum</i> und <i>L. pennellii</i> . ....	123

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Wirts- und Krankheitsübersicht ausgelöst durch <i>Xanthomonas</i> -Stämme und die Verbreitung von TAL-Effektoren in den verschiedenen <i>Xanthomonas</i> -Pathovarietäten .....	5
Tabelle 2-1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme* .....	19
Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika .....	20
Tabelle 2-3: Verwendete Klonierungsvektoren .....	20
Tabelle 2-4: Verwendete Oligonukleotide .....	21
Tabelle 2-5: 1. Assemblierungsreaktion.....	31
Tabelle 2-6: 2. Assemblierungsreaktion.....	31
Tabelle 2-7: Benötigtes Medium und Puffer für chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen .....	32
Tabelle 3-1: Zusammenfassung der ermittelten <i>repeat</i> -Spezifitäten. ....	51
Tabelle 4-1: Übersicht bekannter TAL-Effektoren und deren Boxen mit Anzahl der Fehlpaarungen. ....	93
Tabelle 6-1: Plasmidliste .....	124

## Abkürzungsverzeichnis & Übersetzungen

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid
A	Adenosin-Nukleotid
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
ArtX	<i>artificial mixed effector</i> ; künstlicher, zufällig ligierter TAL-Effektor
As	Aminosäure(n)
ATG	Startcodon aus den Nukleotiden ATG, codiert Methionin
<i>att-sites</i>	Rekombinationsstellen in Gateway-System
<i>Avr-</i>	Avirulenz-
ArtHD	<i>artificial effector with HD-repeats</i> ; künstlicher, TAL-Effektor mit <i>HD-repeats</i>
ArtBs4	<i>artificial effector Bs4</i> , künstlicher TAL-Effektor zur Induktion von <i>Bs4</i>
ArtX	<i>artificial random mixed effector</i> ; künstlicher, zufällig-ligierter TAL-Effektor
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> , basische As angeordnet in Helix-Schleife-Helix
Bp	Basenpaar
BRE	TFIIB <i>recognition element</i> , TFIIB-Sequenzerkennungselement
<i>Bs3</i>	<i>bacterial spot disease resistance gene 3</i>
<i>Bs4</i>	<i>bacterial spot disease resistance gene 4</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin-Nukleotid
C-	Carboxy-
ca.	circa
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
<i>cfu</i>	<i>cell forming unit</i>
<i>core</i>	Kern
cv.	Kultivar, Kulturvarietät
DCE	<i>downstream core element</i> , stromabwärts liegendes <i>core</i> -Element
DEPC	Dimethylpropylcarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPE	<i>downstream promoter element</i> , stromabwärts liegendes Promotorelement
ECW	Kulturvarietät <i>Early Cal Wonder</i> von <i>C. annuum</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
eGFP	<i>enhanced</i> (verbessertes) GFP
<i>Enhancer</i>	DNA-Sequenz die das Ablesen einer Gensequenz verstärkt
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und Andere
EtOH	Ethanol
<i>fwd</i>	<i>forward</i> , vorwärts
G	Guanosin-Nukleotid
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls

GTF	genereller Transkriptionsfaktor
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
hpi	<i>hours post infiltration</i> , Stunden nach Infiltration
HR	<i>hypersensitive response</i> , Hypersensitive Reaktion
i.d.R.	in der Regel
<i>in planta</i>	in der Pflanze
Inr	Initiator-Element
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LSM	<i>Laser Scanning</i> -Mikroskopie, Fluoreszenzlasermikroskopie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MTE	<i>motif ten element</i> , Promotorelement
MU/ MUG	siehe unter 4-MU/ 4-MUG
<i>multi copy</i>	mehrfach in einer Zelle vorliegend
N	N-Terminus, Proteinende, mit freier NH <sub>2</sub> -Gruppe von der Aminosäure
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
<i>pBs4</i>	<i>Bs4</i> -Promotor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Präinitiationskomplex
Pol II	RNA Polymerase II
pv.	<i>pathovar</i> , Pathogen-Varietät
R	resistent
R-	Resistenz-
rcf	<i>relative centrifuge force</i> , relative Zentrifugalkraft
<i>repeat</i>	nahezu identische Sequenzwiederholung in TAL-Effektoren, meist 34 As
<i>rev</i>	<i>reverse</i> , rückwärts
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>single copy</i>	einmal pro Zelle vorliegend
Spec	Spectinomycin
spp.	<i>species</i> ; Arten
sq.	semiquantitativ
T	Thymidin-Nukleotid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	<i>transcription activator like</i> , Transkriptionsaktivator ähnlich
<i>Taq</i>	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA (10:1)

T5E	Tris-EDTA (5:1)
TF	Transkriptionsfaktor
TFIIA	Transkriptionsfaktor A
TFIIB	Transkriptionsfaktor B
TFIID	Transkriptionsfaktor D
TFIIE	Transkriptionsfaktor E
TFIIF	Transkriptionsfaktor F
TFIIH	Transkriptionsfaktor H
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan
UPA	<i>upregulated by AvrBs3</i> , induziert durch AvrBs3
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht translatierte Region
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Xca	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>amoraciae</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xcm	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>orytae</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure
Y1H	<i>yeast one hybrid</i>
Y2H	<i>yeast two hybrid</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

## 1 Einleitung

Im Laufe der Evolution haben sich auf unserer Erde viele verschiedene Lebensformen entwickelt. Zu den erfolgreichsten Organismen zählen dabei die stationären Pflanzen. Ihre Artenvielfalt reicht von einfachen, einzelligen Algen bis hin zu komplexen Bäumen. Sie bilden die wichtigste Nahrungsgrundlage vieler prokaryotischer und eukaryotischer Organismen, einschließlich des Menschen. Während der Evolutionsgeschichte haben sich verschiedene Interaktionen zwischen Pflanzen und den umgebenden Lebewesen entwickelt, von denen sich einige positiv auf die Pflanzen auswirken, wie Mutualismus, und andere negativ, wie Parasitismus oder Herbivorie. Zu den negativen Wechselwirkungen zählt auch der Befall durch krankheitsauslösende Mikroorganismen (Pathogene).

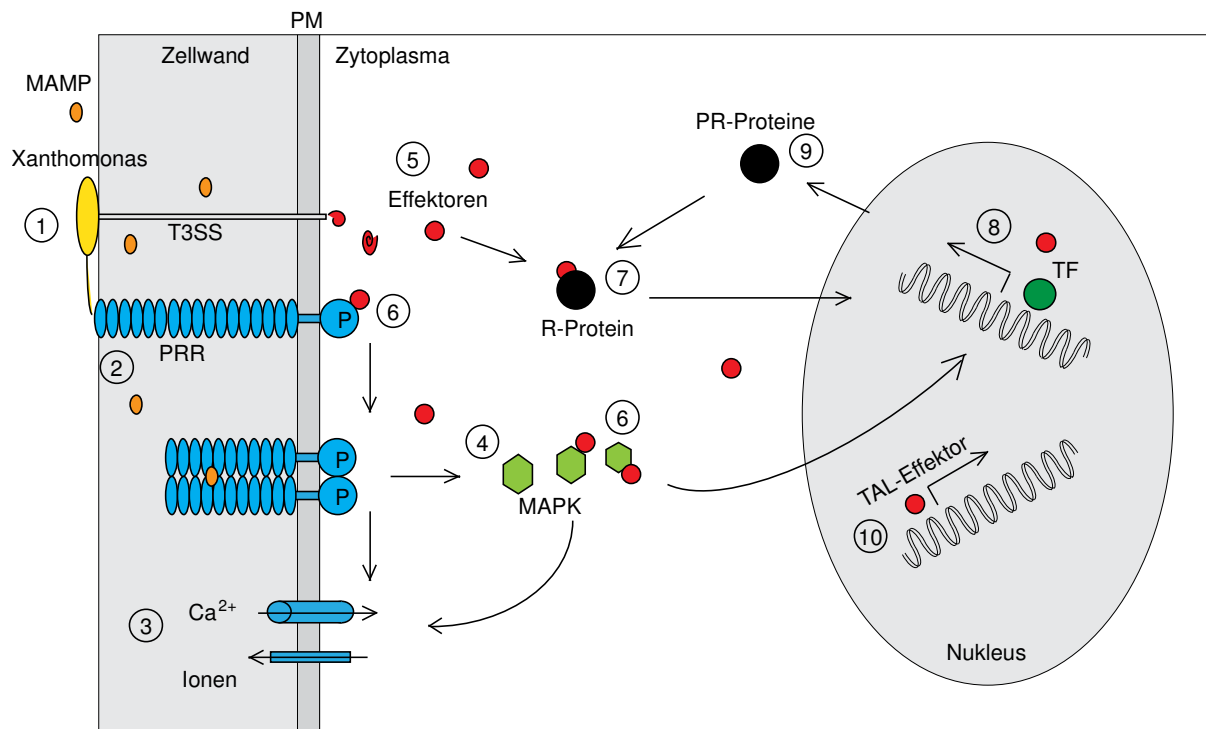
### 1.1 Pflanzliche Resistenzmechanismen gegen mikrobielle Pathogene

Um Phytopathogene erfolgreich abzuwehren, haben Pflanzen im Laufe der Evolution verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt. Passive Schutzmechanismen bilden hierbei das Fundament, die durch anatomisch-morphologische Eigenschaften, wie z.B. Wachse oder Zellwandverdickungen, das Eindringen potentiell pathogener Mikroorganismen erschweren bzw. verhindern sollen. Dazu kommt die Basalabwehr mit membranständigen Immunrezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs). Sie erkennen typische Mikroorganismen bzw. Pathogen assoziierte molekulare Strukturen (*microbe-/pathogen-associated molecular patterns*, MAMPs/ PAMPs), wie z.B. Lipopolysaccharide oder Peptide des bakteriellen Flagellins und lösen eine Abwehrreaktion aus (Bittel und Robatzek, 2007; Ingle *et al.*, 2006). Die Erkennung nicht-eigener Strukturen wird als PAMP-induzierte Resistenz (PTI, *PAMP-triggered immunity*) bezeichnet (Boller und He, 2009; Jones und Dangl, 2006; Göhre und Robatzek, 2008). Die PAMP-erkennenden Proteine sind meist Rezeptor-Kinasen mit extrazellulären Leuzin-reichen Sequenzwiederholungen (*leucine rich repeats*, LRRs), welche als Ligandenbindestelle fungieren, sowie einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne für die Signalweiterleitung (Bittel und Robatzek, 2007).

Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt häufig über mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden (Asai *et al.*, 2002; Boller und He, 2009; Göhre und Robatzek, 2008; Jonak *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001; Nürnberger und Scheel, 2001; Pedley und Martin, 2005; Zhang *et al.*, 2007), sowie WRKY-Proteine und andere Transkriptionsfaktoren (TFs) (Asai *et*

*al.*, 2002; Eulgem, 2005; Eulgem und Somssich, 2007) und resultiert in einer veränderten Expression zahlreicher pflanzlicher Gene (Bittel und Robatzek, 2007; Göhre und Robatzek, 2008; Nürnberger und Scheel, 2001). Andere Möglichkeiten der Signalweiterleitung sind z.B. Ionenflüsse über die Plasmamembran (insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ ), Signalmoleküle wie Stickstoffmonoxid oder Ethylen. Auch dies bewirkt letztlich eine Änderung der Transkription zahlreicher Gene (Bittel und Robatzek, 2007; Göhre und Robatzek, 2008; Nürnberger und Scheel, 2001). Die induzierte Basalabwehr resultiert in der Verstärkung der pflanzlichen Zellwände durch Einlagerung von Kallose, Lignin und phenolischen Verbindungen, was diese vor dem Abbau durch das Pathogen bewahrt bzw. dessen Eindringen verhindert, aber auch in der Neusynthese antimikrobieller Substanzen wie reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Phytoalexinen und PR-Proteinen (*pathogenesis-related*) (Abbildung 1-1) (Bittel und Robatzek, 2007; Fritig *et al.*, 1998; Göhre und Robatzek, 2008; Greenberg, 1997).

Im Laufe der Koevolution mit dem pflanzlichen Wirt haben Pathogene Effektorproteine entwickelt, um die PTI der Pflanze zu umgehen bzw. Resistenzreaktionen zu unterdrücken (Abramovitch *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Zhou und Chai, 2008). Die sogenannte Effektorausgelöste Suszeptibilität (ETS, *effector triggered susceptibility*) ist die Folge (Jones und Dangl, 2006). Im Gegenzug haben manche Pflanzen Resistenzgene (*R*-Gene) entwickelt, welche die spezifische Erkennung bakterieller Effektoren ermöglichen. Diese Form der Resistenz wird als Effektor-induzierte Immunität (ETI, *effector-triggered immunity*) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Als Folge der ETI kommt es in resistenten Pflanzen meist zu einem schnellen lokalen Zelltod, der hypersensitiven Reaktion (HR) (Coll *et al.*, 2011; Greenberg und Yao, 2004). Trotz der *R*-Gen-vermittelten Erkennung sind einige Pathogene in der Lage, die ETI zu vermeiden bzw. zu unterdrücken, indem sie die Elizitoren der ETI mutagenisieren oder neue Effektorgene evolvieren (Jones und Dangl, 2006; Zhou und Chai, 2008). Für diese immunsuppressiven Effektoren kann es auf Seiten des Wirts wiederum korrespondierende *R*-Gene geben, welche die ETI vermitteln. Diese Wirt-Pathogen-Interaktion gleicht einem Wettrüsten zwischen Wirt und Pathogen, der als sogenanntes Zick-Zack-Modell dargestellt werden kann (Abbildung 1-2), (Boller und He 2009; Jones und Dangl, 2006).



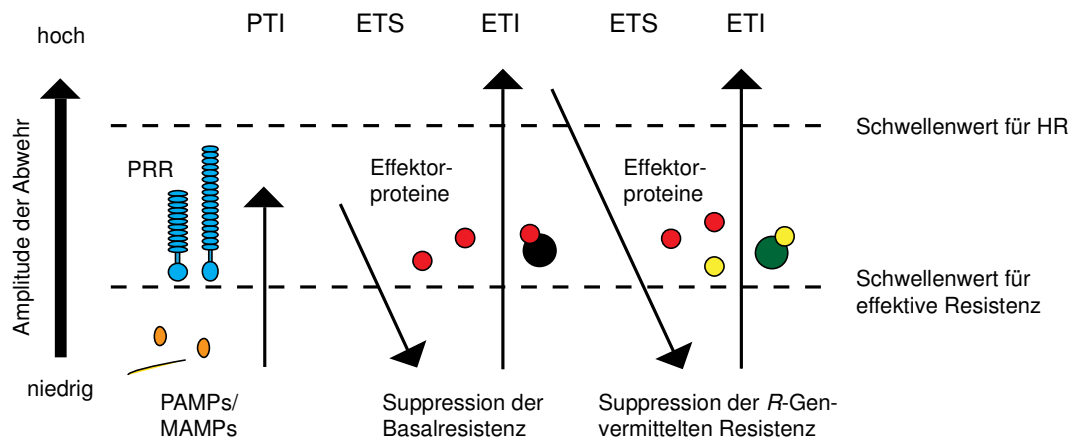
**Abbildung 1-1: Bakterielle Effektoren verändern die Abwehrmechanismen und die Signalweiterleitung in der Pflanzenzelle.** 1) Bakterien (gelb) dringen über Spaltöffnungen und Wunden in den Apoplasten ein und vermehren sich außerhalb der Pflanzenzellen. MAMPs (orangefarbene Ellipsen) werden durch bakterielles Wachstum, Sekretionsprodukte oder sterbende Bakterien freigesetzt. 2) Die Erkennung der MAMPs erfolgt an PRR-Proteinen (blau) und bewirkt u.a. 3) Ionenflüsse. Die Signalweiterleitung ist angewiesen auf Kalziumflüsse und bewirkt 4) die Aktivierung der MAPK-Kaskaden (grüne Sechsecke). 5) Die pathogenen *Xanthomonas* spp. können über spezielle Transportsysteme, wie das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) Effektoren (rot) in die Wirtszelle einschleusen. 6) Diese Effektoren können in die Aktivierung der Rezeptoren oder in die Signalweiterleitung eingreifen. 7) Andererseits können Effektoren von R-Proteinen erkannt werden, welche die Geninduktion weiterer Gene stimulieren, bzw. können Effektoren direkt Transkriptionsfaktoren (TF) aktivieren (8). Die Geninduktion wird ebenfalls durch die MAPK-Kaskaden gesteuert (4). Die Expression bestimmter Gene führt u.a. zur verstärkten Synthese von PR-Proteinen (9). 10) Die Induktion spezifischer Gene kann auch durch eine besondere Klasse von Effektoren, den TAL-Effektoren, direkt stimuliert werden. Bei diesen Zielgenen handelt es sich meist um Suszeptibilitätsgene. Diese ermöglichen den Befall des pflanzlichen Wirts und sind nötig für das Wachstum und die Verbreitung der Xanthomonaden (Yang *et al.*, 2006).

## 1.2 Phytopathogene der Gattung *Xanthomonas* spp.

Die Gattung *Xanthomonas* spp. umfasst eine der größten Gruppen phytopathogener Bakterien und wird in die  $\gamma$ -Proteobakterien eingeordnet (Büttner und Bonas, 2009; Cutino-Jimenez *et al.*, 2009). Diese Gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterien sind obligat aerob, meist polar monotrich begeißelt und sind von dem extrazellulären Polysaccharid Xanthan umgeben (Becker *et al.*, 1998; Bradbury, 1984; Dye *et al.*, 1959). Mitglieder der Gattung *Xanthomonas* sind in der Lage, ein breites Spektrum an Wirtspflanzen zu befallen, darunter viele ökonomisch wichtige Kulturpflanzen, wie Reis, Tomate, Paprika, Zwiebel, Kohl, Zitrus,



Banane, Soja und Maniok (Tabelle 1-1), (Banito *et al.*, 2008; Brunings und Gabriel, 2003; Delannoy *et al.*, 2005; Fargier *et al.*, 2011; Hayward *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2008; Stall *et al.*, 2009; White und Yang, 2009; Zhao *et al.*, 2000). Einzelne Stämme sind sehr wirtsspezifisch und aufgrund dessen wurden die Xanthomonaden in Pathovarenitäten (pv.) unterteilt (Rademaker *et al.*, 2005; Vauterin *et al.*, 1990; Vauterin *et al.*, 2000).



**Abbildung 1-2: Zick-Zack-Modell der Ko-Evolution von Pflanzen und Pathogenen.** Im ersten Schritt erfolgt die Rezeptor (PRR)-vermittelte Erkennung von PAMPs bzw. MAMPs und die Induktion der Basalabwehr (PAMP-induzierte Immunität, PTI). Dadurch wird das Wachstum und die Verbreitung des Pathogens innerhalb der Wirtspflanze eingeschränkt. Im zweiten Schritt translozieren einige Pathogene Effektorproteine in die pflanzliche Zelle, wodurch die Basalabwehr unterdrückt werden kann (Effektor-induzierte Suszeptibilität, ETS). Im dritten Schritt haben Pflanzen *R*-Gene evolviert, die eine spezifische Erkennung einzelner Effektoren vermitteln und eine verstärkte Abwehrreaktion auslösen (Effektor-induzierte Immunität, ETI), häufig in Form der HR. Dadurch wird die Verbreitung der Pathogene verhindert. Im vierten Schritt ermöglicht der Verlust oder die Modifikation bzw. der Neuerwerb von Effektoren dem Pathogen die Suppression der *R*-Gen-vermittelten Abwehr (ETS) und damit erneut die Kolonisierung der Pflanze. Durch die Entwicklung neuer *R*-Gene ist die Pflanze wiederum in der Lage, neuerworbene Effektoren der Pathogene zu erkennen und eine Abwehrreaktion zu initiieren (ETI). Die Abbildung wurde verändert nach Jones und Dangl, 2006.

Die unterschiedlichen Xanthomonas-Pathovaren besitzen für ihre Pathogenität eine homologe Waffe, das sogenannte Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) (Bonas *et al.*, 1991). Das T3SS wird von dem chromosomalen *hrp*-Gencluster (*hrp*, HR und Pathogenität) kodiert und umfasst mehr als 20 Gene (Büttner und Bonas, 2002). Die Deletion der T3SS-kodierenden DNA-Abschnitte führte zum Verlust der Pathogenität der Xanthomonaden (Bonas *et al.*, 1991). Über das T3SS werden bakterielle Proteine, darunter die sogenannten Effektorproteine oder Effektoren, direkt aus dem Zytoplasma des Bakteriums durch die Zellwand und Plasmamembran in das pflanzliche Zytoplasma injiziert (Büttner und He, 2009).

Die translozierten Effektorproteine haben eine Reihe von Namen erhalten, dazu zählt Hop (für Hrp *outer protein*), Xop (*Xanthomonas outer protein*), Pop (*Pseudomonas outer protein*, welche *Ralstonia solanacearum* Proteine sind, basierend auf dem früheren Gattungsnamen) und Avr (für Avirulenz). Diverse dieser genannten Proteine wurden ursprünglich, basierend auf deren Eigenschaft den Wirtsbereich des Pathogens einzuschränken, gefunden (Espinosa und Alfano, 2004). Effektorproteine sind z.B. in *X. oryzae* pv. *oryzae* erforderlich für das Wachstum und die Verbreitung der Xanthomonaden (Yang *et al.*, 2006).

**Tabelle 1-1: Wirts- und Krankheitsübersicht ausgelöst durch *Xanthomonas*-Stämme und die Verbreitung von TAL-Effektoren in den verschiedenen *Xanthomonas*-Pathovarietäten**

<i>Xanthomonas</i> -Stamm	Wirt	Krankheit	TAL-Effektoren <sup>a</sup>	Quelle
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ( <i>Xoo</i> )	Reis	Weißblättrigkeit	7-16	(White und Yang, 2009)
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> ( <i>Xoc</i> )	Reis	bakterielle Streifenkrankheit	12-28	(White und Yang, 2009)
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( <i>Xcv</i> )	Paprika ( <i>Capsicum</i> spp.) und Tomate ( <i>Lycopersicon</i> spp.)	bakterielle Fleckenkrankheit ( <i>bacterial spot disease</i> )	0-1	(Stall <i>et al.</i> , 2009)
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i> ( <i>Xca</i> )	Brassicaceen (auch <i>Arabidopsis thaliana</i> ) Fabaceen, Solanaceen	bakterielle Fleckenkrankheit ( <i>bacterial spot disease</i> )	0-3	(Fargier <i>et al.</i> , 2011; Hayward <i>et al.</i> , 1993; Zhao <i>et al.</i> , 2000)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ( <i>Xac</i> )	verschiedenen Citrus-Arten	Zitruskrebs ( <i>citrus canker</i> )	1-4	(Brunings und Gabriel, 2003)
<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> ( <i>Xcm</i> )	Baumwolle	Eckige Blattfleckenkrankheit ( <i>angular leaf spot</i> )	6-10	(Delannoy <i>et al.</i> , 2005)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ( <i>Xag</i> )	Sojabohne	bakterielle Pustelkrankheit	1	(Park <i>et al.</i> , 2008)
<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	Maniok	Weißblättrigkeit ( <i>bacterial blight</i> )	≥1 <sup>b</sup>	(Banito <i>et al.</i> , 2008)

<sup>a</sup> Die Anzahl der TAL-Effektoren pro Stamm wurden mittels *Southern blot* oder durch Analyse der Genomsequenz ermittelt. Der *Southern blot* zeigt nicht, ob *TAL-Effektor*-Gene Pseudogene sind und identifiziert vielleicht nicht alle Allele. Weitere Informationen über das *Xanthomonas*-Genom und TAL-Effektoren sind unter [www.xanthomonas.org](http://www.xanthomonas.org) and [cmr.jcvi.org](http://cmr.jcvi.org) abrufbar.

<sup>b</sup> Die Sonde gab im *Southern blot* mehrere Banden, beinhaltet aber das *TAL-Effektor*-Gen und angrenzende Sequenzen, was eine Bestimmung der Allel-Anzahl verhindert.

### 1.3 Die AvrBs3-/TAL-Effektor-Familie

AvrBs3 gehört zu den Effektorproteinen aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) und ist der erste Vertreter einer bedeutenden Familie von homologen Effektorproteinen aus *Xanthomonas* spp., die als AvrBs3-, AvrBs3/PthA- oder neuerdings als TAL- (TAL, *transcription activator-like*) Effektorfamilie betitelt wird.

AvrBs3 wurde 1989 aufgrund seiner Fähigkeit isoliert, eine Resistenzreaktion in Paprikapflanzen, welche das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* besitzt, auszulösen (Bonas *et al.*, 1989; Büttner und Bonas, 2009; Römer *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2009a). Nähere Untersuchungen ergaben, dass AvrBs3 konstitutiv exprimiert (Knoop *et al.*, 1991), über das T3SS sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert wird (Rossier *et al.*, 1999; Szurek *et al.*, 2002).

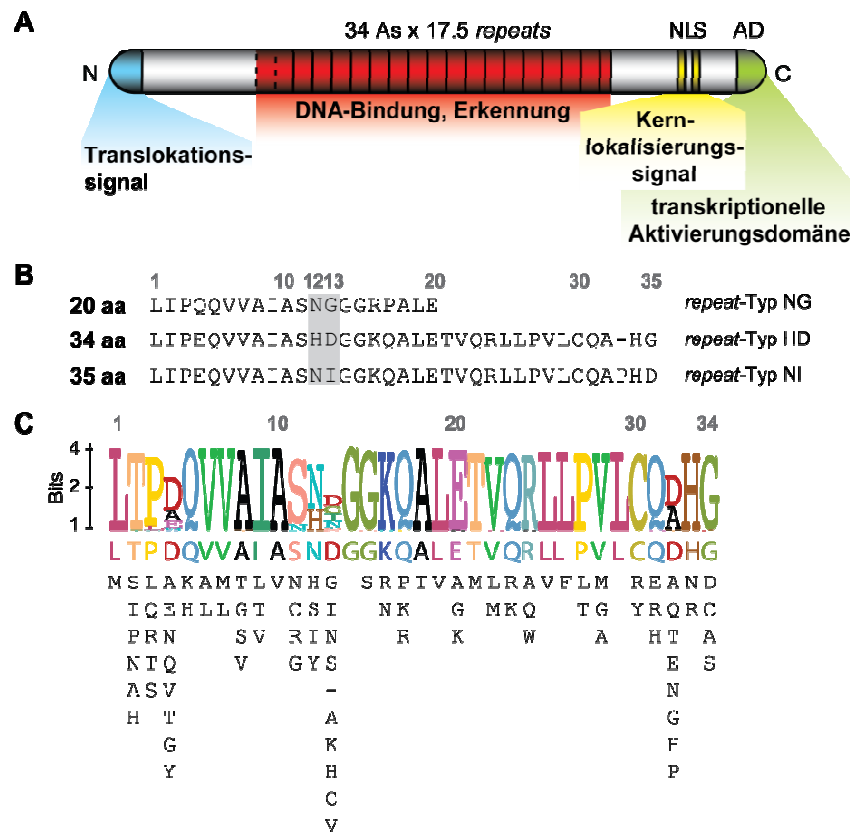
Es konnte gezeigt werden, dass AvrBs3 spezifisch die Transkription sogenannter *UPA*- (*upregulated by AvrBs3*) Gene in Paprika stimuliert (Kay *et al.*, 2007; Marois *et al.*, 2002; Römer *et al.*, 2007). In Promotorstudien konnte ein für die Induktion essentieller Bereich, die sogenannte *UPA*-Box, eingegrenzt werden (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Die Geninduktion durch AvrBs3 wird zum Teil unabhängig von der pflanzlichen Proteinneusynthese induziert, was eine direkte Aktivierung der Gene durch den Effektor vermuten lässt (Kay *et al.*, 2009; Marois *et al.*, 2002). Auch konnte für AvrBs3-Homologe aus *Xoo* die Induktion von Genen in Reis gezeigt werden (Gu *et al.*, 2005; Sugio *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006). Somit agieren Effektoren der AvrBs3-Familie als spezifische Transkriptionsfaktoren zur Transkriptionsinitiation pflanzlicher Gene (Kay und Bonas, 2009), deswegen werden diese Proteine inzwischen als TAL-Effektoren bezeichnet.

Die TAL-Effektoren sind eine besondere Klasse der *Xanthomonas*-Effektoren und zeichnen sich durch hohe Sequenzübereinstimmungen von 80 bis 97 % aus (Boch und Bonas, 2010; Bogdanove *et al.*, 2010; Schornack *et al.*, 2006). Weniger hoch konservierte Mitglieder dieser Effektorfamilie wurden vor kurzem in *R. solanacearum* entdeckt (Cunnac *et al.*, 2004; Heuer *et al.*, 2007; Mudgett, 2005). TAL-Effektorproteine sind besonders zahlreich in den Stämmen von *X. campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) vertreten (Scholze und Boch, 2011). Dabei variiert die Anzahl der TAL-Effektorproteine in den verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen von null bis 28 (Tabelle 1-1).

### 1.3.1 Struktureller Aufbau von TAL-Effektorproteinen

TAL-Effektoren aus *Xanthomonas* spp. sind alle ähnlich aufgebaut, sie besitzen im N-terminalen Bereich das Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal, welches den Transport in die Wirtszelle vermittelt (Arnold *et al.*, 2009; Samudrala *et al.*, 2009). Im C-terminalen Bereich besitzen sie Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localisation signal*) und eine saure Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD), die ein typischer Bestandteil eukaryotischer Transkriptionsfaktoren sind (Gürlebeck *et al.*, 2006; Szurek *et al.*, 2001). In der zentralen Region der TAL-Effektoren befindet sich eine konservierte Struktur von nahezu identischen Sequenzwiederholungen, den sogenannten „*repeats*“ (Bonas *et al.*, 1989), (Abbildung 1-3). Anzahl und Anordnung der *repeats* bestimmen die Spezifität der TAL-Effektoren in Bezug auf ihre Virulenzfunktion (Marois *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1994; Yang und Gabriel, 1995b; Yang *et al.*, 2005) und auch die Erkennung in resistenten Pflanzen (Chakrabarty *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2005; Herbers *et al.*, 1992; Römer *et al.*, 2007; Yang und Gabriel, 1995a; Zhu *et al.*, 1998).

Mit Hilfe der NLS erfolgt der Transport aus dem Zytoplasma in den pflanzlichen Zellkern (Szurek *et al.*, 2002; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2005; Yang und Gabriel, 1995b). Die AD der TAL-Effektoren bewirkt die Aktivierung der Transkription von Genen in Reporteraktivitätstests (Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999), vermutlich über die Interaktion mit dem eukaryotischen Transkriptionsapparat (Ptashne und Gann, 1997). Beide Komponenten (NLS und AD) sind sowohl essentiell für die Funktionen von AvrBs3 und homologer Effektoren, als auch für die Resistenzgen-vermittelte Erkennung in resistenten Pflanzen (Fujikawa *et al.*, 2006; Gabriel, 1997; Marois *et al.*, 2002; Szurek *et al.*, 2001; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1998). Die Erkennung von TAL-Effektoren stellt eine Besonderheit dar, denn die Erkennung erfolgt nicht über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen [Rezeptor-Ligand-Modell (Deslandes *et al.*, 2003)] oder indirekte Protein-Protein-Wechselwirkungen [*guard*- (Wächter) Modell (Mackey *et al.*, 2002) und *decoy*- (Falle) Modell (Van der Hoorn und Kamoun, 2008)]. TAL-Effektoren induzieren, wie der Name sagt, die Transkription von spezifischen Zielgenen, jedoch induzieren TAL-Effektoren nicht nur die Suszeptibilitätsgene, sondern auch Resistenzgene. Die Resistenzgenprodukte lösen dann die spezifische Abwehrreaktion aus. Im Falle von AvrBs3/Bs3 erfolgt die Ausbildung einer schnellen Zelltodreaktion in Paprika bzw. bei AvrXa27/Xa27 einer Resistenzreaktion in Reis (Gu *et al.*, 2005; Römer *et al.*, 2007).



**Abbildung 1-3: Der Aufbau von TAL-Effektoren.** **A)** Modellhafte Darstellung von AvrBs3, die unterschiedlichen Proteinregionen sind verschiedenfarbig dargestellt und beschriftet. **B)** Darstellung der Aminosäuren (As) von einem halben *repeat* (20 As), einem 34 As umfassenden *repeat* und einen 35 As umfassenden *repeat*. Der *repeat*-Typ ist angegeben, die grau unterlegten Bereiche markieren die hypervariablen As. **C)** As-Konservierung innerhalb der *repeats*. Die Abbildung wurde verändert nach Boch und Bonas 2010 und mit weblogo erstellt.

Die Erkennung des Effektors AvrBs4 aus *Xcv*, der zu 97% identisch zu AvrBs3 ist, stellt eine Ausnahme der TAL-Effektoren dar, da er unabhängig von NLS und AD im Zytosol durch das TIR-NB-LRR-Resistenzprotein Bs4 in resistenten Tomatenpflanzen erkannt wird (Ballvora *et al.*, 2001; Schornack *et al.*, 2004). Die Erkennung erfolgt auch bei verkürzten AvrBs4-Derivaten, die nur noch den N-Terminus und die ersten 5,5 *repeats* beinhalten (Schornack, Dissertation 2006). Allerdings ist Bs4 auch in der Lage die AvrBs3-Homologen Hax3 und Hax4 zu erkennen und bei der Expression dieser Effektoren in Tomate eine Resistenzreaktion auszulösen (Kay *et al.*, 2005; Schornack *et al.*, 2005). Bs4 erkennt die homologen TAL-Effektoren vermutlich über Protein-Protein-Wechselwirkungen und dies erschwert Studien über TAL-Effektor-induzierte Gene in diesen resistenten Tomatenpflanzen.

### 1.3.2 Charakteristik der *repeats*, eine neue DNA-Bindedomäne

Bei den meisten TAL-Effektoren besteht ein einzelner *repeat* aus 34 Aminosäuren (As), die Anzahl der *repeats* ist meist ungerade und den Abschluss bildet ein sogenannter halber *repeat* mit 20 As. Die *repeats* können sich 1,5 bis 33,5 Mal wiederholen, wobei die *repeat*-Anzahl von 15,5, 17,5 und 19,5 interessanterweise dominiert (Boch und Bonas, 2010). Neben den 34-As-*repeats* wurden Proteine mit 35 As pro *repeat* beschrieben, z.B. Hax2 aus *Xca* (Kay *et al.*, 2005) oder Brg11 aus *R. solanacearum* (Cunnac *et al.*, 2004). Weiterhin wurden auch vereinzelte 33-As-*repeats* in einer ansonsten 34-As-*repeat* beinhaltenden *repeat*-Region gefunden, hierzu zählen PthXo1, PthXo6, PthXo7, AvrXa27 und AvrXa7 (White und Yang, 2009; Yang und White, 2004). Die Zusammensetzung der *repeat*-Region mit unterschiedlich langen *repeats* variiert je nach Effektor, z.B. besitzt AvrXa7 aus *Xoo* vier Mal 33 As, 21 Mal 34 As und einmal 39 As (Yang *et al.*, 2000) und AvrHah1 aus *X. gardneri* viermal 34 As und neunmal 35 As (Schornack *et al.*, 2008). Die *repeats* sind hochkonserviert und fast identisch, wobei wenige Variationen vorkommen. Die größte Varianz innerhalb eines *repeats* bilden die As-Positionen 12 und 13, diese sind hypervariabel (Abbildung 1-3,B & D). Die Zusammenstellung der hypervariablen As, welche auch als RVDs (*repeat variable diresidue*) bezeichnet werden, ist abhängig vom Pathogen. Es gibt dabei sehr häufige, aber auch seltene bis einmalige Kombinationen (Abbildung 1-4).

Es konnte gezeigt werden, dass der TAL-Effektor AvrXa7 aus *Xoo* *in vitro* an doppelsträngige DNA bindet. Dabei wurde eine AT-reiche Sequenz bevorzugt, jedoch keine spezifische Sequenz gefunden (Yang *et al.*, 2000). Spätere EMSA-Studien zeigten, dass AvrBs3 aus *Xcv* ebenso *in vitro* an DNA binden kann (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2009b). AvrBs3 bindet dabei spezifisch den DNA-Bereich um die TATA-Box im *UPA20*- und *Bs3*-Promotor, die sogenannte *UPA*-Box (Kay *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2007). EMSA-Untersuchungen mit Deletionsvarianten von AvrBs3 zeigten, dass die spezifische Bindung der *UPA*-Box-Region von *UPA20* *in vitro* auch mit einer Proteinvariante möglich war, in der nur die *repeat*-Region vorhanden, aber N- und C-Terminus deletiert waren (Kay *et al.*, 2007). Das AvrBs3-Derivat mit deletierter *repeat*-Region hingegen war nicht in der Lage zu binden (Kay *et al.*, 2007). Die *repeats* von AvrBs3 fungieren somit als DNA-Bindedomäne.

Auch konnte die spezifische Geninitiation durch AvrBs3 *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* mittels *yeast one hybrid* (Y1H) durch die Insertion der *UPA*-Box-Bereichs von *UPA20* in den

Promotor vor ein wachstumsregulatorisches Gen gezeigt werden (Kay *et al.*, 2009). Damit wurde zum ersten Mal die Bindung eines TAL-Effektors an DNA *in vivo* gezeigt und dass die Geninduktion auch in einem anderen Organismus erfolgen kann.





			As 12	As 13	Häufigkeit	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (1,119)	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (475)	andere <i>Xanthomonas</i> pvs. (429)
	I	391	X	X	X			
	G	334	X	X	X			
	N	312	X	X	X			
	S	163	X	X	X			
	-	138	X	X	X			
	D	12	X	X				
	K	6	X	X				
	C	3			X	X		
	V	2	X					
	A	1			X			
H	1			X				
	D	527	X	X	X			
	G	106	X	X				
	A	6			X			
	-	4	X					
	H	4			X			
	I	4	X					
N	2			X				
	-	2	X					
	N	1			X			
	S	1	X					
	G	2					X	
	Y	1			X			

Abbildung 1-4: Übersicht der unterschiedlichen *repeat*-Typen und deren Häufigkeit sowie Vorkommen in *Xanthomonas* spp. Abbildung verändert nach Boch und Bonas 2010.

#### 1.4 Induktion pflanzlicher Gene durch TAL-Effektoren

TAL-Effektoren stellen eine besondere Klasse der *Xanthomonas*-Effektoren dar. TAL-Effektoren sind in der Lage DNA-Abschnitte zu binden und die Transkription zu induzieren (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Welchen Vorteil hat die Manipulation der Wirtstranskription für das Bakterium? Vermutlich induzieren TAL-Effektoren Suszeptibilitätsgene, diese ermöglichen den Befall des pflanzlichen Wirts und sind nötig für das Wachstum und die Verbreitung der *Xanthomonaden* (Yang *et al.*, 2006). Durch die

Manipulation von Zuckertransportern wird zudem die Nährstoffversorgung der apoplastisch lebenden Xanthomonaden gefördert (Chen *et al.*, 2010). 2010 wurde eine neue Klasse von Membran-durchspannenden Zuckertransportern, die SWEET-Proteinfamilie, in *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Chen *et al.*, 2010). Os8N3 und Os11N3 aus Reis, deren Gene durch die TAL-Effektoren PthXo1 und AvrXa7 aus *Xoo* induziert werden (Antony *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006), wurden dabei als Homologe der SWEETs beschrieben (Chen *et al.*, 2010). Interessanterweise weisen Os8N3 und Os11N3 Homologie zur MtN3-Familie auf, zu denen die Noduline aus *Medicago truncatula* zählen (Gamas *et al.*, 1996). Zu den Nodulinen gehören ebenso Membranproteine, die am Stickstofftransport beteiligt sind (Hirsch *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2007). Somit scheint ein Ziel der Manipulation des Wirtstranskriptoms die Versorgung des Pathogens zu sein.

Durch die Induktion von *UPA*-Genen durch AvrBs3 in anfälligen Wirtspflanzen konnte die Ausbildung einer Hypertrophie als Phänotyp gezeigt werden (Marois *et al.*, 2002). 2007 wurde das korrespondierende Suszeptibilitätsgen *UPA20* identifiziert (Kay *et al.*, 2007). Man kann mutmaßen, dass durch die Induktion des übermäßigen Zellwachstums bei der Hypertrophie die Wirtszellen zum Platzen gebracht werden sollen und so die Versorgung des Pathogens durch die freigesetzten Zellbestandteile gewährleistet wird. Jedoch weisen Suszeptibilitätsgene zumeist keinen makroskopisch sichtbaren Phänotyp auf und sind deswegen meistens schlechter als Resistenzgene erforscht.

Für einige *Xoo* TAL-Effektoren wie z.B. PthXo6, PthXo7 und PthXo8 wurden *OsTFX1*, *OsTFIIAγ1* und *OsHen1* als mögliche Suszeptibilitätsgene identifiziert (Ryan *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2007). Kürzlich konnte für PthXo6 die direkte Bindung an einen Abschnitt der *OsTFX1*-Promotorsequenz gezeigt werden (Römer *et al.*, 2010), für PthXo7 und PthXo8 noch nicht. Interessant ist, dass *OsTFX1* für einen bZIP-TF und *OsTFIIAγ1* für die kleine Untereinheit des TFIIA kodieren (Sugio *et al.*, 2007). Ein Homolog des *OsTFIIAγ1*, *OsTFIIAγ5*, wurde bereits 2006 als Allel des *R*-Gens *xa5* identifiziert (Jiang *et al.*, 2006). Der TFIIA stabilisiert die Bindung des TBP-TFIID-Komplexes (Hieb *et al.*, 2007), somit ist auch eine Regulation von Teilen der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie durch TAL-Effektoren denkbar. Das Suszeptibilitätsgen *UPA20* aus Paprika codiert ebenfalls für einen TF, der eine Homologie zu der bHLH-Familie aufweist (Kay *et al.*, 2007). Somit konnte als ein direkt angesteuertes, pflanzliches Gen auch ein spezifischer TF identifiziert werden, über den ggf. regulatorisch in die pflanzliche Transkription eingegriffen wird.



Durch TAL-Effektoren können neben den Suszeptibilitätsgenen auch Resistenzgene induziert werden. Ein bekanntes Beispiel dafür ist *Bs3*. Dieses wird zusätzlich zu den *UPA*-Genen in resistenten Paprikaliniem induziert und daraufhin eine HR ausgelöst (Römer *et al.*, 2007). Auch durch den Effektor *AvrXa27* aus *Xoo* konnte in Reis eine *Xa27*-abhängige Resistenz ausgelöst werden, bei der Variante *xa27*, wo ein Promotor-Polymorphismus den genetischen Unterschied bedingt, hingegen nicht (Gu *et al.*, 2005). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass *AvrXa27* ebenfalls spezifisch an die Promotorsequenz von *Xa27* bindet und die Transkription initiiert (Römer *et al.*, 2007). Die direkte Induktion von *Xa27* durch *AvrXa27* konnte vor kurzem mittels transienten HR-Untersuchungen und die Bindung in EMSA-Studien gezeigt werden (Römer *et al.*, 2009b). Für die Effektoren *AvrXa7* und *AvrXa10* wurden 1992 die Resistenzgene *Xa7* und *Xa10* beschrieben (Hopkins *et al.*, 1992) und 2007 konnte für *Xa10* die genaue Genom-Position bestimmt werden (Gu *et al.*, 2007). Die Untersuchung von *R*-Genen ist dank eines markanten Phänotyps leichter und es wurden bereits viele erfolgreich kloniert (Chu *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 1992; Römer *et al.*, 2007). Jedoch ist die Identifikation von Suszeptibilitätsgenen auch ein spannendes Feld, denn die Anzahl der TAL-Effektor-angesteuerten Suszeptibilitätsgene ist wahrscheinlich bedeutend größer, als die der Resistenzgene. Durch die Erforschung von TAL-Effektor-induzierten Genen erhofft man eine Größenordnung der induzierten und damit manipulierten Gene zu bestimmen, um regulatorische Wege im Wirtstranskriptom zu verstehen.

### 1.5 Die Regulation der Transkription im Eukaryoten und der potentielle Einfluss der TAL-Effektoren

TAL-Effektoren induzieren die Transkription von Suszeptibilitäts- oder Resistenzgenen im pflanzlichen Wirt. Jedoch sind TAL-Effektoren bakterielle Proteine. Wie können sie die eukaryotische Transkription manipulieren bzw. induzieren? Vermutlich fungieren die TAL-Effektoren wie eukaryotische TFs und sind so in der Lage die Rate der Genexpression erhöhen.

Die Transkription im Eukaryoten ist komplexer als im Prokaryoten, Eukaryoten besitzen dabei drei RNA-Polymerasen. Die proteinkodierenden Gene werden von der RNA Polymerase II transkribiert (Knippers, 2006). Um diese Gene zu transkribieren, müssen verschiedene Prozesse voran gehen, dazu zählen die Dekondensation des zu transkribierenden DNA-Abschnittes, Nukleosom-Neuanordnung, Histon-Modifikationen, Binden der

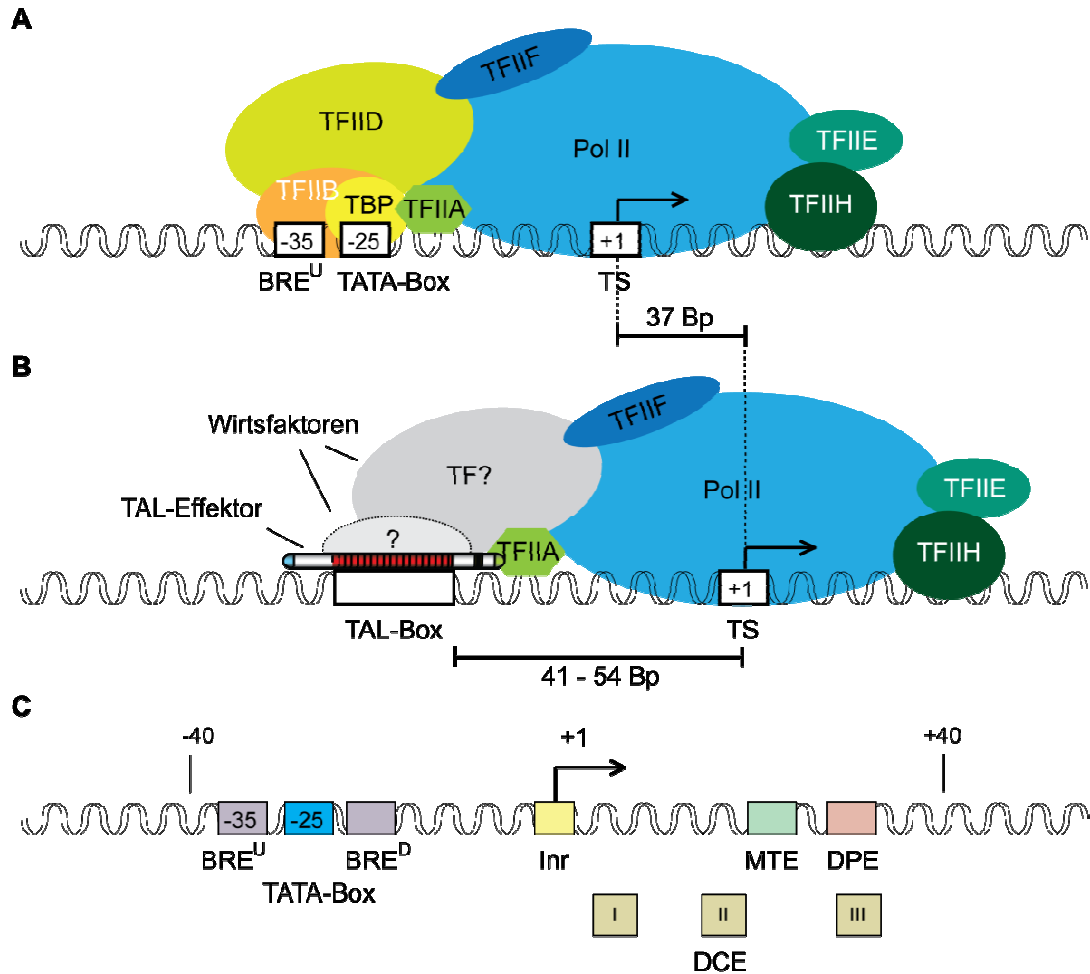
transkriptionellen Aktivatoren und Ko-Aktivatoren an *enhancer*- und Promotorsequenzen und das Rekrutieren der basalen Transkriptionsmaschinerie zum *core*-Promotor (Smale und Kadonaga, 2003). Der *core*-Promotor ist das Kernstück eines Promotors und beinhaltet DNA-Elemente, welche sich bis zu 35 Bp proximal oder distal der Transkriptionsinitiationsstelle erstrecken. Die meisten der *core*-Promotorelemente scheinen direkt mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie zu interagieren. Zur basalen Transkriptionsmaschinerie zählen die RNA Polymerase II (Pol II) und die generellen Transkriptionsfaktoren (GTF), die minimal benötigt werden und essentiell sind für die *in vitro*-Transkription an isolierten *core*-Promotoren (Smale und Kadonaga, 2003; Krishnamurthy und Hampsey, 2009; Kornberg, 2007).

Durch die GTFs werden die regulatorischen Promotorsequenzen erkannt und die Transkription initiiert, dies geschieht nicht durch die Pol II. Diese übernimmt das Ab- und Rückspulen der DNA und die Synthese der mRNA (Kornberg, 2007). Die TATA-Box ist ein wichtiges *core*-Promotor-Element, durch das ein stabiler Präinitiationskomplex (PIC) am *core*-Promotor geformt werden kann. Für die Bildung des PIC binden die GTFs und die Pol II in der folgenden Reihenfolge: TFIID/TFIIA, TFIIB, Pol II, TFIIF, TFIIE und zuletzt TFIIH (Smale *et al.*, 2003; Kornberg, 2007). Das TATA-Bindeprotein (TBP), eine Untereinheit des TFIID, erkennt und bindet die TATA-Box. Dadurch wird die DNA gebogen und die Formung des PIC beginnt. Dies geschieht durch DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktion (Müller *et al.*, 2007; Krishnamurthy und Hampsey, 2009). Die Initiation der Transkription im Eukaryoten erfordert ein Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und der Aufbau bzw. die Stabilisierung des PIC wird durch TFs reguliert. Es gibt somit an verschiedenen Stellen der Transkriptionsinitiation die Möglichkeiten zur Regulation.

So interagiert z.B. der GTF TFIIA mit dem TBP und stabilisiert dessen Bindung an die TATA-Box (Abbildung 1-5, A), (Hieb *et al.*, 2007). Der TFIIA ist nicht immer essentiell für die Transkription, sondern besitzt eine gewisse Promotorspezifität (Hoiby *et al.*, 2007). Ein wichtiger Faktor ist dabei Xa5, die  $\gamma$ -Untereinheit des GTF TFIIA (Iyer und McCouch, 2004), für die gezeigt werden konnte, dass sie notwendig für die Funktionsweise der TAL-Effektoren in Reis ist (Gu *et al.*, 2009). Somit trägt *xa5* zur Stabilisierung des PIC bei, was bei TAL-Effektor-induzierten Promotoren wahrscheinlich zu einer Steigerung der Induktionsstärke führt.

Bei der Untersuchung von *UPA20*, der Homologie zu den TFs der bHLH-Familie aufweist (Kay *et al.*, 2007), wurde spekuliert, dass der korrespondierende TAL-Effektor AvrBs3 entweder die Funktion des TBP übernimmt und so die basale Transkriptionsmaschinerie rekrutiert (Abbildung 1-5, B) oder AvrBs3 als regulatorischer TF agiert und über indirekte Interaktionen mit den Komponenten oder dem Mediator die basale Transkriptionsmaschinerie rekrutiert (Abbildung 1-5, C), (Kay, 2008). Dabei wurde festgestellt, dass bei Induktion durch AvrBs3 im Gegensatz zur Basalexpression der Transkriptionsstart um 37 Bp in stromabwärts verschoben wird (Kay, 2008). Auch in parallelen Arbeiten konnte eine Verschiebung des Transkriptionsstarts in Abhängigkeit des eingesetzten TAL-Effektors beobachtet werden. Dabei begann der Transkriptionsstart immer 41 bis 54 Bp nach der Bindestelle des TAL-Effektors, egal wo diese im Promotor inseriert war (Abbildung 1-5, C), (Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009a; Römer *et al.*, 2009b). Durch die Bindung von TAL-Effektoren wird somit der natürliche Transkriptionsstart verschoben, wobei die direkte oder indirekte Interaktion mit den TFs oder GTFs noch unbekannt ist.

Viele der derzeit bekannten Daten über die Promotorelemente wurden in Bäckerhefe, Fruchtfliege oder menschlichen Zelllinien gewonnen, so dass einige Elemente in Pflanzen abweichen können. Neben der TATA-Box als regulatorisches Element gibt es in Eukaryoten weitere *core*-Promotor-Elemente, die jedoch nicht gleichzeitig in einem Promotor vorkommen müssen (Abbildung 1-5, C). Dazu zählt ein TFIIB-Sequenzerkennungselement (BRE, TFIIB *recognition element*), bestehend aus einer G/C-reichen Sequenz (Smale *et al.*, 2003). Diese kann entweder proximal oder distal der TATA-Box liegen und wird je nachdem als BRE<sup>U</sup> (*upstream*, stromaufwärts) und BRE<sup>D</sup> (*downstream*, stromabwärts) bezeichnet. Je nach Promotorkontext können BRE<sup>U</sup> und BRE<sup>D</sup> positiv oder negativ agieren (Juven-Gershon *et al.*, 2008).



**Abbildung 1-5: Modellhafte Darstellung des Pol II-Präinitiationskomplex und der core-Promotor-Elemente.** **A)** Nativer Promotor während der Basalexpression. Die Assemblierung des Präinitiationskomplexes beginnt mit der Bindung des TATA-Bindeproteins (TBP), einer Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIID, die durch TFIIA stabilisiert wird. Nachfolgend binden die restlichen TFIID-Komponenten, TFIIB, die RNA-Polymerase II (Pol II) im Komplex mit TFIIF, sowie TFIIE und TFIIH. **A) - B)** Zur Vereinfachung wurden keine Untereinheiten der GTFs dargestellt. **B)** Der TAL-Effektor agiert als regulatorischer Transkriptionsfaktor. Der TAL-Effektor rekrutiert die basale Transkriptionsmaschinerie durch direkte oder indirekte Interaktion mit ihren Komponenten oder mit dem Mediator (hier nicht gezeigt). Der Präinitiationskomplex formiert sich unabhängig von der Bindung der TATA-Box durch das TBP. Ein wichtiger Faktor ist Xa5, die  $\gamma$ -Untereinheit des TFIIA, für die gezeigt wurde, dass sie notwendig für die Funktionsweise der TAL-Effektoren in Reis ist (Gu *et al.*, 2009). Eine direkte Interaktion zwischen TAL-Effektor und TFIIA $\gamma$ 5 wurde hierbei noch nicht gezeigt. Der Transkriptionsstart (TS) verlagert sich auf 41 bis 54 Bp nach der TAL-Box, unabhängig der vorhandenen TATA-Box. Beim Beispiel von AvrBs3, wo TAL-Box und TATA-Box überlagern, konnte eine Verschiebung des Transkriptionsstarts um 37 Bp gezeigt werden (Kay *et al.*, 2007). **C)** Übersicht einiger der bekannten core-Promotor-Elemente für die Transkription mit der RNA-Polymerase II. Es gibt keine universellen core-Promotor-Elemente, sie kommen nur teilweise in den core-Promotoren vor. Das Initiator-Element (Inr) ist wahrscheinlich das meist vorkommende Motiv im core-Promotor. Das Inr, motif ten element (MTE), downstream promoter element (DPE), downstream core element (DCE) und die TATA-Box sind Erkennungsstellen für die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIID. Dabei ist zu beachten, dass es unterschiedliche Formen des TFIID und TFIID-verwandte Proteinkomplexe gibt, die vermutlich mit dem core-Promotor interagieren. Die TFIIB recognition elements BRE<sup>U</sup> und BRE<sup>D</sup> interagieren mit dem TFIIB.

Ein weiteres häufig auftretendes Promotorelement im *core*-Promotor ist das Initiator-Element (Inr), welches am Transkriptionsstart lokalisiert ist, und wie die TATA-Box als Erkennungsstelle für die Bindung des TFIID dient (Smale *et al.*, 2003; Juven-Gershon *et al.*, 2008). Weitere Erkennungsstellen für die Bindung des TFIID sind neben der TATA-Box und dem Inr, die distal des Inr liegenden Promotorelemente DPE (*downstream promoter element*), MTE (*motif ten element*) und das aus drei Unterelementen bestehende DCE (*downstream core element*) (Abbildung 1-5) (Juven-Gershon *et al.*, 2008).

Zudem sind in vielen Promotoren Pyrimidin-reiche Sequenzabschnitte zu finden (Civán und Švec, 2009; Yamamoto *et al.*, 2007a; Yamamoto *et al.*, 2007b). Jedoch zeigten im Reisgenom durchgeführte Mikroarray-Studien, dass diese Pyrimidin-reiche Sequenzen direkt nach den Erkennungssequenzen von TAL-Effektoren in den Promotorsequenzen der induzierten Genen vorkamen (Moscou und Bogdanove, 2009).

### 1.6 Das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren

Die minimale Bindesequenz von AvrBs3 im *UPA20*- bzw. *Bs3*-Promotor wurde in mehreren Studien eingegrenzt (Kay *et al.* 2007; Kay *et al.* 2009; Römer *et al.* 2007; Scholze, 2008). Ein Abgleich der RVDs von AvrBs3 mit der *UPA*-Box-Konsensus-Sequenz zeigte eine erstaunliche Korrelation der Aminosäurekomposition mit den Basenpaaren (Bp) der Box (Abbildung 1-6, B, C). Vergleich man weiterhin die RVDs verschiedener Effektoren aus AvrBs3-Familie von *Xcv* und *Xoo* mit den als wichtig eingegrenzten Promotorbereichen der induzierten Wirtsgene ließ sich aus dieser Verteilung ein Modell für die Sequenzspezifität der Effektoren ableiten (Abbildung 1-6, D), (Boch und Schornack, persönliche Mitteilung 2008; Boch *et al.*, 2009). Danach erkennen und binden immer die zwei hypervariablen Aminosäuren des *repeats* ein bestimmtes Basenpaar. Nach der Bindung des Effektors wird in Abhängigkeit der AD die Transkription initiiert.



### 1.7 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Sequenzspezifität von TAL-Effektoren zu untersuchen. Dabei sollte analysiert werden, ob nach dem Modell der Sequenzspezifität abgeleitete DNA-Sequenzen (Boxen) spezifisch von TAL-Effektoren erkannt und induziert werden. Auch wurde angestrebt die TAL-Effektor-vermittelte Induktion von Endogenen, die nach dem Modell der Sequenzspezifität vorhergesagte TAL-Boxen im Promotor aufwiesen, zu untersuchen. Weiterhin sollte die *repeat*-Region als DNA-Interaktionsdomäne spezifisch analysiert werden. Dabei wurde der Bereich der Zielsequenz der *repeat*-Region näher daraufhin untersucht, ob eine minimale Anzahl der *repeats* nötig ist und welche Spezifität die jeweiligen *repeat*-Typen aufwiesen. Mittels künstlich generierten TAL-Effektoren sollten neue *repeat*-Zusammensetzungen sowie deren neue Zielsequenzen erforscht werden und so die generelle Vorhersagbarkeit der TAL-Effektor-Erkennungssequenzen und die nachfolgend vermittelte Geninduktion gezeigt werden. Dabei wurde die Transkriptionsinitiation durch künstliche TAL-Effektoren sowohl an künstlichen Boxen als auch an Genen im natürlichen Kontext untersucht. Ein weiterer Bestandteil der Forschungsthematik war die Analyse, ob umgebende, insbesondere stromabwärtsgelegene Sequenzbereiche der Box einen Einfluss auf die Induktion durch einen TAL-Effektor aufwiesen. Ein weiterführendes Thema war die Untersuchung, wie viele und insbesondere welche Fehlpaarungen zwischen RVDs und Box tolerierbar sind und welchen Einfluss Fehlpaarungen am 5'- bzw. 3'-Bereich der Box auf die Induktion der Transkription haben. Weiterhin war zu analysieren, ob die sequenzspezifische, transkriptionelle Geninduktion durch TAL-Effektoren auch in heterologen Systemen stimuliert wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Stämme und deren Kultivierung

#### 2.1.1 Bakterien- und Hefestämme

**Tabelle 2-1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme \***

Stamm	Resistenz	Beschreibung/Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )		
GV3101	Rif, Gent	Stamm zur Aufnahme von Expressionsplasmiden, Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58ΔT-DNA), Ref.: (Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )		
One Shot (TOP10)		Stamm zur Aufnahme von Plasmiden, <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i> , Ref.: Invitrogen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )		
FY1679-06C		Stamm zur Aufnahme von Expressionsplasmiden MAT $\alpha$ , <i>ura3-52, leu2Δ1; trp1Δ63; his3Δ200; GAL</i> , Ref.: EUROSCARF

\* In die oben genannten Stämme wurden Klonierungs- und Expressionsplasmide (Tabelle 2-3) über Elektroporation oder Hitzeschock transformiert und auf selektivem Medium (2.1.2.) angezogen.

#### 2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

LB (Lysogenic Broth) Medium: 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5

YEB Medium: 0,5 % (w/v) Bacto-Beef-Extrakt, 0,1 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Bacto-Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 0,2 % 1 M MgSO<sub>4</sub>; pH 7,2

YEP: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Kohlenstoffquelle (z.B. Glucose)

YNB/ SD: 0,67 % yeast nitrogen base, 2 % Kohlenstoffquelle, 5 % Aminosäure-Stammlösung (20-fach)

Für die Herstellung von Nähragarplatten wurden jeweils 1,5 % (w/v) für Bakterien und 2 % (w/v) für Hefen Agar-Agar zu einem Liter Medium zugegeben. Die Sterilisation des LB- und YEB-Mediums vor der Verwendung fand für 20 Minuten bei 121 °C und 1,1 x 10<sup>5</sup> Pa (Autoklavieren) statt.

Die Hefemedien, Aminosäure-Stammlösungen (nach Clontech-Protokoll) und 20 % Zucker-Lösungen wurden für 20 Minuten im Schnellkochtopf autoklaviert, nach dem Abkühlen wurden die entsprechende Zuckerlösung sowie der Aminosäure-Mix steril hinzugefügt.



**Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Stammkonzentration	verwendete Verdünnung
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	1:1000 (Festmedium) 1:2000 (Flüssigmedium)
Gentamycin (Gent)	150 mg/ml	1:1000
Hygromycin (Hyg)	150 mg/ml	1:800
Kanamycin (Kan)	5 mg/ml	1:200 ( <i>E. coli</i> ) 1:50 ( <i>A. tumefaciens</i> )
Rifampicin (Rif)	20 mg/ml	1:1000
Spectinomycin (Spec)	10 mg/ml	1:100

## 2.2 Verwendete Vektoren und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide befinden sich im Anhang, Tabelle 6-1.

**Tabelle 2-3: Verwendete Klonierungsvektoren**

Bezeichnung	Resistenz	Beschreibung/Verwendung	Referenz
pENTR/D-TOPO	Kan	linearisierter Vektor mit GTGG-Überhang für gerichtete Klonierung, enthält <i>attL</i> -Stellen für GATEWAY®-Klonierung	(Invitrogen)
pJet 1.2	Amp	Klonierungsvektor für <i>blunt-ends</i> und <i>sticky-ends</i> , MCS	(Fermentas)
pGWB2	Kan, Hyg	Binärvektor mit 35S-Promotor, ohne <i>tag</i> , mit <i>attR</i> -Stellen ( $P_{35S}$ - <i>attR1</i> - $Cm^r$ - <i>ccdB</i> - <i>attR2</i> - $T_{NOS}$ -)	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
pGWB3	Kan, Hyg	Binärvektor mit ohne Promotor, mit <i>uidA</i> , mit <i>attR</i> -Stellen ( <i>attR1</i> - $Cm^r$ - <i>ccdB</i> - <i>attR2</i> -GUS- $T_{NOS}$ )	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
pGWB6	Kan, Hyg	Binärvektor mit 35S-Promotor und GFP- <i>tag</i> , mit <i>attR</i> -Stellen ( $P_{35S}$ -sGFP- <i>attR1</i> - $Cm^r$ - <i>ccdB</i> - <i>attR2</i> - $T_{NOS}$ )	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
pVSF	Kan	Binärvektor mit 35S-Promotor, MCS	(Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996)
pGad T7 Rec2 $\Delta$ AD	Amp, Leu	Vektor für Hefeexpression, ursprünglich Y2H-Beutevektor, <i>ADH1</i> -Promotor, deletierte <i>GAL4-AD</i>	S. Hahn (Clontech)
pHIS2	Amp, Trp	Vektor für Hefeexpression, <i>HIS3</i> -Promotor, <i>HIS3</i>	(Clontech)
pJOAD	Amp, Trp	Vektor für Hefeexpression, <i>GAL1</i> -Promotor	J. Boch
pSH18-34	Amp, Ura	Vektor für Hefeexpression, <i>GAL1</i> -Promotor, <i>lacZ</i> -Reportergen	(Clontech)
pF12A RM Flexi	Amp	Vektor für Genexpression in humanen Zellen, minimaler <i>CMV</i> -Promotor, 12x	(Promega)
pcDNA3	Amp	Vektor für Expression in humanen Zellen, <i>CMV</i> -Promotor	(Invitrogen)

**Tabelle 2-4: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz*	Verwendung
Bs4PR/B01_Xba_Kristin	CTAGAGTAGGTATGTTAAATAAAAATTAGCTTAGAAGATCTGGG	Amplifikation des <i>pBs4 rev</i> inkl. UTR mit <i>XbaI-site</i>
P12F / Jens	CACCT <b>TT</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax2-Box TT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P13F / Jens	CACCTACACCCCAAACATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P14F / Jens	CACCTACCTAAACTAAATATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Poly-C_18-1 / Jens	CACCTACCCCCCCCCCCCCCTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der ArtHD-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
U20b in 74/SH	CACCTATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der <i>UPA20</i> -Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Poly-C_18-2 / Jens	CACCTACCCCCCCCCCCCCCTATATAACTTTGTCCAAAATATCATC	Klonierung der ArtHD-Box vor 65-1 Bp <i>pBs4</i>
P13G / Jens	CACCA <b>AC</b> ACCCCAAACATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax3-Box A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P13H / Jens	CACCC <b>CAC</b> ACCCCAAACATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax3-Box C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P13I / Jens	CACCC <b>GAC</b> ACCCCAAACATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax3-Box G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
NG_115_HD-R /Heidi	CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAGGCCGG	Mutagenese von NG zu HD <i>rev</i>
NG_115_HD /Heidi	CCGGCCTGCCGCCATCGTGGCTGGCGATG	Mutagenese von NG zu HD <i> fwd</i>
P12GT / Jens	CACCT <b>GT</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax2-Box GT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12GA / Jens	CACCT <b>GA</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax2-Box GA vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12GC / Jens	CACCT <b>GC</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax2-Box GC vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12GG / Jens	CACCT <b>GG</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der Hax2-Box GG vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Bs4_Ex1_F	CACCTACACCCCAAACATCTGTTAAAAAGGCA TAGTCCAATC	Klonierung der Hax3-Box in <i>Bs4</i>
Bs4_Ex1_R	GCAAACTTGAATAGTTTTTTGG	Klonierung der Hax3-Box in <i>Bs4</i>
Bs4_Ex3_F	CACCTACACCCCAAACATTTACTTACCCTCCTCCAGGAGC	Klonierung der Hax3-Box in <i>Bs4</i>
Bs4_Ex3_R	CCAACCCAAAAGGTTGTGGGTTTCGAG	Klonierung der Hax3-Box in <i>Bs4</i>
P13F_p150	CACCTACACCCCAAACATTTTTTTATTGTTGAAGACTGATC	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
P13F_p150_rev	GAATTAACAAGTACCACTTGAAACG	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
P13F_p225	CACCTACACCCCAAACATTTGTCAACTCTTTCTTTGTCC	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
P13F_p225_rev	TAATCTAAATAAAATTCTCTGTCACAC	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
P13F_p300	CACCTACACCCCAAACATTTTCAAGTTTTTATTATTTTAATCTTTTGATGG	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
P13F_p300_rev	TAATTTATTTGTTTACCGTTGCC	Klonierung der Hax3-Box vor <i>pBs4</i>
pBOX_pCX1	CACCTAGCGAAGTCTTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX6-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX2	CACCTAGCAATTGTCTTTCTTTCTTGATATAAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX7-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>

Name	Sequenz*	Verwendung
pBOX_pCX3	CACCTACAGGCATGATTTTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX4	CACCTATGTGAATGATTTCTTTCTTGTATAT AACTTTGTCC	Klonierung der ArtX8-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX5	CACCTATTCTGGGACGTTTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX1-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX6	CACCTATGCGGTCCCTCTTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX2-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX7	CACCTAATCGTGCTGTTTCTTTCTTGTATAT AACTTTGTCC	Klonierung der ArtX9-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX8	CACCTAATGCCCGGCTTTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX9	CACTATGGACCGTGTTTCTTTCTTGTATATA ACTTTGTCC	Klonierung der ArtX10-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_pCX10	CACCTATGGGTGCCCTAT- TTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NG_A	CACCTACCAAAACAATAAATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NG_C	CACCTACCCAAACCAAAACACTTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NG_G	CACCTACCGAAACGAAAGAGTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_HD_A	CACCTAATAAAATAAATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_HD_G	CACCTAGGTAAAGTAAATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_HD_T	CACCTATTAAATTAATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NI_C	CACCTCCCTAACCTCACTCTTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NI_G	CACCTGCCTAAGCTGAGTGTTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NI_T	CACCTTCCTAATCTTATTTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NS_C	CACCTACCTCCACTACATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NS_G	CACCTACCTGGACTAGATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
Hax4_NS_T	CACCTACCTTACTATATATTTCTTTCTTGT ATATAACTTTGTCC	Klonierung der Hax4- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
AK5_NN_A	CACCTATTCTAAAACAATTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX1- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>
AK5_NN_C	CACCTATTCTCCCACCTTTTCTTTCTTGTAT ATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX1- Fehlpaarungs-Box vor 75- 1 Bp <i>pBs4</i>

## Material und Methoden

Name	Sequenz*	Verwendung
AK5_NN_T	CACCTATTCT <b>TTT</b> ACT <b>TTTT</b> TCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX1-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_4,5_AR80	TAGAATTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX4,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_5,5_AR78	TACTGATTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX5,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_6,5_AR102	TATGGGTTTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX6,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
pBOX_7,5_AL67	TATGCGTGTTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCC	Klonierung der ArtX7,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Bs4PR/B01_R_HS	AGATTCGATTAAAAATAAATTGTATGGATGATGATC	Amplifikation des <i>pBs4 rev</i> inkl. UTR
p225/3_in_p74_R	TAATCTAAATAAAATTCTCTGTACACTAATGATCAATTGATGATATTTTGG	Klonierung von Promotorchimären
p74/3_in_p225_R	AGATTCGATTAAAAATAAATTGTATGGATGAGAAAGCTGACTTTGTCAAAGG	Klonierung von Promotorchimären
P74/1_in_p225	CACCTACACCCAAACATTTCTTTCTTGTATA <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b> TTT <b>GACAAAGTCAGC</b>	Klonierung von Promotorchimären
P225/1_in_p74	CACCTACACCCAAACAT <b>ATTTGTCAACTCTTCTTTGTTGTCC</b> AAAATATCATCAATTGATC	Klonierung von Promotorchimären
p74/1.1_in_p225	CACCTACACCCAAACATTTCTTTCTTCT <b>CTTCTTTGTTGTCC</b> TTT <b>G</b>	Klonierung von Promotorchimären
P225/1.1_in_p74	CACCTACACCCAAACAT <b>ATTTGTCAAGTATA</b> <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b> AAAATATC	Klonierung von Promotorchimären
P13F_p225_A/T	CACCTACACCCAAACAT <b>TTTTGTCAACTCTTCTTTGTTGTCC</b>	Klonierung der Hax3-Box +T vor <i>pBs4</i> <sup>225-151</sup>
P13K	CACCTACACCCAAACAT <b>ATCTTTCTTGTATA</b> <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b>	Klonierung der Hax3-Box +A vor 74-1 Bp <i>pBs4</i>
P13L	CACCTACACCCAAACAT <b>CTCTTTCTTGTATA</b> <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b>	Klonierung der Hax3-Box +C vor 74-1 Bp <i>pBs4</i>
P13M	CACCTACACCCAAACAT <b>GTCTTTCTTGTATA</b> <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b>	Klonierung der Hax3-Box +G vor 74-1 Bp <i>pBs4</i>
CA-Elo-A02	TCTATAAGCTTGGCGGTATTGACAAGCGTG	Elongationsfaktor in Nachtschattengewächsen
CA-Elo-B02	CTTGGTGGGAATCATCTTAACCATGCCAGCA	Elongationsfaktor in Nachtschattengewächsen
p225_1.2 in 74	CACCTACACCCAAACAT <b>ATTTGTCAAGTATA</b> <b>TAAC</b> TTT <b>GTCC</b> TTT <b>GACAAAGTCAGC</b>	Klonierung von Promotorchimären
p74-1.2 in 225	CACCTACACCCAAACATTTCTTTCTTCT <b>CTTCTTTGTTGTCC</b> AAAATATCATCAATTGATC	Klonierung von Promotorchimären
H2 swap3b-F	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCTTAT <b>ATTTGTCAACTCTTCTTTGTTGT</b>	Klonierung von Promotorchimären
H2 swap4a-F	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCTTATTTCT <b>TTCTTCTTCTTTGTTGTCC</b>	Klonierung von Promotorchimären
H2 swap4b-F	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCTTAT <b>ATTTGTCAAGTATATAACTTTGTCC</b>	Klonierung von Promotorchimären
box ArtX2B-1 HS	CACCTATGCGGTCCCTC <b>a</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2B-2 HS	CACCTATGCGGTCCCT <b>ga</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2B-3 HS	CACCTATGCGGTCCC <b>aga</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>

## Material und Methoden

Name	Sequenz*	Verwendung
box ArtX2A-1 HS	CACCA <b>a</b> TGCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2A-2 HS	CACCA <b>at</b> TGCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2A-3 HS	CACCA <b>ata</b> GCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2A-4 HS	CACCT <b>t</b> TGCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2A-5 HS	CACCT <b>ta</b> GCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2A-6 HS	CACCT <b>tac</b> GCGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2M-1 HS	CACCTAT <b>g</b> GGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2M-2 HS	CACCTAT <b>GCGt</b> GCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2M-3 HS	CACCTAT <b>GgGt</b> GCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P13F_minP_321_F/HS	TACACCCAAACATtaggcgtgtaacgggggga g	Klonierung der Hax3-Box vor minimalen pCMV in pF12A-Luc
U20b_minP_321_F/HS	TATATAAACCTGACCCTTTtaggcgtgtaacg gtgggag	Klonierung der <i>UPA20</i> -Box vor minimalen pCMV in pF12A-Luc
pF12A RM seq fwd/HS	cgcagtactccgctcgag	Zur Sequenzierung des pF12ARM Flexi-Plasmids
pF12A RM seq rev/HS	TGTGGTTTGTCCAAACTCATC	Zur Sequenzierung des pF12ARM Flexi-Plasmids
box ArtX1-M1 HS	CACCTATT <b>g</b> TGGGACGTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX1-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX1-M4 HS	CACCTATT <b>at</b> TGGGACGTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX1-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX1-M5 HS	CACCTATT <b>t</b> TGGGACGTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX1-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2-M4 HS	CACCTAT <b>g</b> AGGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX2-M5 HS	CACCTAT <b>gt</b> GGTCCCTCTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX4-M1 HS	CACCTA <b>g</b> AGGCATGATTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX4-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX4-M4 HS	CACCTA <b>a</b> AGGCATGATTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX4-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>

## Material und Methoden

Name	Sequenz*	Verwendung
box ArtX4-M5 HS	CACCT <b>at</b> AGGCATGATTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX4-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A1 HS	CACCC <b>aa</b> TGCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A2 HS	CACCC <b>at</b> ATGCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A3 HS	CACCC <b>att</b> TGCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A4 HS	CACCT <b>t</b> ATGCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A5 HS	CACCT <b>tt</b> TGCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-A6 HS	CACCT <b>tta</b> GCCCCGGCTTTTTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-B1 HS	CACCTAATGCCCCGGCT <b>at</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-B2 HS	CACCTAATGCCCCGGC <b>aa</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
box ArtX5-B3 HS	CACCTAATGCCCCGG <b>gaa</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer ArtX5-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A1 HS	CACCC <b>ag</b> TTATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A2 HS	CACCC <b>ac</b> TTATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A3 HS	CACCC <b>aca</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A4 HS	CACCT <b>c</b> TTATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A5 HS	CACCT <b>ca</b> TATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_A6 HS	CACCT <b>caa</b> ATTCTCACACTCTCCTTATTTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_B1 HS	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCTT <b>a</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_B2 HS	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCTT <b>ta</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
P12F_B3 HS	CACCTGTTATTCTCACACTCTCCT <b>ata</b> TTCTTTCTTG	Klonierung einer Hax2-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>

## Material und Methoden

Name	Sequenz*	Verwendung
Upa20b_1 HS	CACCTATATAAACCTGACCCTcTTTCTTTCT TGTATATAACTTTGTCC	Klonierung einer UPA20-Fehlpaarungs-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Upa20b_2 HS	CACCTcTATAAACCTGACCCTcTTTCTTTCT TGTATATAACTTTGTCC	Klonierung einer perfekten UPA20-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i>
Gal1p_ATG-F/HS	CTTCTTATTCAAACGTAATAAAAAGTATC	Mutagenese eines ATG zu ACG in <i>pGAL1</i>
Gal1p_ATG-R/HS	GATACTTTTATTACGTTTGAATAAGAAG	Mutagenese eines ATG zu ACG in <i>pGAL1</i>
U20b-176-YR-F/HS	TATATAAACCTGACCCTTTTATTAACAGATA TATAAATGCAAAAAC	Insertion der UPA20-Box -157 Bp stromaufwärts vom ATG
H3b-176-YR-F/HS	TACACCCAAACATTATTAACAGATATATAAA TGCAAAAAC	Insertion der Hax3-Box -157 Bp stromaufwärts vom ATG
U20b-176-YR-R/HS	TAATAAAAGGGTCAGGTTTATATAGATCAAA AATCATCGCTTCGCTG	Insertion der UPA20-Box -157 Bp stromaufwärts vom ATG
H3b-176-YR-R/HS	TCTGTTAATAATGTTTGGGTGTAGATCAAAA ATCATCGCTTCGCTG	Insertion der Hax3-Box -157 Bp stromaufwärts vom ATG
pSH18-34_237_F/HS	CCATATACATATCCATATACATATCC	Klonierung des <i>pGAL1</i> mit LexA-DBS
pSH18-34_879_R/HS	TAATGAATCGGCCAACGCGCGGG	Klonierung des <i>pGAL1</i> mit GAL-Gen
Bs4_324_F/HS	aacagtcataccgatcttttataatg	Für sq RT-PCR, <i>fwd</i> im Exon1 des <i>Bs4</i> -Gens
Bs4_846_R/HS	TTCGTACAAAATTTGGAAGAGATGC	Für sq RT-PCR, <i>rev</i> im Exon2 des <i>Bs4</i> -Gens
pSH-LexA_XhoI-U20b-AgeI_R/HS	ACCGGTAAAGGGTCAGGTTTATATACTCGAG TCGCATTATCATCCCTCGAC	Insertion der UPA20-Box direkt stromabwärts der LexA-DBS
pSH-LexA_XhoI-H3b-AgeI_R/HS	ACCGGTATGTTTGGGTGTACTCGAGTCGCAT TATCATCCCTCGAC	Insertion der Hax3-Box direkt stromabwärts der LexA-DBS
pSH_LacZ-U20b-AgeI-PstI-F/HS	ccctttaccggtctgcagATGACTAAATCTC ATTTCAGAAG	Insertion der UPA20-Box direkt stromabwärts der LexA-DBS
pSH_LacZ-H3b-AgeI-PstI-F/HS	caaacataccggtctgcagATGACTAAATCT CATTTCAGAAG	Insertion der Hax3-Box direkt stromabwärts der LexA-DBS
pminHIS3-AgeI-F/HS	accggtGAATCCCGGGGAGCTCACG	Amplifikation des minimalen <i>pHIS3</i>
pminHIS3-PstI-R/HS	CTGCAGCTTTGCCTTCGTTTATCTTGC	Amplifikation des minimalen <i>pHIS3</i>
pminGal1_AgeI-F/HS	accggtTTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGG	Amplifikation des minimalen <i>pGAL1</i>
pminGal1-PstI-R/HS	CTGCAGTATAGTTTTTTCTCCTTGACGTT	Amplifikation des minimalen <i>pGAL1</i>
XhoI-P13F-74bpBs4p-F/HS	ctcgagTACACCCAAACATTTTC	Amplifikation des minimalen <i>pBs4</i> inkl. Hax3-Box
XhoI-U20b-74bpBs4p-F/HS	ctcgagTATATAAACCTGACCCTTTTTTC	Amplifikation des minimalen <i>pBs4</i> inkl. UPA20-Box
Bs4PR/B01-PstI-R_HS	CTGCAGAGATTCGATTAAAAATAAATTGTAT GG	Amplifikation des minimalen <i>pBs4 rev</i>

Name	Sequenz*	Verwendung
RS-EFrt-F1	AGTCAACTACCACTGGTCAC	Amplifikation des Elongationsfaktor in Nachtschattengewächsen
RS-EFrt-R1	GTGCAGTAGTACTTAGTGGTC	Amplifikation des Elongationsfaktor in Nachtschattengewächsen
Mfel-YR-F/ SH	CAATTGCTCTAATCTTACCTCGACTGCTG	Amplifikation des <i>pGAL1</i> mit LexA-Operator für Hefereporter
KpnI-YR-R/ SH	GGTACCTTATTTTTGACACCAGACCAAC	Amplifikation des <i>LacZ</i> für Hefereporter

\* Sequenz ist in 5'-3'Orientierung angegeben. Speziell untersuchte (Fehl-)Paarungen in den Boxen sind fett dargestellt. Die Sequenzabschnitte in den Oligonukleotiden für die Erstellung der Sequenzchimären sind für die Sequenzabschnitte des *pBs4*<sub>225-151</sub> in rot und für den *pBs4*<sub>75-1</sub> in grün dargestellt.

### 2.3 Verwendete Pflanzen und Anzuchtbedingungen

Die transienten Expressionsanalyse der TAL-Effektor-Fusionen sowie der Promotor-GUS-Fusionen wurden in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen durchgeführt (Marois *et al.*, 2002). Weiterhin wurden verschiedene, transgene Linien *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (A. Nickstadt) genutzt, um die spezifische Geninduktion durch einen TAL-Effektor (Hax2) zu ermitteln. Die Anzucht erfolgte im Kurztag (8 Stunden Licht, 100 – 125  $\mu$ Einstein bei 22 °C am Tag, 20 °C nachts). Zudem wurden für die Untersuchung einer TAL-spezifischen Erkennungsspezifität *Lycopersicon pennellii* verwendet (Schornack *et al.*, 2004).

### 2.4 Inokulationsexperimente

*A. tumefaciens*-Stämme wurden zwei Tage auf selektiven YEB-Platten angezogen. Für die Inokulationen wurden die Bakterien in Infiltrationsmedium (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MES (pH 5,3 - 5,5), 150  $\mu$ g/ml Acetosyringon) resuspendiert, auf eine optische Dichte von 0,8 bei 600 nm (1,0 = 1 x 10<sup>9</sup> cfu/ml) eingestellt. Bei Ko-Inokulation wurden Reporter- und TAL-Effektor-tragende *A. tumefaciens*-Bakteriensuspensionen 1:1 gemischt, ansonsten direkt und mit einer nadellosen Einwegspritze in die Blattunterseite junger Blätter injiziert. Inokulierte Pflanzen wurden für zwei Tage in Pflanzenwuchsschränken (26 – 28 °C, 60 – 70 % relative Luftfeuchte, Lichtperiode von 6.00 bis 22.00 Uhr) inkubiert. Die Ernte von Blattmaterial erfolgte i.d.R. 48 h nach Inokulation.

### 2.5 Molekularbiologische Methoden

#### 2.5.1 Die PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Über die PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*) wurde die erfolgreiche Klonierung in Vektoren überprüft oder semiquantitative (sq) RT-PCRs durchgeführt. Dabei wurden 0,2  $\mu$ M dNTPs, 0,15  $\mu$ M Oligonukleotide verwendet. Für die Amplifikation fehlerfreier DNA-Fragmente



wurden DNA-Polymerasen mit *proof-reading-function*, wie die *Phusion*-Polymerase oder die *Kappa Hifi*-Polymerase verwendet. Die Konzentrationen der dNTPs und Oligonukleotide war bei der *Phusion* die gleichen wie bei der *Taq*, bei der *Kappa Hifi*-Polymerase wurden 0,3  $\mu\text{M}$  dNTPs und 0,15  $\mu\text{M}$  Oligonukleotide eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in einem Temperaturzyklus-Steuergerät (FlexCycler PCR Thermal Cycler; Analytik Jena AG) mit beheizbarem Deckel durchgeführt.

### 2.5.2 Die Erstellung der unterschiedlichen Reporterkonstrukte

Die Box-Promotorsequenzen für die Reporterkonstrukte für die transiente Expression in der Pflanze wurden mittels PCR-Amplifikationen erstellt. Dafür wurden die abgeleiteten bzw. mutagenisierten Boxen an einen *Bs4*-Promotor-spezifischen Primer angehängt und so vor die *Bs4*-Promotorsequenz im Amplifikat angefügt. Die Promotorchimären wurden auf ähnliche Weise über lange Oligonukleotide mit Box und zu inserierenden Sequenzabschnitten erstellt, um neue Sequenzabschnitte bzw. Sequenzkombinationen des *Bs4*-Promotors zu erreichen. Alle Box-Promotor-PCR-Amplifikate wurden in pENTR/D-TOPO ligiert und anschließend mittels LR-Rekombination in pGWB3 kloniert.

Die Insertionen von Boxen in den *GALI*-Promotor für die Expression in Hefe wurden teilweise über die SOE-PCR vorgenommen. Hierbei wurden zuerst zwei DNA-Fragmente (A & B) erstellt, wobei diese gleiche Sequenzen an 3'-A und 5'-B aufwiesen. Durch diesen gleichen Überhang konnte in einer zweiten PCR das DNA-Fragment vollständig amplifiziert werden. In dem gleichen Überhang der Oligonukleotide war die gewünschte Box inseriert. Das Amplifikat wurde mittels *MfeI-KpnI*-Restriktion und anschließender Ligation in pHIS2 (*EcoRI-KpnI* gespalten) kloniert. Für die Hefe-Reporterkonstrukte mit unterschiedlichen Promotorsequenzen wurden die Promotoren mit spezifischen Schnittstellen (*AgeI-PstI*, bzw. *XhoI-PstI*) an 3' bzw. 5' amplifiziert, anhand der Schnittstellen zwischen LexA-DNA-Bindedomäne und ATG des *lacZ*-Reportergens kloniert und über eine zweite Klonierung mittels *Sall-KasI*-Restriktion und anschließender Ligation in pSH18-34 umgesetzt.

Das Luciferase-Reporterplasmid für die humanen Zellen wurde in zwei Schritten erstellt. Zuerst wurde im pF12A RM Flexi-Vektor (Promega) das *bar*-Gen (*HindIII-PmeI*) durch das Luciferase-Gen (aus dem Vektor pSP-luc) über *HindIII-EcoRV*-Restriktionsverdau und anschließender Ligation ersetzt. Die Boxen für das Luciferase-Reporterplasmid wurden mittels spezifischen Oligonukleotidüberhängen vor den minimalen *CMV*-Promotor in die Sequenz per PCR inseriert. Das Amplifikationsprodukt bestehend aus Box, *CMV*-Promotor und Luciferase-Gen wurde in in pJet1.2 kloniert, sequenziert, mittels *XbaI*-Restriktionsspaltung isoliert und anschließend in pF12A RM Flexi (*XbaI*-gespalten) ligiert.

### 2.5.3 Die Klonierung mittels des GATEWAY®-Systems

Die PCR-Produkte der Box-Promotorsequenzen mit 5'-vier zusätzlich angehängten Nukleotiden (CACC) wurden gerichtet in den pENTR/D-TOPO-Vektor ligiert (pENTR/D-TOPO Directional TOPO Cloning Kit; Invitrogen GmbH, Darmstadt). Das klonierte PCR-Fragment ist im pENTR/D-TOPO-Vektor (Donorvektor) von *attL*-Rekombinationsstellen flankiert, so dass eine schnelle rekombinationsbasierte Klonierung in andere GATEWAY®-Vektoren (Expressionsvektoren) möglich wird. In dieser Arbeit wurden für die transiente Expression in der Pflanze die Expressionsplasmide pGWB2, pGWB3 und pGWB6 genutzt. In den Vektoren pGWB2 und pGWB6 werden die inserierten TAL-Effektor-Gene durch einen 35S-Promotor exprimiert (Tabelle 2-3). Im pGWB6 wird das Genprodukt transkriptionell mit einem GFP fusioniert. Im promotorlosen pGWB3 werden Box-Promotorsequenzen inseriert und es kommt zur Expression des *uidA* (GUS-Reportergen), wenn der Promotor induziert wird.

### 2.5.4 Die Klonierung von künstlichen TAL-Effektoren

Die *repeats* von TAL-Effektoren zu klonieren ist aufgrund ihrer homologen Sequenz schwierig. Jedoch schneidet das TypIIS-Restriktionsenzym *Esp3I* zufällig einmal pro *repeat*, durch die Spaltung mit *Esp3I* können die *repeats* bis auf den ersten und den letzten halben *repeat* in einem TAL-Effektor entfernt werden. Durch die Spaltung von Hax3 mit *Esp3I* und Religation entstand so ein minimales Hax3, mit 1,5 *repeats* (A. Landgraf). Anhand der nicht-palindromischen Erkennungssequenz und spezifischen Überhang, können die einzelnen, *Esp3I*-gespaltenen *repeats* wieder gerichtet in den minimalen Hax3 ligiert werden. Die einzelnen *repeats* waren zuvor per PCR amplifiziert wurden (A. Landgraf). Nach einem *Esp3I* Restriktionsverdau mit anschließender Ligation wurden so *repeats* eines *repeat*-Typs oder von unterschiedlichen *repeat*-Typen in den minimalen Hax3 kloniert (A. Landgraf). Die Generierung von künstlichen TAL-Effektoren (ArtX) erfolgte somit durch eine zufällige Ligation einzelner *repeats* in ein minimales Hax3 (A. Landgraf, A. Richter), wohingegen bei der Klonierung der ArtHD die Ligation nur mit HD-*repeats* stattfand (A. Landgraf).

Die künstlichen, unspezifisch ligierten TAL-Effektoren wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Größe hin untersucht und einzelne Art-Effektoren sequenziert, um die Reihenfolge der *repeats* festzustellen. Die Ligation der einzelnen *repeats* erfolgte in das minimale Hax3, was in pC3SE26, ein pCR8-Derivat mit *att-sites* für GATEWAY-Klonierung, inseriert war. Anschließend wurden die unterschiedlichen Art-Effektoren mittels LR-Rekombination in pGWB6 kloniert.

### 2.5.5 Die Klonierung von AvrBs3- und Hax3-Derivaten

Die Sequenz der TAL-Effektoren AvrBs3 bzw. Hax3 waren inklusive eines FLAG-Epitops in pGex-Plasmiden verfügbar. In pGex:300 (AvrBs3) und pGex:Hax3 wurde zuerst das C-terminale FLAG über *SacI-XhoI*-Restriktionsspaltung entfernt und der C-Terminus von AvrBs3 bzw. Hax3 über die Ligation von zusammengelagerten Oligonukleotide wiederhergestellt (S. Hahn). Durch eine Teil-

Amplifikation des C-Terminus mit 3'-flankierenden, *XbaI-HindIII*-Restriktionsschnittstellen mit der *Phusion*-DNA-Polymerase wurde ein AvrBs3 $\Delta$ AD- bzw. Hax3 $\Delta$ AD-Sequenz erzeugt (S. Hahn). Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden nach einer *AgeI-HindIII*-Restriktionsspaltung in das native AvrBs3 bzw. Hax3 ligiert, so dass die Effektoren keine AD mehr aufwiesen (S. Hahn). Die Sequenz der Aktivierungsdomänen von GAL4 bzw. VP16 wurden ebenfalls über *Phusion*-PCR mit spezifischen, flankierenden Restriktionsschnittstellen (*XbaI-HindIII*) amplifiziert und in pJet1.2 kloniert (S. Hahn). Die Insertion der unterschiedlichen ADs erfolgte über Restriktionsspaltung (*XbaI-HindIII*) mit anschließender Ligation in die AvrBs3 $\Delta$ AD- bzw. Hax3 $\Delta$ AD-Sequenz (S. Hahn). Das GFP wurde zum Einen mit *ClaI*-Restriktionsschnittstellen und zum anderen mit *EcoRI-XhoI*-Schnittstellen mittels *Phusion*-PCR amplifiziert, in pJet1.2 kloniert und sequenziert (S. Hahn). Das *ClaI*-flankierte GFP wurde stromaufwärts vor die TAL-Effektoren als N-terminale Fusion über *ClaI*-Spaltung und anschließender Ligation inseriert. Das *EcoRI-GFP-XhoI*-Konstrukt diente für die GFP-Negativkontrolle. Die Positivkontrolle (LexA-Kontrolle) für die Hefeexpression wurde aus drei Fragmenten ligiert (S. Hahn). Dafür wurde einerseits die LexA-DNA-Bindedomäne mit spezifischen Restriktionsschnittstellen an pEG202 amplifiziert. Andererseits wurde die klonierte GAL4-AD im pJet1.2 (s.o.) genutzt und als drittes Fragment dienten zusammengelagerte Oligonukleotide mit der SV40-NLS, die von pGADT7-Rec2 (1501-1557) abgeleitet wurden waren (S. Hahn). Diese drei Fragmente wurden gespalten, anschließend ligiert und in pGex kloniert (S. Hahn).

Die acht generierten TAL-Effektoren, sowie die LexA-Kontrolle und GFP-Negativkontrolle waren *EcoRI/XhoI*-flankiert. Über diese Restriktionsschnittstellen wurden die TAL-Effektoren bzw. Kontrollplasmide gespalten und in pVSF für die Expression in der Pflanze, in pGADT7-Rec2 $\Delta$ AD bzw. pJOAD für die Expression in Hefe sowie in pcDNA3 für die Expression in menschlichen Zellen ligiert.

### **2.5.6 Die Klonierung von TAL-Effektoren mittels *golden TAL technology* (Geißler *et al.*, 2011)**

Die Generierung von designten TAL-Effektoren erfolgte über eine Zwei-Schritt-Assemblierungsreaktion. Die Module der einzelnen *repeats* wurden per *Phusion*-PCR mit spezifischen *BpiI*-Restriktionsschnittstellen amplifiziert und in pJet1.2 oder pUC57-*BsaI* inseriert (A. Landgraf, J. Streubel). Die Module für N- und C-Terminus, das GFP oder die VP16-AD wurden, flankiert von *BsaI*-Schnittstellen, ebenfalls mittels *Phusion*-PCR amplifiziert und in pJet1.2 oder pUC57-*BsaI* kloniert (A. Landgraf, M. Reschke, T. Schreiber, J. Streubel).

In der ersten Assemblierungsreaktion wurden zunächst die *repeats* in sechser Blöcken assembliert (Tabelle 2-5). Die generierten sechser *repeat*-Module wiesen flankierende *BsaI*-Schnittstellen auf. In einer zweiten Assemblierungsreaktion wurden GFP, N- und C-Terminus, die *repeat*-Module und ggf.

die AD assembliert (Tabelle 2-6). Nach den einzelnen Assemblierungsschritten wurden die Plasmide isoliert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

**Tabelle 2-5: 1. Assemblierungsreaktion**

Ansatz	PCR-Programm	
2 µl pro <i>repeat</i> -Modul (50 ng/ µl)	1	10 Min 37 °C
2 µl Zielvektor (LA, AB, etc.) (50 ng/ µl)	2	10 Min 16 °C
2 µl 10 mM ATP	3	3 Mal Schritt 1-2 wiederholen
2 µl Grüner Puffer (Fermentas)	4	5 min 70 °C
1 µl <i>BpiI</i> (Fermentas)	5	∞ 4 °C
1µl T4 Ligase 30 Weiss u/ µl		
Ad 20 µl H <sub>2</sub> O		

**Tabelle 2-6: 2. Assemblierungsreaktion**

Ansatz	PCR-Programm kurz		PCR-Programm lang	
2 µl Vektor-Modul (50 ng/ µl)	1	5 Min 37 °C	1	7 h 37°C
3 µl N-Terminus-Modul (50 ng/ µl)	2	5 Min 16 °C	2	30 Min 50 °C
3 µl C-Terminus-Modul (50 ng/ µl)	3	12 Mal Schritt 1-2	3	30 Min 37 °C
2 µl <i>tag</i> -Modul (50 ng/ µl) (GFP-Modul, o.ä.)	4	30 Min 16 °C	4	30 Min 80 °C
1 µl sechser Modul LA (50 ng/ µl)	5	45 Min 50°C	5	∞ 4 °C
1 µl sechser Modul AB /AR (50 ng/ µl)	6	15 Min 80°C		
1 µl sechser Modul BC/ BR (50 ng/ µl)	7	∞ 4 °C		Zu Empfehlen
1 µl sechser Modul CR (50 ng/ µl)				bei gleicher
2 µl 10 mM ATP				Resistenz
2 µl Puffer 4 (NEB)				
1 µl <i>BsaI</i> (NEB)				
1 µl T4 Ligase 30 Weiss u/ µl				
Ad 20 µl H <sub>2</sub> O				

### 2.5.7 Die RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Nach der Ernte und dem Einfrieren in flüssigen Stickstoff von zwei Blattscheiben (Ø 0,8 cm bei *L. pennellii* und Ø 0,6 cm bei *A. thaliana*) Pflanzenmaterial, wurde dies im gefrorenen Zustand manuell mit Metallmörsern homogenisiert. Die RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial fand nach dem Herstellerprotokoll des „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) statt. Dabei wurde ein *on column*-DNase Verdau mittels des Qiagen RNase-free DNase Kits durchgeführt.

### 2.5.8 Die Synthese von Erststrang-cDNA

Unter Verwendung des mitgelieferten oligo(dT)-Oligonukleotids wurde mit Hilfe des Fermentas RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) cDNA synthetisiert. Die eingesetzte RNA-Menge betrug ca. 2,5 µg. Die erhaltene cDNA wurde für sq RT-PCR-Amplifikationen im Verhältnis 1:20 verdünnt.

## 2.5.9 Kompetente Zellen: Herstellung und Transformation

### 2.5.9.1 Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

**Tabelle 2-7: Benötigtes Medium und Puffer für chemisch kompetente *E. coli*-Zellen**

Medium:	Puffer:	
<u>LB++</u>	<u>TFB I</u>	<u>TFB II</u>
20mM MgSO <sub>4</sub>	30 mM Kaliumacetat (KOAC)	10 mM MOPS
10 mM KCl	100 mM Rubidiumchlorid RbCl <sub>2</sub>	10 mM RbCl <sub>2</sub>
	10 mM Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM Manganchlorid (MnCl)	pH 6,5 mit KOH einstellen
	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen	
	15% Glycerol	15% Glycerol
	steril filtrieren	steril filtrieren

Eine Vorkultur von drei bis 10 ml mit *E. coli*'s (TOP10) wurde über Nacht bei 37 °C angezogen. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur mit LB++ vorbereitet und mit einem ml Vorkultur pro 100 ml Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur sollte bis OD<sub>600</sub>: 0,4 – 0,55 wachsen (ca. 2,5 Stunden), dann mindestens 10 Min auf Eiswasser runter gekühlt werden. Die Hauptkultur wurde in vorgekühlte 50 ml Falcons überführt, die Zellen bei 4 °C, 3000 rpm, für 10 Min zu Pellets sedimentiert. Die Pellets wurden mit 15 ml eiskalten TFBI resuspendiert, anschließend 10 Min auf Eis inkubiert. Bei 4 °C, 3000 rpm wurden die Falcons für 10 Min zentrifugiert und die Pellets in 4 ml eiskalten TFBII resuspendiert. Die Zellen wurden je zu 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.5.9.2 Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Hitzeschock)

Kompetente *E. coli*'s wurden auf Eis aufgetaut, die DNA, der Ligationsansatz o.ä. auf 50 µl Zellen gegeben, 20 Min auf Eis inkubiert, Hitzeschock bei 42 °C für 30-45 Sekunden im Wasserbad oder 1-2 Min im Heizblock durchgeführt, Zellen 1-2 Min erneut auf Eis inkubiert, 250 µl LB steril dazugeben, eine Stunde bei 37 °C inkubiert, dann auf LB mit benötigten Antibiotika ausplattiert. Über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.9.3 Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- oder *A. tumefaciens*-Zellen

Mit eine Vorkultur des leeren Stammes (Bsp. *E. coli* TOP10) wurde eine Hauptkultur in LB/YEB-Medium (vorzugsweise ohne NaCl) unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6 angezogen (Zellen befinden sich in der exponentiellen Phase). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Die jeweilige Bakterienkultur wurde zentrifugiert (20 Min, 2 °C, 3220 rcf) und das Pellet in eisgekühltem Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 8 % des Ursprungsvolumen mit 10 % Glycerin-Lösung gewaschen und erneut

abzentrifugiert (10 Min, 2°C, 3220 rcf). Für die Lagerung wurde das Pellet im Eigenvolumen 10 % Glycerin-Lösung gelöst und die Aliquote bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.5.9.4 Die Transformation in elektrokompetente *E. coli*-Zellen (Elektroporation)**

Jeweils 50 µl der elektrokompetenten Zellen wurden mit 2 µl Klonierungsansatz versetzt, in eine eisgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette gegeben und transformiert (Spannung 2500 V, Kapazität 25 mF, Widerstand 200 Ohm, Dauer 5 ms). Anschließend wurde 250 µl LB -Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.5.9.5 Die Transformation in elektrokompetente *A. tumefaciens*-Zellen (Elektroporation)**

Jeweils 50 µl der elektrokompetenten Zellen wurden mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt, in eine eisgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette gegeben und transformiert (Spannung 2500 V, Kapazität 25 mF, Widerstand 200 Ohm, Dauer 5 ms). Anschließend wurde 250 µl YEB Medium zugegeben und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf selektiven Platten (YEB, Rif und plasmidspezifisches Antibiotikum) ausplattiert und für weitere 48 h bei 30 °C inkubiert.

### **2.5.9.6 Die Herstellung kompetenter Hefe-Zellen**

Eine Vorkultur mit drei ml YEPD-Medium dick animpfen und über Nacht bei 30 °C schütteln lassen. 50 ml Hauptkultur mit kompletter Vorkultur animpfen, ca. vier Stunden bei 30 °C schütteln bis: OD<sub>600</sub> = 0,8 für *S. cerevisiae* (0,5 für *K. lactis*). Die Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführen, fünf Min bei 3000 rpm zentrifugieren, das Pellet in zwei ml PLAG-Lösung [40 % PEG4000; 0,1 M LiAc; 10 mM Tris/ HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 15 % Glycerol (v/v)] resuspendieren, dazu 250 µl RNA (10 mg/ ml) oder 40 µl ssDNA (1 mg/ ml) geben, die Zellsuspension zu je 200 µl aliquotieren und dann langsam einfrieren (erst für ca. 2 h bei -20 °C und dann zu -70 °C). Die Hefen sind ca. 8 Monate nutzbar.

### **2.5.9.7 Transformation kompetenter Hefe-Zellen (Hitzeschock)**

0,5µg Plasmid-DNA (bzw. 0,5 - 4µg lineare DNA) zu 200 µl gefrorenen Hefezellen geben, dies für fünf Min bei 37 °C schütteln lassen (Thermoblock) und für eine Stunde (bis zwei Stunden) bei 42°C im Wasserbad inkubieren. Parallel Nähragarplatten 10 Min bei 65°C trocken. Anschließend ausplattieren der gesamten Zellsuspension auf Selektivmedium (SD-Medium plus C-Quelle, ohne selektive As). Dann folgen zwei Tage Inkubation der Transformaten bei 30 °C.

## 2.6 Methoden für den Nachweis der Genexpression

### 2.6.1 Die GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Blattproben wurden 48 Stunden nach Inokulation genommen und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 505 - 530 nm Bandpass-Filter für GFP analysiert. Zur Visualisierung von Zellkernen wurde ca. 3 Stunden vor der Analyse am LSM 0,01%-ige DAPI-Lösung in die infizierten Bereiche inokuliert bzw. die geernteten Blattscheiben infiltriert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 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.

### 2.6.2 Die Histochemische $\beta$ -Glucuronidase-Färbung

Die qualitative  $\beta$ -Glucuronidase-Färbung beruht auf einer enzymatischen Umsetzung und einer einfachen chemischen Reaktion: Die  $\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure (X-Gluc) zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-Chlor-indoxyl, wobei letzteres oxidiert wird und nach Dimerisierung zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo reagiert.

Zur Untersuchung der Aktivierung verschiedener Box-Promotor-Konstrukte im pGWB3 wurden diese mit unterschiedlichen (künstlichen) Genen der TAL-Effektor-Familie in *N. benthamiana* ko-exprimiert, nach zwei Tagen Blattproben mit 0,8 cm Durchmesser der inokulierten Stellen geerntet und durch Vakuumfiltrieren die GUS-Färbelösung [10 mM Natriumphosphat pH 7, 10 mM EDTA pH 8, 1 mM Kaliumferricyanat, 1 mM Kaliumferrocyanat, 0,1% Triton X-100, 0,1% X-Gluc (gelöst in DMSO oder DMF)] in die Blattscheiben eingebracht. Nach einer mindestens vierstündigen bis über Nacht andauernden Färbezeit der Blattscheiben in der GUS-Lösung bei 37°C wurde diese entfernt und durch 96 %-iges Ethanol ersetzt, was das Chlorophyll zerstörte und die Blaufärbung in Blattgewebe sichtbar machte. Die feuchten Blattscheiben wurden zwischen zwei Schichten transparenter 0,1 mm starker LDPE Schlauchfolie (Moosmann & Co) aufgelegt, getrocknet und so fixiert.

### 2.6.3 Der Quantitative $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitätstest über 4-MUG

Bei dieser quantitativen Methode spaltete die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (4-MUG) zu farbloser Glucuronsäure und 4-Methylumbelliferon (4-MU), welches unter basischen Bedingungen eine fluoreszierende Substanz ist. Durch Anregung mittels langwelligen UV-Licht wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen und die Umsatzrate der  $\beta$ -Glucuronidase ermittelt (nach Jefferson 1987). Damit konnte die Expressionsrate in Abhängigkeit der Box-Promotor-Kombination bestimmt werden.

Zur Untersuchung der Aktivierung der Box-Promotor-Konstrukte in pGWB3 wurden diese mit verschiedenen TAL-Effektoren in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Nach zwei Tagen wurden je zwei

Blattscheiben von 0,8 cm Durchmesser geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren. Im gefrorenen Zustand wurde das Blattmaterial mittels zwei Metallkugeln in der Schwingmühle MM301 (Retsch, Haan) homogenisiert. Das Pulver wurde mit GUS-Extraktionspuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 % SDS, 0,1 % Triton X-100, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen, stark durchmischt, die festen Bestandteile in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C aufbewahrt, bis alle Proben aufgeschlossen waren. 10  $\mu$ l des Proteinextraktes wurde mit 90  $\mu$ l mit 5 mM 4-MUG versetzten GUS-Extraktionspuffer vermengt (Doppelprobe) und für 60 – 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Ein Zehntel der Proben wurden anschließend sofort mit 90  $\mu$ l 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  abgestoppt und die genaue Zeit notiert. Die Proben wurden in 96-Loch-Platten mit transparentem Boden pipettiert, wobei MU-Lösungen mit 1, 10, 100 und 1000 mM MU als Standard mitgeführt wurden. Die Vermessung der Fluoreszenz des entstandenen 4-MU bzw. des Standard-MU fand bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 465 nm statt. Der Grad der Fluoreszenz spiegelte den Umsatz am 4-MUG zu 4-MU wieder, welche einerseits von der Expressionsrate des jeweiligen Promotors und andererseits von der Proteinmenge abhängig ist. Deswegen wurde anschließend der Protein-Extrakt über Bradford mit Rinderserumalbumin (BSA, New England Biolabs) als Standard bestimmt.

Die Berechnung der GUS-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{GUS-Aktivität} &= \frac{\text{FL 10mM 4MU-Standard}}{[(\text{FL Probe} - \text{FL Pfl-leer}) * \text{Zeit in Min} * \text{Proteinmenge von 1}\mu\text{l}] * \text{VF}} \\ &= \text{pmol 4MU/ Min/ } \mu\text{g Protein} \end{aligned}$$

FL, Fluoreszenz; VF, Verdünnungsfaktor (1000)

### 2.6.4 Der Qualitative $\beta$ -Galactosidase-Nachweis

Bei Expression des *lacZ* wird das Enzym  $\beta$ -Galactosidase translatiert, was anhand einer enzymatischen Umsetzung nachgewiesen werden kann. Die  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-indoxyl, wobei letzteres oxidiert wird und nach Dimerisierung zu dem wasserunlöslichen, blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo reagiert.

Zur Überprüfung und Selektion von *lacZ*-exprimierenden Zellen (z.B. *E. coli* oder *S. cerevisiae*) wurde X-Gal (Fermentas) in die Nähragarplatten gegeben und die Zellen darauf über Nacht bzw. 30 h inkubiert. Bei einer blauen Verfärbung der Zellen wurde der Indigo-Farbstoff gebildet und akkumuliert, was auf eine Expression des *lacZ* schließen lässt.



### **2.6.5 Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und der Immunoblot**

Proteine wurden mittels SDS-PAGE unter Verwendung 8 - 12 %-iger Gele aufgetrennt. Für Immunoblot-Analysen wurden Proteine auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit polyklonalem Anti-GFP-Antikörper (1:2000; Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers (1:10.000; anti-Kaninchen) erfolgte die Detektion der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech bzw. GE Healthcare).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TAL-Effektoren und das Modell der Sequenzspezifität

##### 3.1.1 Untersuchung von Zielsequenzen ausgewählter TAL-Effektoren

Die AvrBs3-Homologen Hax2, Hax3 und Hax4 wurden aus dem Brassicaceen-Pathogen *X. campestris* pv. *armoraciae* (*Xca*) isoliert (Kay *et al.*, 2005). Sie besitzen analog zu AvrBs3 eine zentrale *repeat*-Region und funktionale NLS und AD, weshalb sie in die Familie der TAL-Effektoren eingeordnet wurden. Jedoch waren für diese Effektoren noch keine Sequenzspezifitäten oder direkt induzierte Gene bekannt. Hax2 zeichnet sich durch eine Besonderheit in der *repeat*-Region aus, da seine 21,5 *repeats* aus je 35 As bestehen. Im Gegensatz dazu besitzen die 11,5 *repeats* von Hax3 und die 14,5 *repeats* von Hax4 je eine Länge von 34 As welche den *repeats* von AvrBs3 und der Mehrzahl bekannter TAL-Effektoren entspricht (Kay *et al.*, 2005; Boch und Bonas, 2010) (Abbildung 3-1, A).

Um zu untersuchen, ob durch die Hax-Effektoren eine transkriptionelle Induktion eines Reporter gens anhand einer spezifischen Erkennungssequenz erfolgt, wurden nach dem Modell der Sequenzspezifität Zielsequenzen (Hax2-, Hax3- und Hax4-Box) abgeleitet (Abbildung 3-1, A). Diese Boxen wurden vor einen minimalen Abschnitt des *Bs4*-Promotors inseriert, der kaum transkriptionelle Aktivität aufweist (Schornack *et al.*, 2005) und vor ein promotorloses *uidA*-Reporter gen kloniert (Abbildung 3-1, B). Nach der Erkennung der Box durch den TAL-Effektor sollte die Transkription des Reporter gens *uidA* induziert werden, was anhand des Genprodukts der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) nachweisbar ist.

Je eines der Reporterkonstrukte sowie eines der jeweiligen Effektorstrukte wurden über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer als DNA in *Nicotiana benthamiana* eingeschleust und dort exprimiert (transiente Ko-Expression). In den infizierten Zellen wurde der Effektor konstitutiv exprimiert (*35S*-Promotor) und konnte anschließend das Reporter gen induzieren. Die Analyse der Reporter genexpression erfolgte über qualitative und quantitative GUS-Aktivitätsuntersuchungen.

Der Effektor Hax2 induzierte nur den Hax2-Box-Reporter, aber nicht die Reporterkonstrukte mit der Hax3- oder Hax4-Box. Analog induzierte nur Hax3 die Transkription des Hax3-Box-Konstruktes und Hax4 die Genexpression des Hax4-Box-Konstrukts (Abbildung 3-1, D). Die jeweiligen Reporterkonstrukte wiesen keine eigene transkriptionelle Aktivität auf. Als

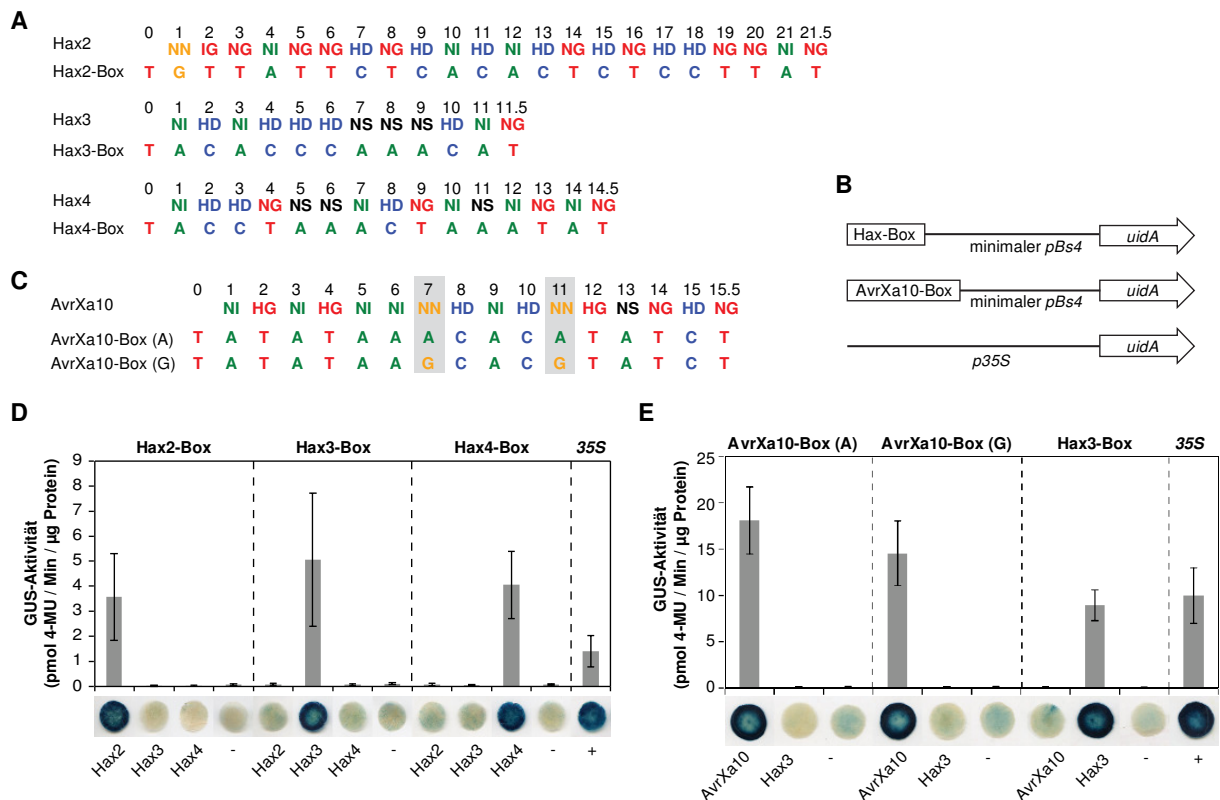
Positivkontrolle wurde *35S:uidA* genutzt, das eine konstitutive Expression des Reportergens aufweist (Abbildung 3-1, D). Somit konnten anhand des Modells der Sequenzspezifität spezifische Zielsequenzen für die Hax-Effektoren bestimmt und die spezifische Geninduktion gezeigt werden. Dies gilt auch für Hax2, das mit den 35 As pro *repeat* eine andere *repeat*-Länge aufweist, aber in denen dennoch die hypervariablen As (RVDs, *repeat variable diresidue*) analog zu den 34 As-langen *repeats* für die Spezifität verantwortlich sind. Damit konnte zum ersten Mal eine Spezifität für TAL-Effektoren vorhergesagt und experimentell bewiesen werden.

Für den TAL-Effektor AvrXa10 wurde vor kurzem das zugehörige Resistenzgen kloniert (Gu *et al.*, 2007). Um für diesen TAL-Effektor aus *Xoo* die spezifische Erkennungssequenz zu bestimmen, wurde versucht nach dem Modell der Sequenzspezifität die Box abzuleiten. Die Erkennungsspezifität des NN-*repeat* (*repeat* 7 und 11) in AvrXa10 war jedoch nicht eindeutig bekannt, daher wurden zwei verschiedene Boxen [AvrXa10-Box (A) und (AvrXa10-Box (G))] für die Untersuchungen eingesetzt (Abbildung 3-1, C). Diese Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotorabschnitt integriert und vor ein promotorloses *uidA*-Reportergen kloniert (Abbildung 3-1, B). Die Reporterstrukturen wurden mit dem *avrXa10*-Gen unter Kontrolle des *35S*-Promotors in *N. benthamiana* transient ko-exprimiert und die spezifische Promotoraktivierung in qualitativen und quantitativen GUS-Aktivitätstests untersucht.

Sowohl die AvrXa10-Box (A) als auch die AvrXa10-Box (G) wurden durch AvrXa10 induziert, jedoch nicht durch Hax3 und wiesen auch keine eigene transkriptionelle Aktivität auf (Abbildung 3-1, E). Die Erkennung durch AvrXa10 war spezifisch, denn AvrXa10 war nicht in der Lage das Hax3-Box-Konstrukt zu induzieren, was jedoch durch Hax3 möglich war. Die Geninduktion durch AvrXa10 war hierbei etwa doppelt so stark wie die durch Hax3 an der korrespondierenden Box oder der Positivkontrolle *35S:uidA* (Abbildung 3-1, E).

Damit konnte gezeigt werden, dass für AvrXa10 zwei Boxen abgeleitet werden konnten, die beide spezifisch induziert wurden. Somit korrespondiert der NN-*repeat* sowohl mit Adenin- als auch mit Guanin-Nukleotiden in der jeweiligen DNA-Box und es erfolgt eine ähnlich starke Induktion des Reportergens.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-1: Abgeleitete Effektorerkennungssequenzen für Hax2, Hax3, Hax4 und AvrXa10.** **A**) Aminosäuren 12 und 13 (RVDs) der *repeats* von Hax2, Hax3 und Hax4 und deren vorhergesagten Effektorerkennungssequenzen (Hax-Box). **B**) Die Hax-Boxen und AvrXa10-Boxen wurden vor den minimalen Bs4-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C**) RVDs der *repeats* von AvrXa10 und zwei mögliche AvrXa10-Boxen mit vorhergesagter NN-*repeat*-Spezifität A oder G. **D**) Spezifische Reporterinduktion der AvrXa10-Boxen durch den Effektor AvrXa10. **E**) Spezifische Reporterinduktion der Hax-Boxen durch die Effektoren Hax2, Hax3 und Hax4. **D & E**) GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit dem 35S-Promotor gesteuerten *avrXa10*, den *hax*-Genen bzw. dem Leervektor (-) *Agrobacterium*-vermittelt, transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. 35S:*uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon. Die Abbildung wurde verändert nach Boch *et al.* 2009.

In vielen Fällen wird die TAL-Box von einem Thymin-Nukleotid am 5'-Ende der Box flankiert (kodierender Strang), wie Vergleiche zwischen den *repeat*-Regionen und (putativen) Boxen zeigten (Abbildung 3-2). Zum Beispiel haben die gut charakterisierten AvrBs3<sub>Upa20</sub>-Box und AvrBs3<sub>Bs3</sub>-Box wie auch die AvrHah1<sub>Bs3</sub>-Box ein 5'-angrenzendes „T“. In Promotormutationsstudien, in denen die AvrBs3<sub>Bs3</sub>-Box über Einzelbasenparaustausche eingegrenzt wurde, konnte belegt werden, dass die Box 19 Bp umfasste, im Gegensatz zu der 17,5 *repeats* umfassenden *repeat*-Region des TAL-Effektors (Römer *et al.*, 2009a; Scholze, 2008). Die Mutanten, bei denen das initiale „T“ mutiert war, wurden nicht mehr von AvrBs3 erkannt.

# Ergebnisse

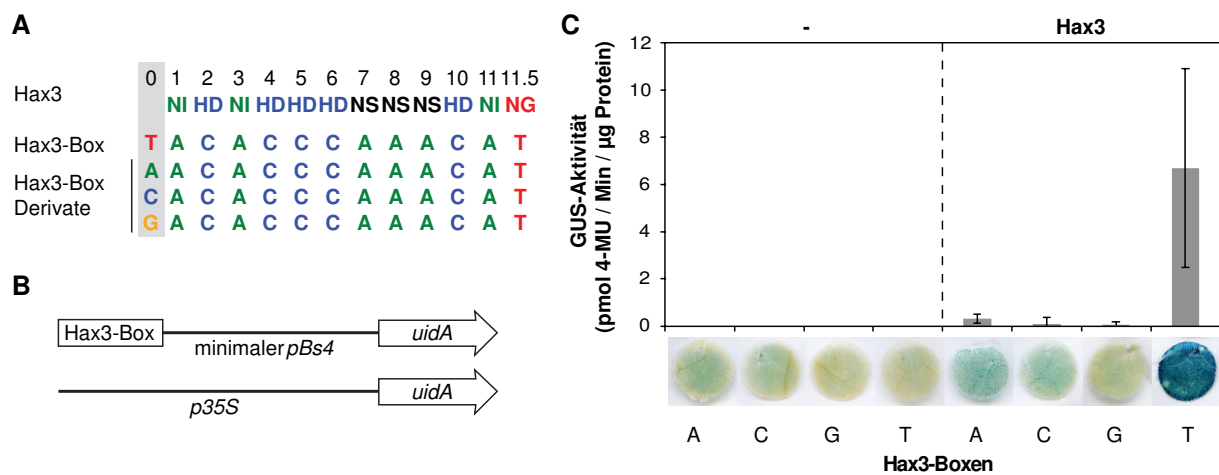
Panel	Gene	Sequence	HR (ECW)	Gen <sup>L</sup> induktion
A	<i>Bs3 UPA-box</i>	-120 T A T A T A A A C C T A A C C A T C C -102		
	<i>AvrBs3</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 17.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG NS NS HD HD HD NG HD NG	+	
	<i>AvrBs3Δrep16</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 13.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG HD NG HD NG	-	
	<i>AvrBs3Δrep109</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 14.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG NS NS NG HD NG	+	
	<i>AvrHah1</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 13.5 NN IG NI NI NI HD HD NG NN NI HD HD HD NG	+	
B	<i>Bs3-E UPA-like-box</i>	-133 T A T A T A A A C C T C T C T A T T C -115		
	<i>AvrBs3</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 17.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG NS NS HD HD HD NG HD NG	-	
	<i>AvrBs3Δrep16</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 13.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG HD NG HD NG	+	
	<i>AvrBs3Δrep109</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 14.5 HD NG NS NG NI NI NI HD HD NG NS NS NG HD NG	-	
	<i>AvrHah1</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 13.5 NN IG NI NI NI HD HD NG NN NI HD HD HD NG	-	
C	<i>Xa27</i>	-87 T A G A A G A A G A G A C C C A T A -70	+	
	<i>xa27</i>	-84 T A G A A G A G A C C A A T A G A G -67	-	
	<i>AvrXa27</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 16.5 NI NN N* NG NS NN NN NN NI NN NI N* HD HD NI NG NG		
D	<i>Xa13</i>	-251 T G C A T C T C C C C C T A C T G T A C A C C A C -223		+ Gen <sup>L</sup> induktion
	<i>xa13</i>	G A T A T G T C C C C C T C C A A C T A T A T A A -199		-
	<i>PthXo1</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 23.5 NN HD NI HG HD NG N* HD HD NI NG NG NI HD NG NN NG NI NI NI NI N* NS N*		
E	<i>OsTFX1</i>	-136 T A T A A A A G G C C C T C A C C A A C C C A T -113	+	
	<i>PthXo6</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 22.5 NI H* NI NN NN NN NN NN HD NI HD HG HD NI N* NS NI NI HG HD NS NS NG		
F	<i>OsTFIIAγ1</i>	-469 T A T A A T C C C C A A A T C C C C T C C T C -447	+	
	<i>PthXo7</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 21.5 NI NG NI NI N* NN HD HD N* NI NI NI NG HD HG NN NS NN HD HD NG N*		
G	<i>Os11N3</i>	-258 T A T A A A C C C C T C C A A C C G G T G C T A A -232	+	
	<i>AvrXa7</i>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 24.5 NI HG NI NI NS HD NN HD HD HD NS N* N* HD HD NS NS NN NI NG NN NI N* NS N*		
H	<i>Os11N3</i>	-319 C A T G C A T G T C A G C A G C T G G T T A T -296	+	
	TALC	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 21.5 NS NG NS HD NI NG NN NG HD NI NN N* NI NN HD NG NI NN N* HD NN NG		

**Abbildung 3-2: Vergleich der DNA-Zielsequenzen in Promotoren von induzierten Genen mit den RVDs der TAL-Effektoren.**

Die Beschreibung setzt sich auf Seite 42 fort.



Box durch Hax3 effizient induzierbar war (Abbildung 3-4, C). Die Reporterkonstrukte mit A, C, oder G als initiales Nukleotid konnten kaum induziert werden. Auch wiesen die vier Reporterkonstrukte keine eigene GUS-Aktivität auf (Abbildung 3-4, C). Somit kann das 5'-flankierende T als Teil der TAL-Box angesehen werden und ist wichtig für eine effiziente Erkennung der DNA-Sequenz durch den TAL-Effektor Hax3. Das T wird vermutlich durch den „nullten repeat“ spezifisch erkannt.



**Abbildung 3-4: Erkennungsspezifität eines potentiellen „nullten repeats“ in Hax3.** **A**) RVDs der Hax3 repeats und vier mögliche Hax3-Boxen mit Basenpaaraustauschen (grau hinterlegt) korrespondierend zu der Position eines nullten repeats. **B**) Die vier Hax3-Boxen wurden vor den minimalen Bs4-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C**) Reporterinduktion der Hax3-Box-Derivate durch Hax3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den 35S-Promotor gesteuerten hax3 bzw. dem Leervektor (-) *Agrobacterium*-vermittelt, transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon. Die Abbildung wurde verändert nach Boch *et al.*, 2009.

**Fortsetzung der Beschreibung Abbildung 3-2:**

**A**) Die repeats von AvrBs3, AvrBs3Δrep16, AvrBs3Δrep109 und AvrHah1 wurden mit der UPA-Box des Paprika Bs3-Resistenzgens (EU078684) verglichen. **B**) Die repeats von AvrBs3, AvrBs3Δrep16, AvrBs3Δrep109 und AvrHah1 wurden der UPA-Box des Paprika Bs3-E-Gens (EU078683) gegenübergestellt. **C**) Die repeats von AvrXa27 wurden zu einer potentiellen Zielsequenz im Promotor des Reisgens Xa27 (AY986492) angeordnet. Xa27 wird durch AvrXa27 induziert und löst in dem Reis-Kultivar IRBB27 eine Resistenzreaktion aus, jedoch nicht xa27 (AY986491) des Reis-Kultivars IR24. **D**) Die repeats von PthXo1 wurden mit einer potentiellen Zielsequenz im Promotor des Reisgens Xa13/Os8N3. Xa13 (DQ421396) wird durch PthXo1 induziert und führt in dem Reis-Kultivar IR24 zur Suszeptibilität, aber nicht xa13 (DQ421394) im Reis-Kultivar IRBB13. **E**) Die repeats von PthXo6 wurden mit einer potentiellen Zielsequenz in dem Promotor des Reisgens OsTFX1 (AK108319) verglichen. OsTFX1 wird induziert durch PthXo6 in dem Reis-Kultivar IR24. **F**) Die repeats von PthXo7 wurden einer potentiellen Zielsequenz im Promotor des Reisgens OsTFIIAγ1 (CB097192) gegenübergestellt. OsTFIIAγ1 wird durch PthXo7 in dem Reis-Kultivar IR24 induziert. **G & H**) Die repeats von AvrXa7 (**G**) und TALC (**H**) wurden einer potentiellen Zielsequenz im Promotor des Reisgens Os11N3 (Os11g31190) gegenübergestellt. Os11N3 wird durch AvrXa7 in dem Reis-Kultivar IR24 induziert. **A**) - **H**) Nummern über der DNA-Sequenz geben den Nukleotid-Abstand zum ersten ATG der codierenden Region an. Repeat/Nukleotid-Kombinationen die nicht mit dem Modell der Sequenzspezifität übereinstimmen (RVDs 12/13: NI=A; HD=C; NG=T; NS=A/C/G/T; NN=A/G; IG=T) sind rot dargestellt. Die repeats mit unbekannter DNA-Spezifität sind grün markiert. **A**) - **F**) nach Boch *et al.*, 2009; **G**) - **H**) nach Yu *et al.*, 2011.

### 3.1.2 Hax2 induziert vorhergesagte Zielsequenzen in *Arabidopsis thaliana*

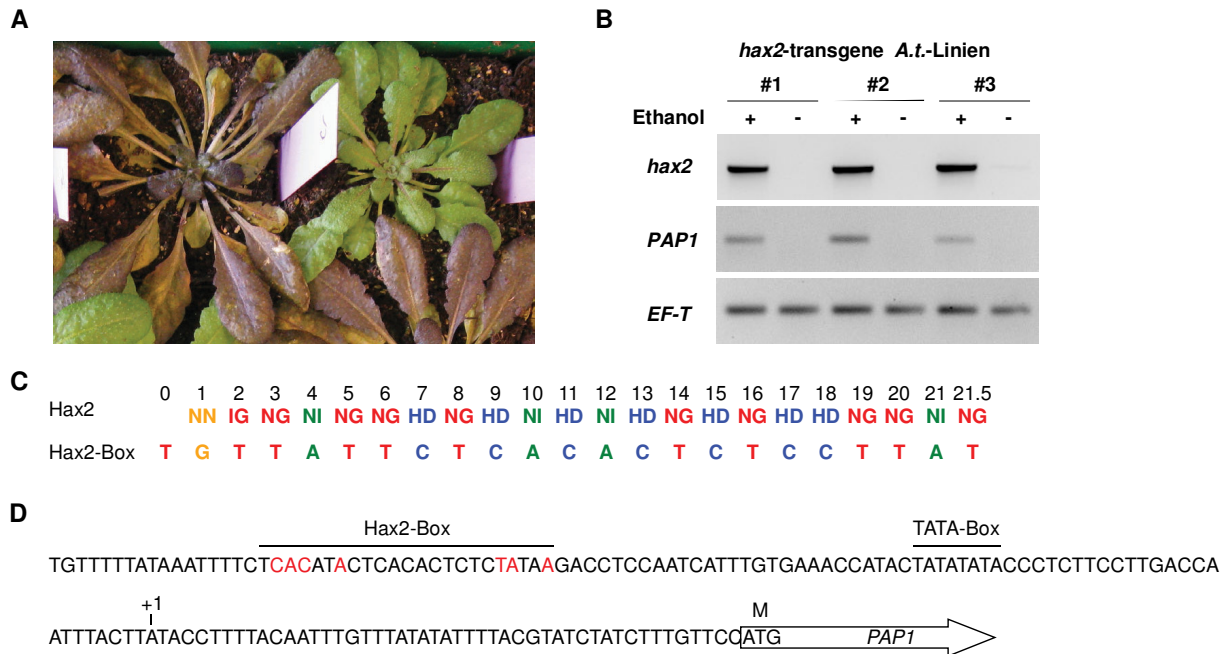
Wie oben gezeigt, können die TAL-Effektoren Hax2, Hax3 und Hax4 nach transienter Ko-Expression als spezifische, transkriptionelle Aktivatoren wirken. Um zu untersuchen ob sie auch in der Lage sind Endogene zu induzieren wurde die Modellpflanze *A. thaliana* genutzt. Über die TAIR-Datenbank unter [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) kann digital das Genom sowie Promotorbereiche nach bestimmten Sequenzen durchsucht werden. Dafür nutzt man ein webbasiertes Hilfsprogramm, was unter *Tools, Patmatch* verlinkt ist und wählt in der Datenbank die Promotorregion aus, z.B. TAIR10 *Loci Upstream Sequences -- 500 bp* (DNA). Die Länge des Promotorbereichs kann auf - 500 Bp, - 1000 Bp oder - 3000 Bp eingegrenzt werden. Für die bereits bekannte Hax2-Box und Hax3-Box wurde die Datenbank durchsucht. Für Hax3 gab es für den Bereich -1000 Bp eine perfekte Box, wenn man eine Fehlpaarung zuließ wurden 36 Boxen gefunden und mit zwei Fehlpaarungen 748 potentielle Boxen. Hax3 hat mit seinen 11,5 *repeats* eine relativ kurze DNA-Bindesequenz. Hax2 dagegen weist mit seinen 21,5 *repeats* eine 23 Bp umfassende Bindesequenz auf. Deswegen sollte es für Hax2 weniger potentielle Boxen geben. Die Datenbanksuche zeigte für -1000 Bp umfassende Promotorbereiche keine passenden Boxen, auch nicht wenn man eine, zwei oder drei Fehlpaarungen erlaubte.

Es war jedoch bekannt, dass Hax2 die Genexpression in *A. thaliana* veränderte. Nach der transienten Ko-Expression von Hax2 trat als Phänotyp eine Lilafärbung der inokulierten Blätter auf, was auf eine vermehrte Anthocyan-Biosynthese hindeutet (A. Nickstadt, persönliche Mitteilung, Boch *et al.*, 2009). Deswegen wurde vermutet, dass Hax2 den Anthocyan-Biosyntheseweg direkt oder indirekt induzierte. Für weitere Untersuchungen wurden *hax2*-transgene *A. thaliana*-Pflanzen generiert, in denen die Expression von *hax2* durch einen Ethanol-induzierbaren Promotor gesteuert wurde (A. Nickstadt). Die Pflanzen wurden mittels PCR auf das Transgen *hax2* getestet. Nach Behandlung aller Pflanzen der aufspaltenden T2-Generation mit Ethanol verfärbten sich 75 von 108 Pflanzen lila, das entspricht 69,4 % (Abbildung 3-5, A). Einige Pflanzen blieben grün, diese trugen laut PCR-Analyse nicht das Transgen *hax2*.

In der Promotorregion von *PAP1* (At1G56650), das einen MYB Transkriptionsfaktor kodiert, der die Anthocyan-Synthese positiv reguliert, konnte eine imperfekte Box für Hax2 identifiziert werden (Abbildung 3-5). In Ethanol-induzierbaren *hax2*-transgenen *A. thaliana*-Linien wurde die *hax2*-spezifische Induktion mittels semiquantitativer (sq) RT-PCR untersucht. Wie Abbildung 3-5 zeigt, konnte in den mit Ethanol behandelten, transgenen



Pflanzen eine Induktion von *PAP1* parallel zu der Expression von *hax2* nachgewiesen werden. Somit konnte die vorhergesagte Zielsequenz von Hax2 vermutlich trotz partieller Fehlpaarung vom Effektor erkannt und die Transkription induziert werden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass anhand einer vorhergesagten Zielsequenz ein Endogen in einer Pflanze durch einen TAL-Effektor induziert wird (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5: Hax2 induziert die Expression von *PAP1* in *A. thaliana*.** **A)** Transgene *A. thaliana*-Linien mit Hax2, was unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbarem Promotor exprimiert wird. Für die Induktion der Expression des Transgens in einer aufspaltenden T2-Population wurden diese mit 10 % Ethanollösung besprüht. Nur *hax2*-transgene Pflanzen akkumulierten Anthocyan. Die Pflanzen wurden sechs Tage nach dem Besprühen aufgenommen. **B)** Semiquantitative RT-PCR von *hax2* (29 Zyklen), *PAP1* (32 Zyklen) und Elongationsfaktor *Tu* (*EF-Tu*, 32 Zyklen) mit cDNA von *hax2*-transgenen Pflanzen von drei unterschiedlichen *A. thaliana*-Linien (*A.t.*-Linien) vor und nach der Behandlung mit Ethanol. **C)** Aminosäuren 12 und 13 der Hax2-repeats und Effektorbindesequenz von Hax2. **D)** Der Promotor von *PAP1* aus *A. thaliana* beinhaltet eine imperfekte Hax2-Box. Fehlpaarungen zu der putativen Hax2-Box sind rot markiert. Eine mögliche TATA-Box, der natürliche Transkriptionsstart (+1) und das erste Codon der kodierenden Sequenz sind angegeben. Die Abbildung wurde verändert nach Boch *et al.*, 2009.

## 3.2 Künstliche TAL-Effektoren

### 3.2.1 Generierung und Untersuchung künstlicher TAL-Effektoren

Damit TAL-Effektoren neue Zielsequenzen erkennen können, müsste die *repeat*-Reihenfolge in der *repeat*-Region der TAL-Effektoren verändert werden. Die hochkonservierten und repetitiven Sequenzen in der *repeat*-Region der TAL-Effektoren verhinderten bisher eine gezielte Klonierung bzw. Mutagenese der *repeats*. Durch die Homologie der *repeats* untereinander konnten z.B. keine Oligonukleotide für gezielte Sequenzveränderungen der

RVDs eingesetzt werden. Somit war es PCR-basiert nicht möglich gezielte *repeat*-Abfolgen zu generieren, um eine veränderte *repeat*-Reihenfolge zu erhalten.

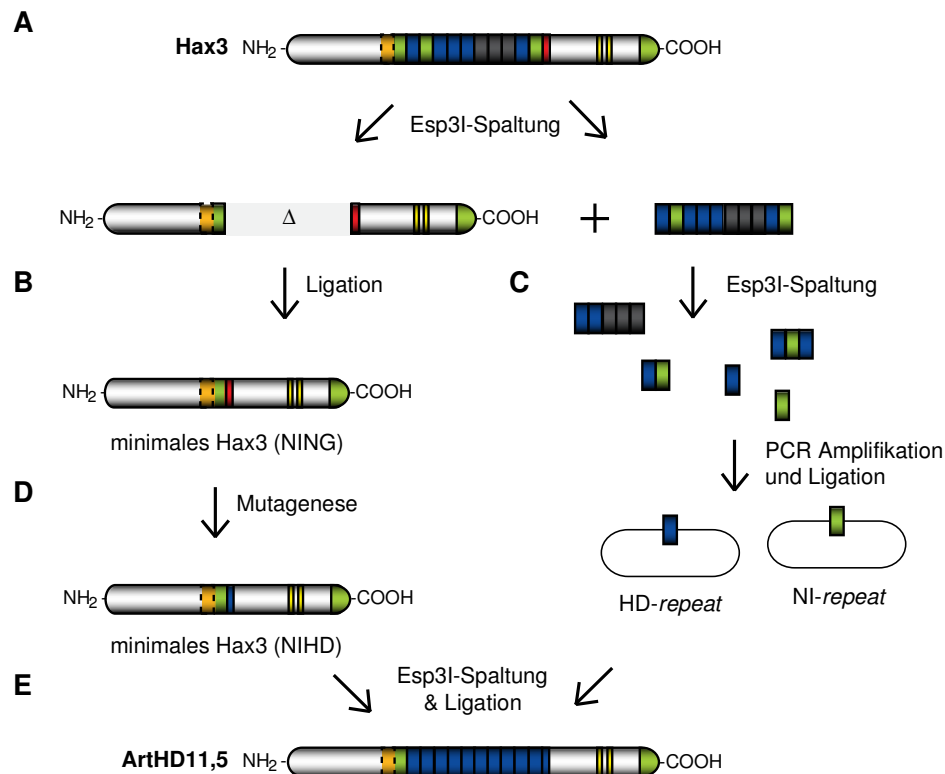
TypIIS-Restriktionsenzyme haben keine palindromische Erkennungssequenz und schneiden versetzt und asymmetrisch zur Erkennungsstelle. Dadurch können im Anschluss die DNA-Fragmente gerichtet ligiert werden. *Esp3I* ist ein TypIIS-Restriktionsenzym und schneidet zufällig ein Mal pro *repeat*. Mittels Restriktionsspaltung mit *Esp3I* können die *repeats* in einem TAL-Effektor bis auf den ersten und letzten halben *repeat* entfernt werden (Abbildung 3-6, A).

Hax3 wurde mit *Esp3I* gespalten, so dass die *repeat*-Region bis auf den ersten und letzten halben *repeat* entfernt wurde. Dieses Fragment wurde religiert und das Resultat war ein auf 1,5 *repeats* minimierter Hax3-Effektor (minimales Hax3 NING) (Abbildung 3-6, B; A. Landgraf, J. Boch). Nach der Spaltung mit *Esp3I* wurden einzelne *repeat*-Fragmente mittels PCR amplifiziert in ein Plasmid kloniert und die Sequenz der Einzel-*repeats* überprüft (A. Landgraf, J. Boch). So konnten die *repeat*-Typen NI, NN, NG und HD kloniert werden (Abbildung 3-6, C). Durch eine erneute Spaltung des minimalen Hax3 NING mit *Esp3I* und anschließendes Einfügen vieler Einzel-*repeat*-Fragmente in den minimalen Hax3-Effektor gelang es, neue Effektoren zu klonieren (A. Landgraf, J. Boch). Dabei war die Insertion der einzelnen *repeats* willkürlich in der Anzahl und Zusammensetzung.

Aus einer Vielzahl neugenerierter TAL-Effektoren wurden zehn künstliche TAL-Effektoren anhand der Größe der *repeat*-Region ausgewählt (Abbildung 3-7, B). Die TAL-Effektoren besitzen 10,5 bzw. 12,5 *repeats*, was dem Umfang im nativen Hax3 (11,5 *repeats*) ähnelt. Die Sequenz und damit die *repeat*-Abfolge der sogenannten ArtX-Effektoren (*artificial mixed*) wurde bestimmt, dazu passende ArtX-Boxen nach dem Modell der Sequenzspezifität abgeleitet (Abbildung 3-7, B) und diese vor den minimalen *Bs4*-Promotor vor das GUS-Reportergen kloniert (Abbildung 3-7, A). Ob analog zu natürlichen Effektoren eine transkriptionelle Induktion durch die zufällig neu zusammengesetzten, künstlichen ArtX-Effektoren möglich war, sollte in transienten GUS-Expressionsstudien untersucht werden. Die ArtX-Effektoren, mit den neukombinierten *repeats*, und die jeweilig korrespondierende Box wurden transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Anschließend wurde anhand der GUS-Aktivität die Induktion des Reportergens durch die ArtX-Effektoren ermittelt.

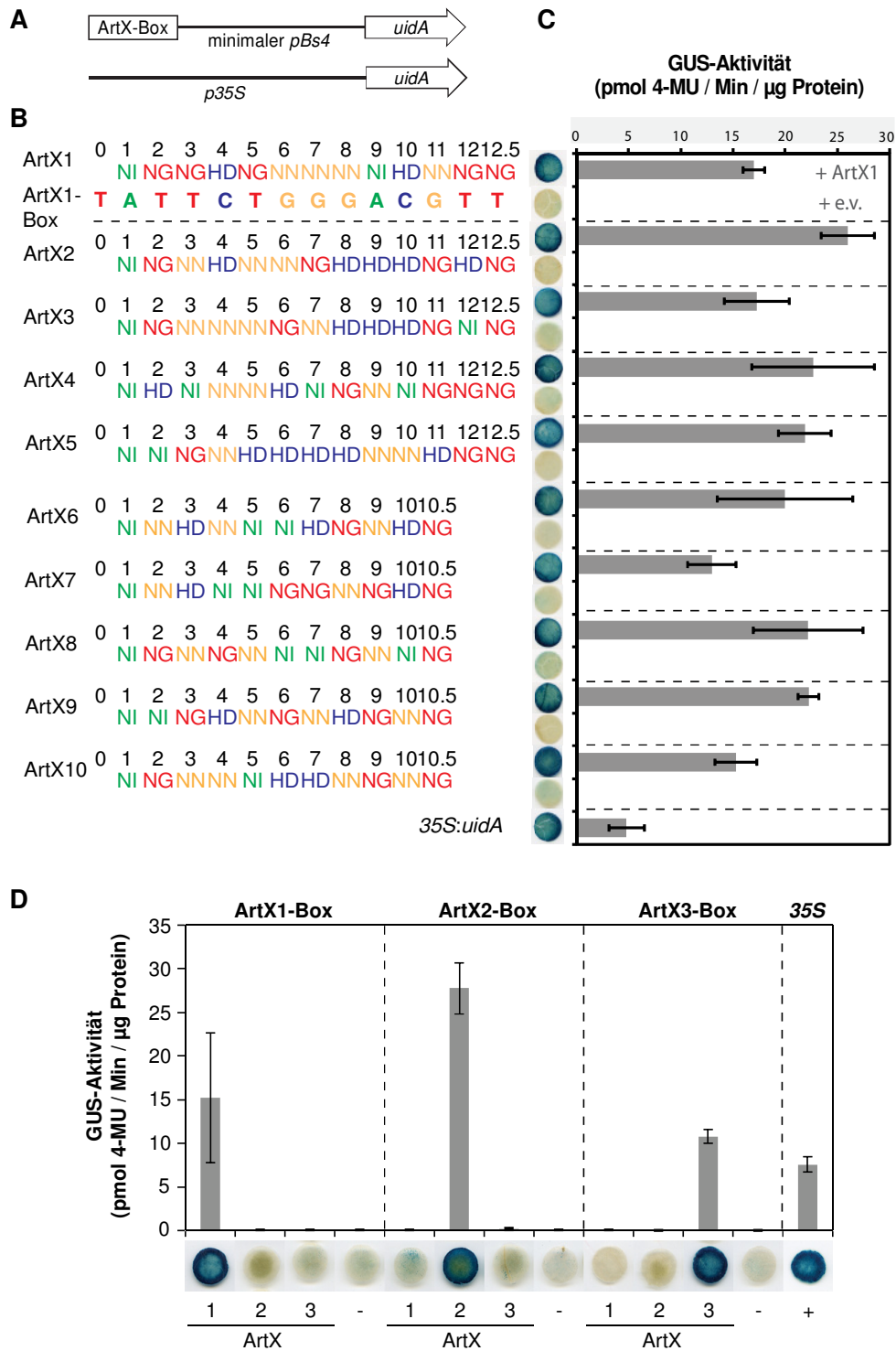
Alle zehn ArtX-Effektoren waren in der Lage die jeweils korrespondierende Box zu induzieren, die, wie die Ko-Expression mit dem Leervektor zeigt, keine eigenen GUS-

Aktivitäten aufwiesen (Abbildung 3-7, C). Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass sich ArtX2 und ArtX3 in nur vier *repeat*-Positionen unterscheiden. Deswegen wurden die drei TAL-Effektoren ArtX1, ArtX2 und ArtX3 in Kreuzexperimenten mit jeweils der ArtX1-, ArtX2- bzw. ArtX3-Boxen analysiert. Die transkriptionelle Induktion des Reportergens erfolgte eindeutig nur für die jeweilig korrespondierende Box (Abbildung 3-7, D).



**Abbildung 3-6: Klonierung künstlicher TAL-Effektoren.** **A)** Hax3 wird ein Mal pro *repeat* durch *Esp3I* gespalten. Dadurch können die *repeats* im Effektor deletiert und vereinzelt werden (**C**). **B)** Der Effektor mit dem verbleibenden ersten und letzten halben *repeat* wurde zu einem minimalen Hax3 mit den repeats NI und NG ligiert. **C)** Die gespaltenen *repeat*-Fragmente wurden in Plasmide kloniert. **D)** Durch Mutagenese wurde das minimale Hax3 NING zum minimalen Hax3 NIHD verändert. **E)** Nach Spaltung mit *Esp3I* und Ligation konnten wie hier am Bsp. von ArtHD11,5 dargestellt, HD-*repeats* in das minimale Hax3 NIHD kloniert werden.

Somit konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die *repeat*-Zusammensetzung in der *repeat*-Region verändert werden kann, um neue DNA-Bindungsspezifitäten zu generieren. Auch können die *repeats* anscheinend willkürlich kombiniert werden, was die vergleichbar starke Induktion des Reportergens belegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Erkennungsspezifität vermutlich nur von den RVDs abhängt und diese anscheinend die Sequenzerkennung sowie die DNA-Bindung vermittelt, womit DNA-Bindenspezifität von TAL-Effektoren vorhersagbar wird.



**Abbildung 3-7: Künstliche TAL-Effektoren mit neuer *repeat*-Zusammensetzung induzieren die Transkription.** **A)** Die ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **B)** RVDs der *repeats* der verschiedenen ArtX1-10 und exemplarisch die abgeleitete ArtX1-Box. **C)** Reporterinduktion der ArtX-Boxen durch die jeweiligen, künstlichen Effektoren ArtX1-10. **D)** Spezifische Reporterinduktion der ArtX1-Box, ArtX2-Box bzw. ArtX3-Box durch den jeweilig korrespondierenden, künstlichen Effektor ArtX1, ArtX2 bzw. ArtX3. **C & D)** GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *artX*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* diente als Positivkontrolle (+). Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

### 3.2.2 Induktion eines Endogens durch einen künstlichen TAL-Effektor

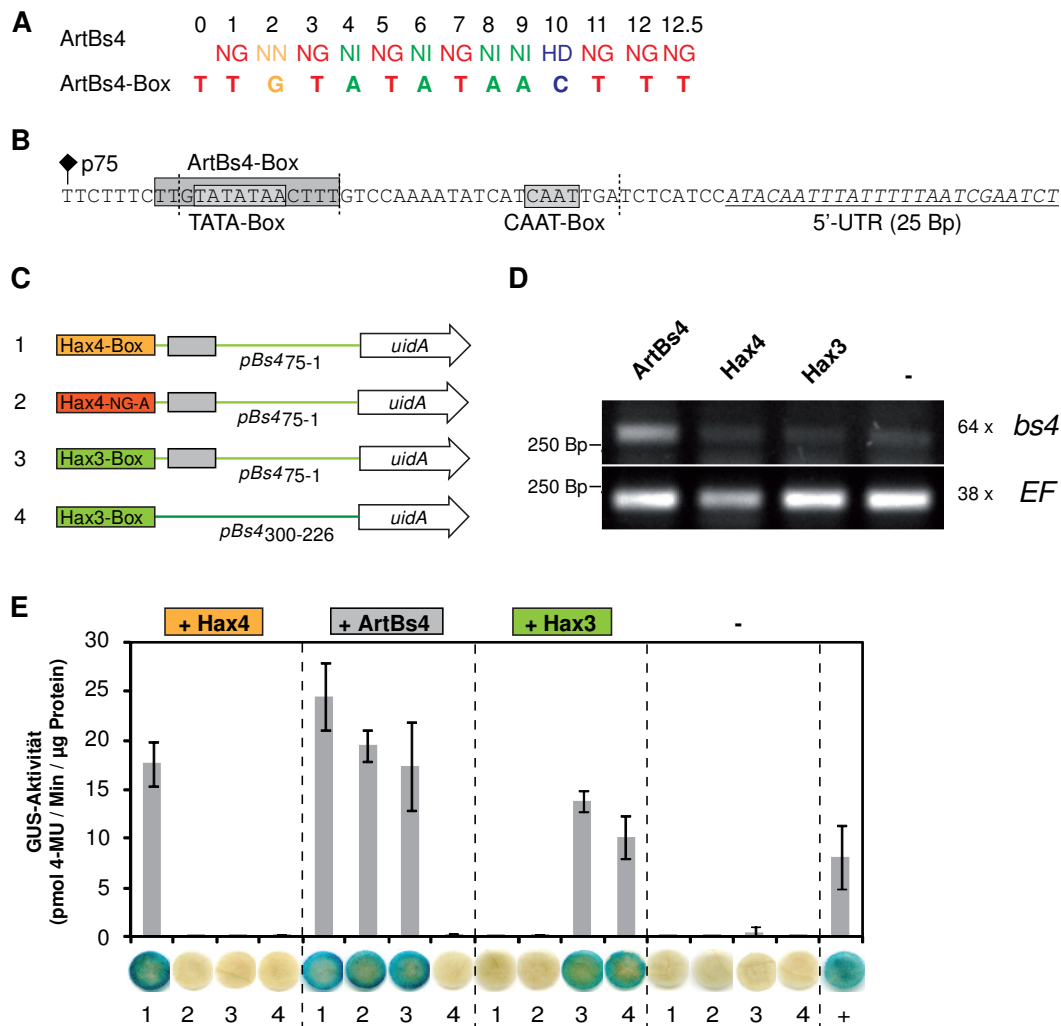
Die Induktion eines pflanzlichen Gens erfolgt nach der Erkennung einer spezifischen Zielsequenz (Box) im Promotor durch den TAL-Effektor. Um pflanzliche Gene gezielt zu induzieren, könnte man künstlich geschaffene TAL-Effektoren nutzen. Die *repeat*-Abfolge dieser TAL-Effektoren müsste dafür an einen Promotorabschnitt der zu induzierenden DNA-Sequenz angepasst werden. Die *repeat*-Region des TAL-Effektors müsste dafür „designt“ werden können.

Um die *repeats* in einer vorherbestimmten Abfolge aneinanderzureihen, wurde als Grundlage die Klonierungsmethode des „*golden gate cloning*“ genutzt. Bei dieser Methode wurde ein TypIIIS-Restriktionsenzym verwendet, um für jedes DNA-Fragment einmalige Überhänge zu generieren (Engler *et al.*, 2008). Diese Klonierungsmethode wurde für die Klonierung der TAL-Effektoren angepasst und „*golden TAL technology*“ genannt (Streubel, 2011). So wurden für jeden *repeat*-Typ und -Position spezifische Überhänge generiert, wodurch im Anschluss eine gezielte Aneinanderreihung der homologen *repeat*-DNA-Fragmente erfolgen konnte.

Mittels dieser Klonierungsstrategie gelang es einen designten, künstlichen Effektor (ArtBs4) herzustellen (A. Landgraf), der 12,5 *repeats* besitzt und eine Spezifität für den minimalen *Bs4*-Promotor (*pBs4*<sub>75-1</sub>) aufweist (Abbildung 3-8, A, B). Die ArtBs4-Box liegt dabei -68 bis -54 Bp stromaufwärts vom ATG. Damit könnten alle bisher generierten und genutzten GUS-Reporterkonstrukte und zusätzlich *Bs4* in Tomatenpflanzen durch ArtBs4 induziert werden.

Um die Aktivität und Spezifität von ArtBs4 zu testen, wurde der TAL-Effektor ArtBs4 bzw. Hax3 und Hax4 sowie deren korrespondierende Reporterkonstrukte transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert und die Reporterexpression analysiert. Qualitative und quantitative GUS-Aktivitätstests belegten, dass die Hax3-Box durch Hax3, die Hax4-Box durch Hax4 und die ArtBs4-Box in allen *pBs4*<sub>75-1</sub>-Reporterkonstrukten durch ArtBs4 spezifisch induziert wurden. Dazu zählt auch das Reporterkonstrukt mit der mutagenisierten Hax4-Box „Hax4 NG/A“, was nicht durch Hax4 erkannt wird (Abbildung 3-9, Boch *et al.*, 2009). Damit kann ArtBs4 als Positivkontrolle der genutzten GUS-Reporterkonstrukte genutzt werden, da die korrespondierende Box sich nicht mit der stromaufwärts inserierten TAL-Box überschneidet und jede TAL-Box individuell induziert werden kann (Abbildung 3-8, C).

Bei Ko-Expression von *artBs4* mit einem Hax3-Box-Reporterkonstrukt, welches die Sequenz eines anderen *Bs4*-Promotorabschnitts (*pBs4*<sub>300-226</sub>) beinhaltet, konnte das Reporter-gen nur durch Hax3 aber nicht durch ArtBs4 induziert werden (Abbildung 3-8, C, E). Die Transkriptionsinduktion des GUS-Reportergens erfolgte somit spezifisch nach der Erkennung der ArtBs4-Box durch ArtBs4 und ist zudem unabhängig von einer davor inserierten Box (Abbildung 3-8, C, E).



**Abbildung 3-8: Der TAL-Effektor ArtBs4: Positivkontrolle und Aktivator eines Endogens.** **A)** Aminosäuren 12 und 13 der *repeats* des künstlich generierten ArtBs4 und dessen Box. **B)** Sequenzausschnitt des *Bs4*-Promotors, die Erkennungssequenz von ArtBs4, sowie die bekannten Promotorelemente sind eingetragen. **C)** Die Hax4-, Hax4-NG-A- bzw. Hax3-Box wurde vor den minimalen *Bs4*-Promotor *pBs4*<sub>75-1</sub> (1-3, hellgrün) sowie die Hax3-Box vor *pBs4*<sub>300-226</sub> (4, dunkelgrün) des *Bs4*-Promotors in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **D)** Semiquantitative RT-PCR von *bs4* (64 Zyklen) und Elongationsfaktor 1α (*EF*, 38 Zyklen) mit cDNA von zwei *L. pennelli*-Pflanzen 48 Stunden nach der Inokulation. **E)** Spezifische Reporter-geninduktion anhand der Boxen durch den jeweiligen (künstlichen) Effektor Hax4, ArtBs4 bzw. Hax3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *hax4*, *artBs4*, *hax3*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Da ArtBs4 eine Sequenz im *Bs4*-Promotor erkennt, sollte dieser TAL-Effektor die Transkription des *Bs4*-Gens in der Pflanze induzieren. Einige TAL-Effektoren, darunter auch Hax3 und Hax4, werden von Bs4 in der Tomatenlinie *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker erkannt und es erfolgt eine Zelltodreaktion (Kay *et al.*, 2005, Schornack *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich vermutlich um eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Bs4 und TAL-Effektor, was zur Auslösung der Resistenzreaktion führt. Um die Erkennung von ArtBs4, was ein Derivat von Hax3 ist, zu umgehen wurde eine alternative Tomatenlinie genutzt. Die Tomatenlinie *L. pennellii* LA2963 enthält das *bs4*-Gen, welches diverse Nukleotid-Polymorphismen zu *Bs4* aufweist (Abbildung 6-4), (Schornack *et al.*, 2004). Aufgrund der Sequenzunterschiede kommt es zu einer Leserahmenverschiebung, was zu einem nicht-funktionalen Genprodukt führt. Das Transkript von *bs4* ist hingegen nachweisbar. Nach *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem Gentransfer wurden *hax3*, *hax4* und *artBs4* für zwei Tage in *L. pennellii* exprimiert. Anschließend wurde semiquantitativ die Transkriptmenge der *bs4* mRNA bestimmt. Die Transkriptmenge von *bs4* ist nach der Induktion mit ArtBs4 erhöht im Vergleich zur Induktion mit Hax3, Hax4 oder dem Leervektor (Abbildung 3-8, D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transkription eines Gens in der Pflanze durch einen designten, künstlichen TAL-Effektoren spezifisch induzierbar ist.

### 3.3 Charakterisierung der *repeat*-Region als DNA-Bindedomäne

#### 3.3.1 Ermittlung von Spezifitäten einzelner *repeat*-Typen

Die *repeat*-Spezifitäten für die vorrangegangenen Experimente wurden anhand des Modells der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren abgeleitet und in transienten GUS-Expressionsstudien untersucht (Abbildung 3-1 & Abbildung 3-7). Um herauszufinden, ob die *repeat*-Typen in der Lage sind spezifisch nur ein Nukleotid oder ggf. mehrere Nukleotide zu erkennen, wurde die Hax4-Box permutiert. Es wurde immer für einen *repeat*-Typ die Box an den entsprechenden Positionen in die drei anderen Nukleotide mutiert, z.B. für den NG-*repeat* an den Box-Positionen 4, 9, 13 und 14,5 wurde statt des korrespondierenden T ein A, C, oder G in die Box eingefügt (Abbildung 3-9, B). Hax4 besitzt eine relativ homogene Verteilung der *repeat*-Typen NI, NG, NS und HD, so dass immer drei bis fünf Basenpaaraustausche in der Box erzeugt wurden. Da der NN-*repeat* nicht in Hax4 vorkommt, wurde zusätzlich der künstliche TAL-Effektor ArtX1 genutzt, um eine analoge Mutationsstudie für den dort vier Mal vorkommenden NN-*repeat* durchführen zu können (Abbildung 3-9, C).

Die mutierten Hax4- und ArtX1-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor vor das GUS-Reportergen kloniert und mit Hax4 bzw. ArtX1 nach der transienten Ko-Expression in *N. benthamiana* analysiert. Quantitative und qualitative GUS-Aktivitätstests belegen, dass die transkriptionelle Induktion des Reportergens an der Hax4-Box durch Hax4 erfolgt. Jedoch war keine GUS-Aktivität bei den Hax4-Boxen NG/A, /C, /G detektierbar (Abbildung 3-9, B). Auch die Konstrukte der Hax4-Boxen HD/A, /G, /T und NI/C, /G, /T wiesen keine GUS-Aktivität auf (Abbildung 3-9, B). Die *repeat*-Typen NG, HD bzw. NI sind somit spezifisch für nur ein Nukleotid T, C bzw. A. Diese Daten sind konform mit dem Modell der Sequenzspezifität der TAL-Effektoren.

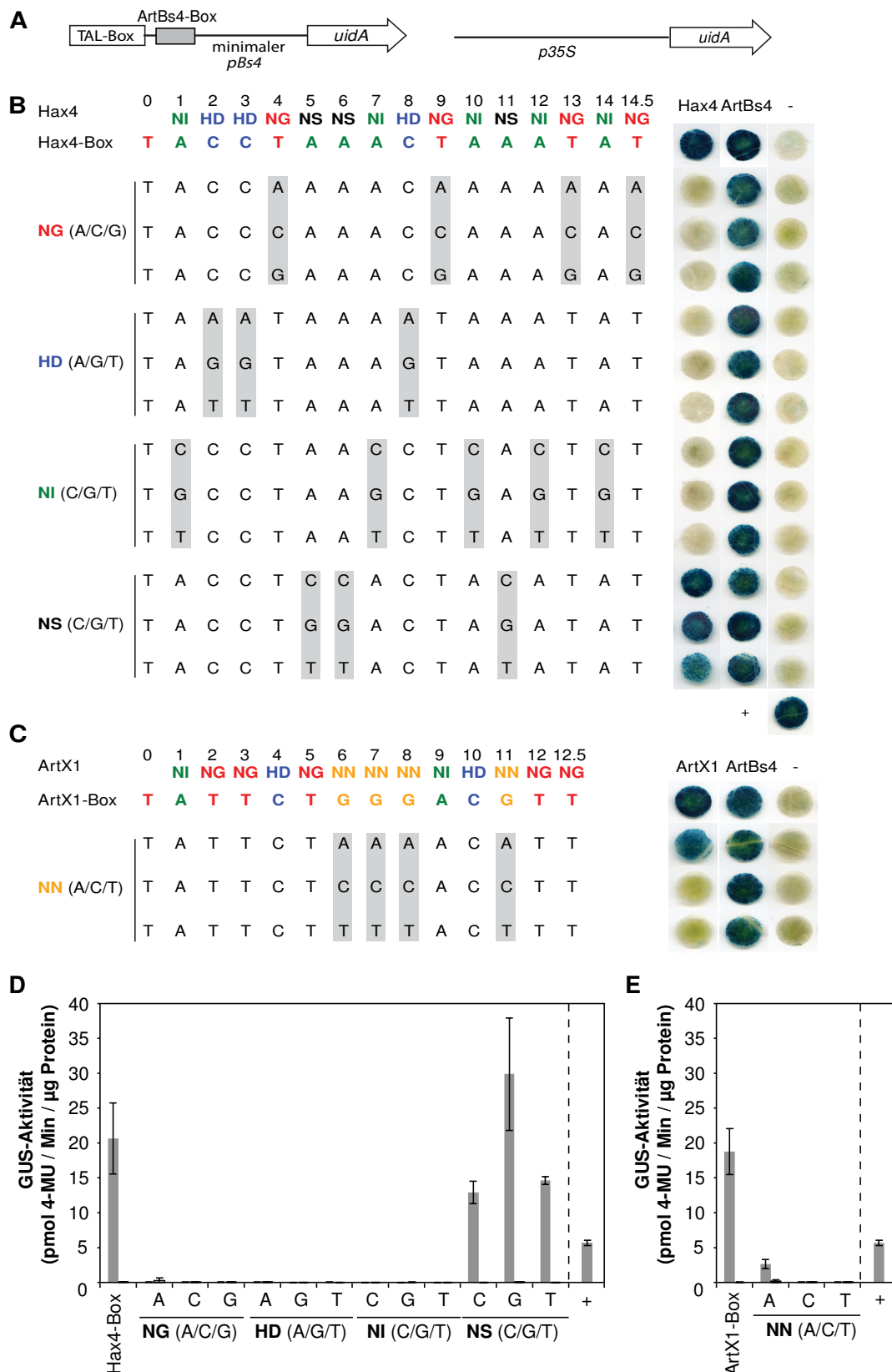
Die Hax4-Boxen NS/C, /G, /T jedoch weisen bei der Induktion durch Hax4 alle eine GUS-Aktivität auf (Abbildung 3-9, B, D). Die GUS-Aktivität war bei der Box NS/G ca. doppelt so hoch wie bei der Hax4-Box. Die Box NS/C weist ebenfalls eine um ca. 30 % erhöhte GUS-Aktivität zur Hax4-Box auf, wohingegen NS/T eine auf ca. 50% reduzierte GUS-Aktivität zur Hax4-Box zeigte (Abbildung 3-9, D). Der *repeat*-Typ NS weist somit keine eindeutige Erkennungsspezifität auf und scheint generell mit der DNA zu interagieren. Die Reporter-gen-Konstrukte mit den ArtX1-Boxen werden nur induziert, wenn sich in der Box korrespondierend zu dem NN-*repeat* ein G- oder ein A-Nukleotid befindet, jedoch nicht bei den Boxen NN/C, /T (Abbildung 3-9, C, E). Der *repeat*-Typ NN erkennt somit spezifisch die zwei Nukleotide G und A. Dies konnte ebenfalls bei der Induktion des AvrXa10-Box-Konstruktes durch AvrXa10 demonstriert werden (Abbildung 3-1).

Somit kann man sagen, dass viele *repeat*-Typen hoch spezifisch die Nukleotide der DNA erkennen, z.B. NI-A, NG-T oder HD-C. Manche *repeat*-Typen wie NN sind in der Lage spezifisch zwei unterschiedliche Nukleotide (A und G) zu erkennen oder weisen wie der NS-Typ keine Spezifität auf und interagieren mit allen Nukleotiden der DNA. In der Tabelle 3-1 sind die ermittelten *repeat*-Spezifitäten zusammengefasst.

**Tabelle 3-1: Zusammenfassung der ermittelten *repeat*-Spezifitäten.**

<b>Repeat-Typ</b>	<b>NI</b>	<b>NN</b>	<b>HD</b>	<b>NG</b>	<b>NS</b>
<b>DNA-Spezifität</b>	<b>A</b>	<b>A, G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A, C, G, T</b>





**Abbildung 3-9: Erkennungsspezifität der repeat-Typen an Basenpaaren. A)** Die z.T. mutierten Hax4- und ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **B)** RVDs der *repeats* von Hax4 und die Hax4-Box sind dargestellt. Zum Test der Spezifität der NG-, HD-, NI- und NS-*repeats* wurde die Hax4-Box an den Nukleotiden für die Erkennung eines *repeat*-Typs in die drei anderen Nukleotide mutiert (grau hinterlegt). Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

**Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 3-9:**

**C)** Spezifitätstest des NN-*repeats*: RVDs von ArtX1 und ArtX1-Box, sowie die mutierten ArtX1-Boxen an denen die Nukleotide für die Erkennung des NN-*repeats* substituiert wurden (grau hinterlegt). **B) - D)** GUS-Reporterplasmide mit den zu untersuchenden Boxen wurden zusammen mit den 35S-Promotor gesteuerten *hax4*- und *artX*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. 35S:*uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. **D) & E)** Spezifische Reporterexpression anhand der TAL-Boxen durch den jeweiligen (künstlichen) Effektor Hax4, ArtX1 bzw. ArtBs4. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Um zu untersuchen, ob die nicht durch Hax4 induzierten Reporterkonstrukte der Hax4-Box- sowie ArtX1-Box-Derivate funktional sind, wurden die gleichen Reporterkonstrukte zur Kontrolle mit ArtBs4 in *N. benthamiana* transient ko-exprimiert. Die ArtBs4-Box befindet sich im 5'-Bereich des minimalen *Bs4*-Promotors (Abbildung 3-8, A, B; Abbildung 3-9, A) und sollte damit in jedem bei diesem Experiment genutzten Reporterkonstrukt durch ArtBs4 induziert werden. Die durchgeführte GUS-Färbung zeigt deutlich, dass alle Hax4-Box-Reporterkonstrukte durch den künstlichen TAL-Effektor ArtBs4 induziert werden konnten (Abbildung 3-9, B, C). Damit konnte bestätigt werden, dass durch die eingebrachten Fehlpaarungen zwischen TAL-Box und den TAL-Effektoren Hax4 bzw. ArtX1 keine Geninduktion bedingt wurde, denn die Reporterkonstrukte waren funktional.

### **3.3.2 Bestimmung der minimalen Länge der benötigten *repeat*-Region für die transkriptionelle Aktivierung**

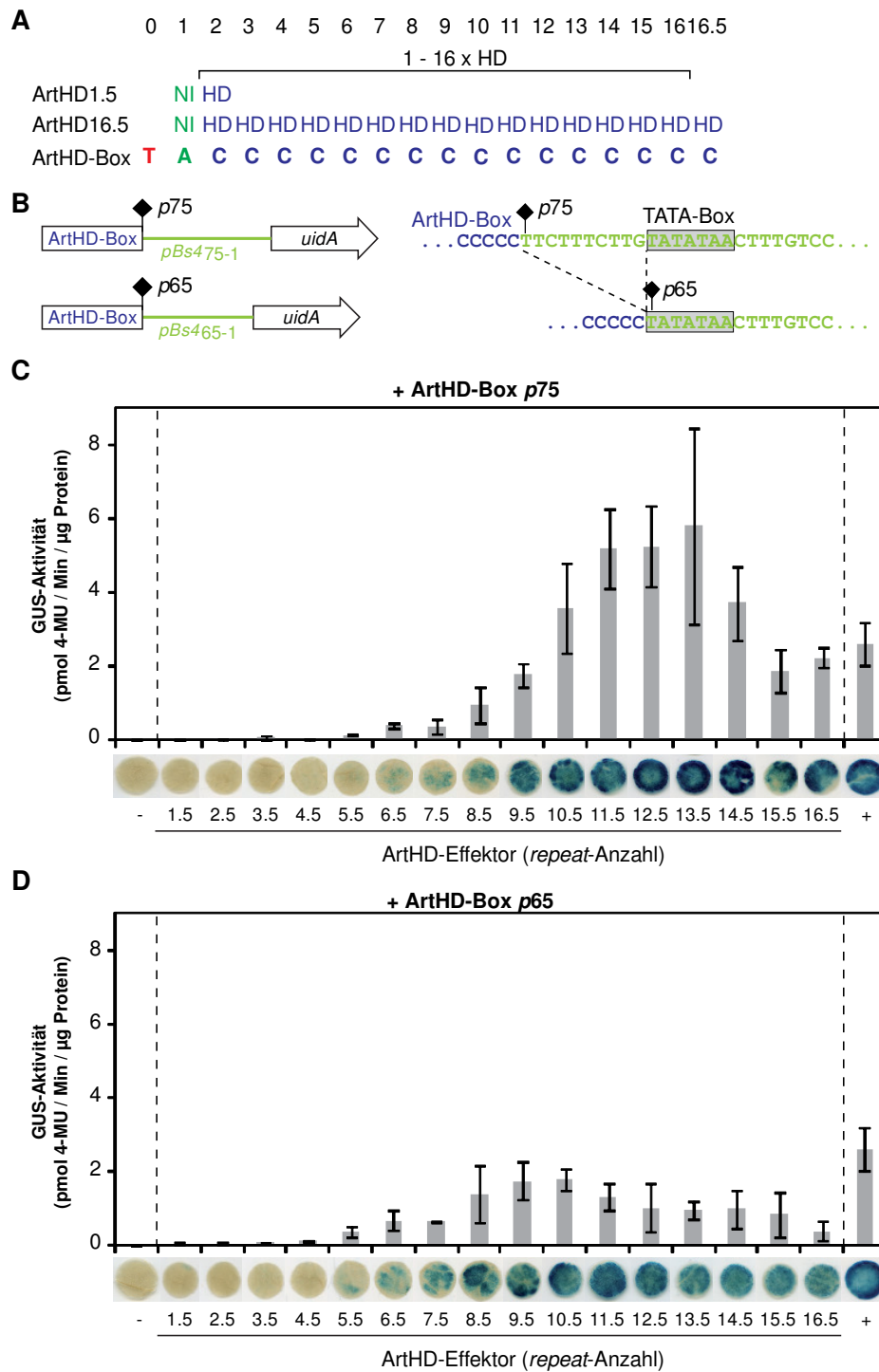
Die bislang bekannten TAL-Effektoren aus *Xanthomonas* spp. besitzen unterschiedlich lange *repeat*-Regionen, die 1,5 bis 33,5 *repeats* aufweisen können (Boch und Bonas, 2010). Um zu untersuchen, ob alle Größenklassen der TAL-Effektoren die Transkription induzieren können, oder ob zu kurze *repeat*-Regionen ggf. eine zu schwache Bindung aufweisen und damit keine Induktion bewirken, sollten künstliche TAL-Effektoren mit verschiedenen langen *repeat*-Regionen untersucht werden. Dazu wurde ein verändertes, minimales Hax3, mit den *repeats* NI und HD [Hax3 (NIHD)], mit Esp3I gespalten und eine unterschiedliche Anzahl eines bestimmten *repeats*-Typs (HD) dazwischen ligiert (Abbildung 3-6, D & E).

Durch die zufällige Ligation von HD-*repeats* wurden verschiedene poly-HD-Konstrukte, mit unterschiedlich langen *repeat*-Regionen erstellt. Die generierten poly-HD-Konstrukte wiesen 1,5 bis 16,5 HD-*repeats* auf. Jeweils ein Vertreter pro Längenklasse wurde nach der Sequenzanalyse in transienten GUS-Expressionsstudien mit der ArtHD-Box untersucht, die vor den minimalen *Bs4*-Promotor und ein promotorloses *uidA* kloniert wurde (Abbildung

3-10, A, B). Die ArtHD-Box besitzt nach dem 5'-initialen T, ein A für den ersten NI-repeat, danach folgen C-Nukleotide (Abbildung 3-10, A). Um zu untersuchen, ob der Abstand der TAL-Box zur TATA-Box einen Einfluss hat, wurden zwei Reporterkonstrukte mit unterschiedlich langer *Bs4*-Promotorsequenz zur Bestimmung der GUS-Aktivität genutzt. Die ArtHD-Box wurde einerseits vor den minimalen *Bs4*-Promotor kloniert (ArtHD-Box *p75*) mit 10 Bp Abstand zur TATA-Box (Abbildung 3-10, B). Andererseits wurde die ArtHD-Box vor eine verkürzte Version des minimalen *Bs4*-Promotors inseriert, der 65 Bp umfasste (ArtHD-Box *p65*), und bei der die ArtHD-Box direkt an die TATA-Box grenzte (Abbildung 3-10, B).

Qualitative und quantitative GUS-Aktivitätstests zeigten für beide Reporterkonstrukte ab 6,5 repeats eine geringe GUS-Aktivität auf, die mit der Anzahl der repeats zunahm (Abbildung 3-10, C, D). Die Stärke der Induktion war bei den beiden Reporterkonstrukten jedoch verschieden. Für die ArtHD-Box *p75* konnte ab 10,5 repeats eine stärkere Reporteraktivität als für die *35S:uidA*-Kontrolle verzeichnet werden. Dies war nicht der Fall für die ArtHD-Box *p65* (Abbildung 3-10, C, D). Dieses Reporterkonstrukt wies eine reduzierte GUS-Aktivität auf, diese war um ca. zwei Drittel verringert, im Vergleich zu der ArtHD-Box *p75* (Abbildung 3-10, Boch *et al.*, 2009, Fig. 4). Die Induktion des GUS-Reportergens mit der ArtHD *p65*-Box erreichte zudem nicht die Expressionsrate des *35S*-Promotors. Deswegen wurde diese Box nicht weiter genutzt und die ArtHD *p75*-Box für Wiederholungen verwendet.

Anhand dieser Versuche kann man sagen, dass eine Mindestanzahl von 6,5 repeats nötig ist, um eine detektierbare, transkriptionelle Induktion des Reportergens zu erreichen. Weiterhin scheint der Abstand zur TATA-Box einen Einfluss auf die induzierte Transkriptmenge zu haben.



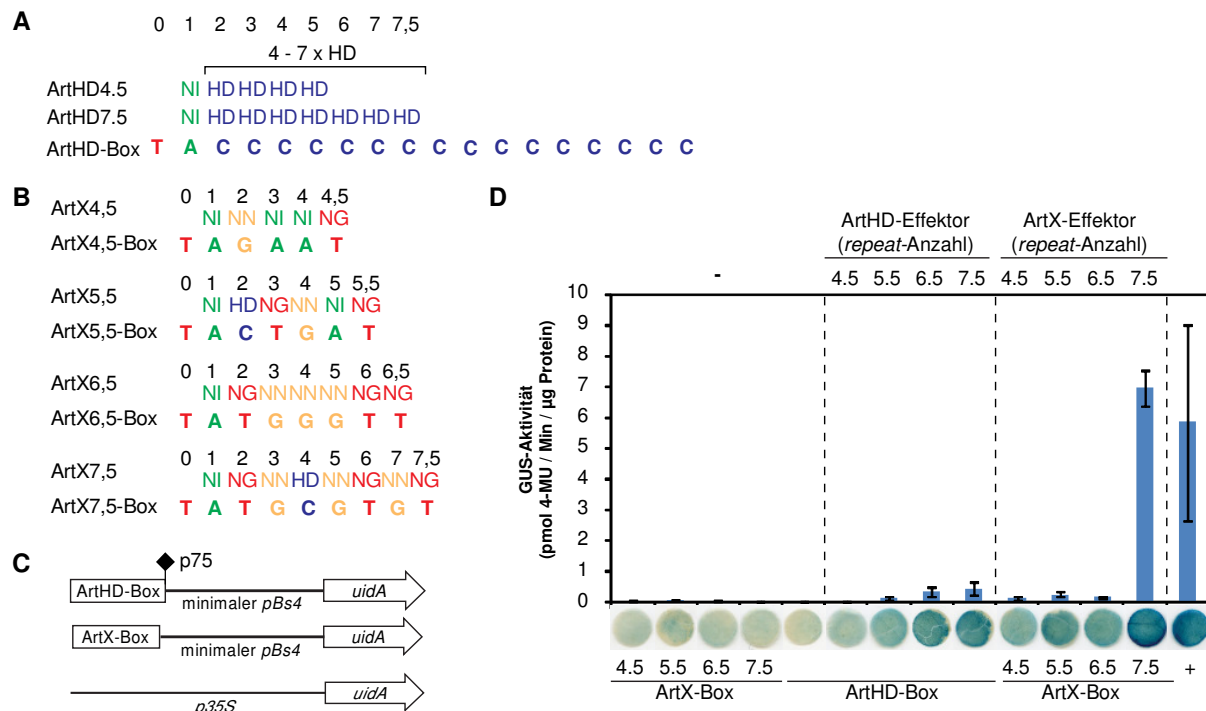
**Abbildung 3-10: Künstliche TAL-Effektoren induzieren die Transkription in Abhängigkeit von der Anzahl der repeats.**

**A)** RVDs der repeats der verschiedenen ArtHDs mit 1,5 bis 16,5 repeats und deren korrespondierende Box. **B)** Die ArtHD-Boxen wurden vor zwei unterschiedlich lange Sequenzabschnitte des minimalen *Bs4*-Promotors in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. Der blaue Sequenzabschnitt zeigt das 3'-Ende der ArtHD-Box und in grün ist die angrenzende stromabwärts liegende Sequenz des *pBs4* dargestellt. **C & D)** Spezifische Reporterinduktion der ArtHD-Boxen durch die künstlichen Effektoren ArtHD1,5-16,5. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *artHD*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon. Wiederholungen wurden mit der ArtHD<sub>p75</sub>-Box durchgeführt, siehe Boch *et al.*, 2009.

Um zu untersuchen, ob die Mindestanzahl von 6,5 *repeats* in anderen TAL-Effektoren ebenfalls für die Induktion der Transkription ausreicht, wurden weitere ArtX-Effektoren genutzt. Diese TAL-Effektoren sind künstlich und zufällig generiert, so dass deren *repeat*-Zusammensetzung im Gegensatz zu den ArtHDs variiert. Der Übergang von keiner Induktion zur Induktionsfähigkeit sollte anhand von vier ArtX-Effektoren mit *repeat*-Regionen von 4,5 bis 7,5 *repeats* untersucht werden. Dafür wurde die Kollektion der künstlich, zufällig, ligierten ArtX-Effektoren über Restriktionsspaltung untersucht und anhand ihrer Größe konnten zehn weitere ArtX mit den *repeat*-Regionen in der entsprechenden Größenordnung gefunden werden. Diese ArtX wurden näher analysiert, in die vier Größenklassen eingeteilt und sequenziert. Es konnten zwei ArtX mit 4,5, vier ArtX mit 5,5, ein ArtX mit 6,5 und drei ArtX mit 7,5 *repeats* identifiziert werden. Für die Induktionsstudien wurden für jeweils einen ArtX pro Größenklasse eine entsprechende TAL-Box abgeleitet (Abbildung 3-11). Diese wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor und ein promotorloses *uidA* kloniert. Nach der transienten Ko-Expression in *N. benthamiana* wurde zunächst die GFP-Fluoreszenz untersucht, um zu festzustellen, ob alle der relativ kurzen ArtX-Konstrukte exprimiert wurden. Anschließend wurden GUS-Aktivitätstests durchgeführt, wobei parallel die ArtHD-Konstrukte mit 4,5 bis 7,5 *repeats* mit der ArtHD-Box p75 untersucht wurden.

Die Expression der ArtX<sub>4,5</sub> bis ArtX<sub>7,5</sub> sowie deren Lokalisation im Nukleus konnte am LSM nachgewiesen werden. Die GUS-Aktivitäten der ArtHD-Konstrukte sind vergleichbar mit den vorherigen Experimenten (Abbildung 3-10). Mit Zunahme der *repeat*-Anzahl steigt die GUS-Aktivität leicht an (Abbildung 3-11, D). Bei den ArtX-Konstrukten mit 4,5 bis 6,5 *repeats* ist die GUS-Aktivität ähnlich gering. Die ArtX und ArtHD unterscheiden sich kaum, wobei der ArtHD<sub>6,5</sub> eine etwas größere GUS-Aktivität als ArtX<sub>6,5</sub> aufweist. Andererseits ist die GUS-Aktivität durch den ArtX<sub>7,5</sub> sechs Mal höher als die des ArtHD<sub>7,5</sub> (Abbildung 3-11, D).

Anhand dieser Experimente kann man die minimale *repeat*-Anzahl von 7,5 *repeats* festhalten, die bei gemischten *repeats* eine stärkere Induktion des Reportergens hervorrufen, als die konstitutive Expression des *uidA*. Diese Ergebnisse könnten mit weiteren Experimenten von künstlichen TAL-Effektoren gefestigt werden, da jedoch nur ein ArtX<sub>6,5</sub> gefunden wurde, war ein zweiter Vergleich an dieser Stelle nicht möglich.



**Abbildung 3-11: Künstliche ArtX-Effektoren induzieren die Transkription in Abhängigkeit von der Anzahl der repeats.** **A)** RVDs der repeats der ArtHD4,5 bis ArtHD7,5 und deren korrespondierende ArtHD-Box. **B)** RVDs der repeats der ArtX4,5 bis ArtX7,5 und deren korrespondierende ArtX-Boxen. **C)** Die ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **D)** Spezifische Reporterinduktion der ArtHD-Box durch die künstlichen Effektoren ArtHD4,5-7,5 bzw. der ArtX-Boxen durch die jeweiligen ArtX4,5-7,5. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *artHD*-Genen, *artX*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

### 3.3.3 Der Einfluss von Fehlpaarungen auf die Geninduktion durch einen TAL-Effektor

In der Natur gibt es nicht immer perfekt passende Boxen für die natürlichen TAL-Effektoren, die dennoch spezifisch Gene induzieren. Anscheinend werden in der Pflanze geringe Fehlpaarungen toleriert (Abbildung 3-2, Tabelle 4-1). An welchen Positionen und in welchem Maße Fehlpaarungen erlaubt sind, sollte nun untersucht werden. Bei der Untersuchung der *repeat*-Spezifitäten am Effektor Hax4 konnte gezeigt werden, dass eine Fehlpaarung von drei *repeats* mit der Box die Geninduktion verhindert (Abbildung 3-9).

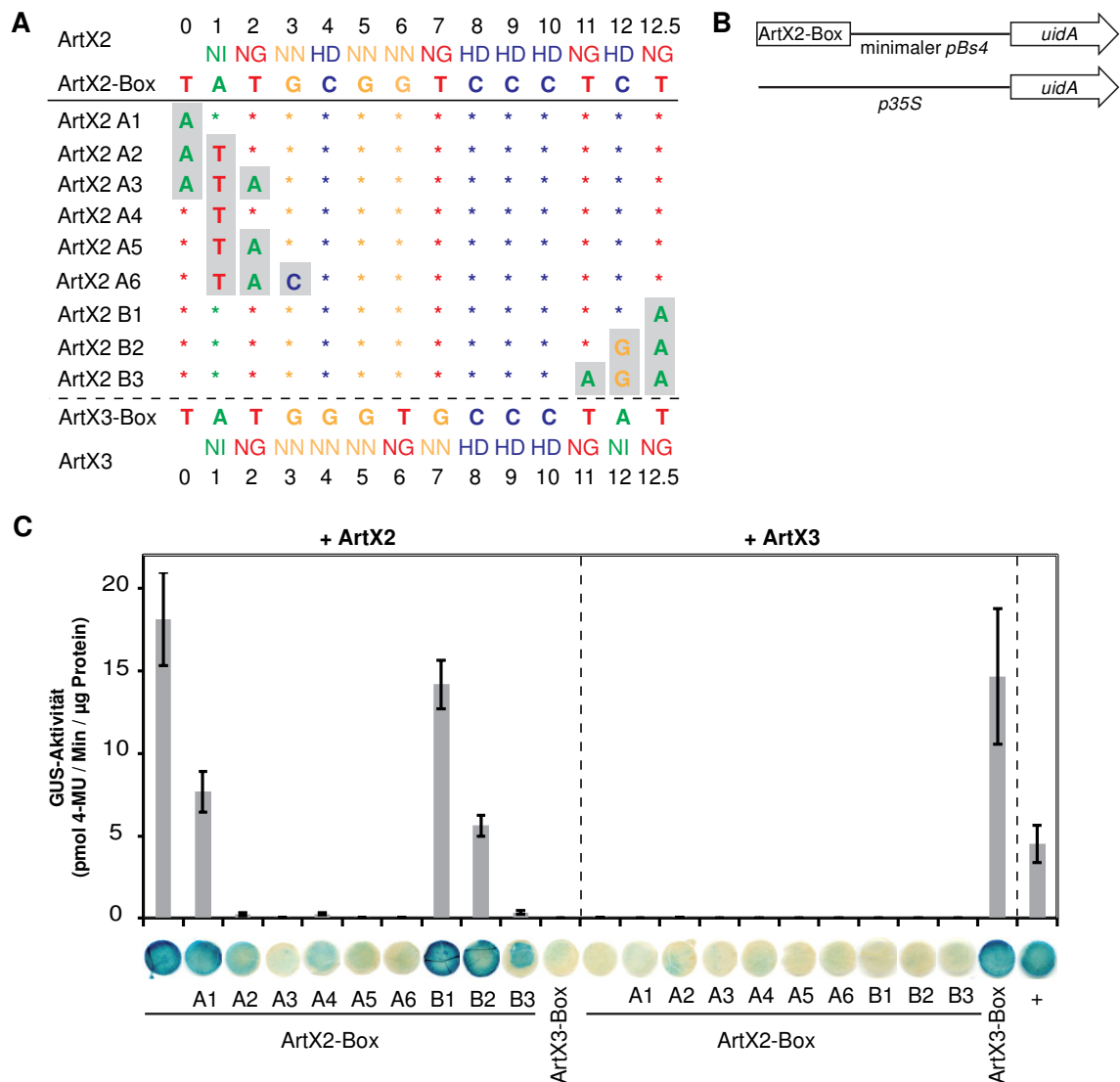
Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine bis drei Fehlpaarungen auf die transkriptionelle Geninduktion durch einen TAL-Effektor haben, wurde zuerst der Randbereich der Box untersucht. Dafür wurden neue Boxen für den 12,5 *repeats* umfassenden ArtX2 generiert und mit dem minimalen *Bs4*-Promotor vor ein promotorloses GUS-Reportergen kloniert (Abbildung 3-12, B). In der korrespondierenden ArtX2-Box wurden eine bis drei Nukleotide

am 5'- bzw. am 3'-Ende in das komplementäre Nukleotid mutiert, so dass am 5'- oder 3'-Ende eine, zwei oder drei Fehlpaarungen entstanden (Abbildung 3-12, A). Am 5'-Bereich der Box musste die Besonderheit des initialen T beachtet werden, weshalb hier sechs verschiedene Mutationen vorgenommen wurden. Zum Einen wurden das Nukleotid mutiert, die korrespondierend für den ersten, ersten und zweiten bzw. ersten, zweiten und dritten *repeat* sind (Box A4, A5 und A6); zum Zweiten wurden analog ein, zwei oder drei Bp-betreffende Mutationen in der Box eingefügt, dass Fehlpaarungen auch den nullten *repeat* betrafen (Box A1, A2 und A3) (Abbildung 3-12, A).

Die GUS-Aktivitätstests zeigten, dass die Induktion des Reportergens besonders mit am 5'-Bereich mutagenisierten Boxen stark vermindert war (Abbildung 3-12, C). Die GUS-Aktivität für den Reporter mit der Mutation an Position 0 der Box (A1) war ca. um 50 % reduziert. Für die Reporterkonstrukte mit den Mutationen korrespondierend zum nullten und ersten *repeat* (A2) sowie nullten, ersten und zweiten *repeat* (A3) waren keine GUS-Aktivitäten messbar. Wenn Fehlpaarungen korrespondierend zum ersten (A4), ersten und zweiten (A5) bzw. ersten bis dritten *repeat* (A6) in den Boxen inseriert wurden, konnten ebenfalls keine GUS-Aktivitäten detektiert werden (Abbildung 3-12, C). Somit scheint die Interaktion im 5'-Bereich der TAL-Box sehr wichtig zu sein. Es werden anscheinend keine Fehlpaarungen, außer zum nullten *repeat* toleriert, wobei auch dort eine deutliche Reduktion der GUS-Aktivität zu verzeichnen war.

Die Mutationen am 3'-Bereich zeigten dagegen weniger drastische Effekte. Bei der Mutation korrespondierend zum letzten halben *repeat* (B1) war die GUS-Aktivität um ca. 20 % reduziert (Abbildung 3-12, C). Bei zwei Fehlpaarungen (B2) war die GUS-Aktivität um ca. 70 % verringert und bei drei Fehlpaarungen am 3'-Ende der Box konnte keine GUS-Aktivität gemessen werden. Somit wiesen die Reporterkonstrukte mit steigender Mutationsrate (B1, B2, B3) eine zunehmend sinkende GUS-Aktivität auf, bis diese bei drei Fehlpaarungen nicht mehr detektierbar war.

Die Unterschiede in der Reporterinduktion durch ArtX2 zeigten, dass Fehlpaarungen zwischen TAL-Effektor und Box nur bedingt toleriert wurden und dass besonders Fehlpaarungen im 5'-Bereich die Induktion durch den TAL-Effektor inhibierten. Die Position der Mutation bzw. die Addition von Mutationen in der Box verhinderten eine Reporterinduktion, so dass von einer bis zu drei Fehlpaarungen keine Geninduktion durch den 12,5 *repeats* umfassenden ArtX2 mehr stattfand.



**Abbildung 3-12: Eingeschränkte transkriptionelle Induktion bei Fehlpaarungen im Randbereich der ArtX2-Box. A)** Aminosäuren 12 und 13 der *repeats* des künstlich generierten ArtX2 und ArtX3 und deren Boxen. Einzelne Nukleotide im 5'- und 3'-Bereich der ArtX2-Box wurde zum komplementären Nukleotid mutiert (grau hinterlegt). **B)** Die ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C)** Spezifische Reporterinduktion der ArtX-Boxen durch die korrespondierenden, künstlichen Effektoren ArtX2 bzw. ArtX3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *artX*-Genen transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Ein künstlicher Effektor mit 12,5 *repeats* spiegelt nicht die Mehrheit von natürlichen TAL-Effektoren wieder, die meist mehr *repeats* aufweisen und eine andere *As*-Länge pro *repeat* haben können (Boch und Bonas, 2010). Um zu untersuchen, ob die Geninduktion durch Fehlpaarungen im 5' und 3'-Bereich der Box auch bei anderen TAL-Effektoren verhindert wird, wurden zwei weitere TAL-Effektoren untersucht. Dafür wurden der natürliche Effektor Hax2 und der künstliche Effektor ArtX5 ausgewählt, denn diese besitzen eine andere *repeat*-

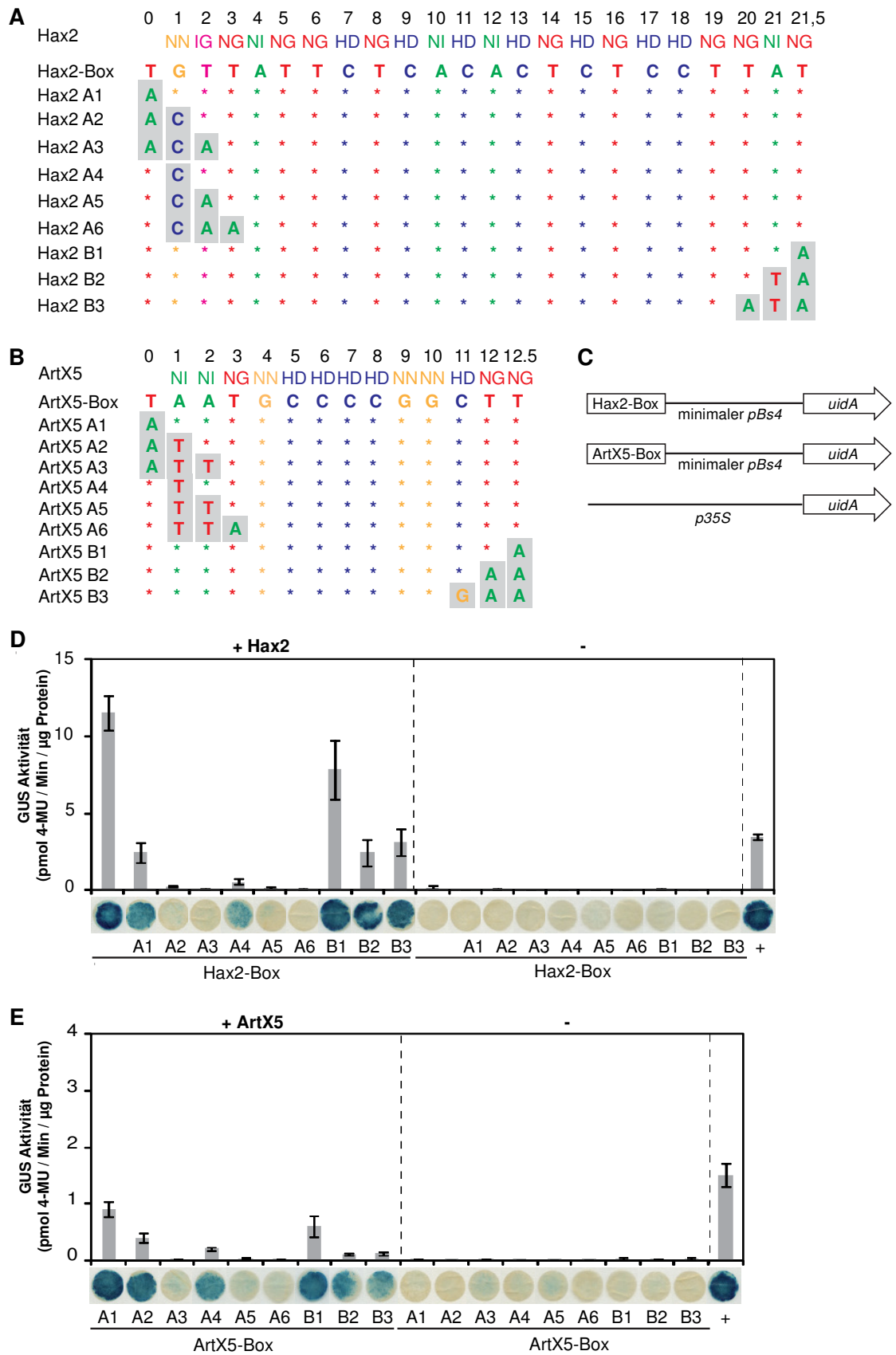




Die Mutationen am 3'-Ende der Box hatten unterschiedliche Einflüsse. Bei den Fehlpaarungen der Hax2-Box war der Einfluss auf die Reporterogenaktivierung durch den TAL-Effektor geringer, als Mutationen im 5'-Bereich, ähnlich wie bei ArtX2. Die GUS-Aktivität der Mutante korrespondierend zum letzten halben *repeat* (B1) war auf ca. 60 %, die von korrespondierend zum letzten und vorletzten *repeat* (B2) und korrespondierend zu den drei letzten *repeats* (B3) auf ca. 30 % reduziert im Vergleich zur Hax2-Box nach Induktion durch den Hax2-Effektor. Für die Box-Variationen der ArtX5-Box, war für B1 eine um ca. 75 % reduzierte GUS-Aktivität und für B2 und B3 je eine wenig über dem Hintergrund liegende Reporterogeninduktion zu verzeichnen (Abbildung 3-14, E).

Die zur ArtX2-Box analog gestaltete Fehlpaarungsstudien mit den spezifischen Boxen von ArtX5 und Hax2 zeigten, dass die jeweiligen Randbereiche der Box einen bedeutenden Einfluss auf die transkriptionelle Induktion durch einen TAL-Effektor haben. Insbesondere der 5'-Bereich der untersuchten Boxen war essentiell für eine starke Aktivierung. Es genügte eine Fehlpaarung korrespondierend zum ersten *repeat*, so dass die Geninduktion nicht mehr stattfand. Interessanterweise konnte der essentielle Einfluss des initialen T für den nullten *repeat* nicht im gleichen Umfang wie bei der Untersuchung der Hax3-Box gezeigt werden (Abbildung 3-4). Trotzdem konnte für die GUS-Aktivität eine starke Reduktion von 50 % bis 70 % ermittelt werden.

Die Interaktion des letzten halben *repeats* mit der Box scheint weniger relevant zu sein, da die Reduktion der GUS-Aktivität meist weniger als 30 % betrug. Jedoch führten Mutationen an den letzten zwei Nukleotiden der Box zu einer deutlichen Reduktion der GUS-Aktivität. Bei drei Fehlpaarungen in Folge kam es ebenfalls zu einer starken Reduktion (Hax2-Box B3) bzw. zum Verlust der transkriptionellen Induktion durch die TAL-Effektoren ArtX2 und ArtX5. Die ähnlichen Ergebnisse der unterschiedlichen TAL-Effektoren und deren Boxen zeigen, dass die Induktion vermutlich dem gleichen Mechanismus folgt, unabhängig von der Anzahl der *repeats* oder den *repeat*-Typen.



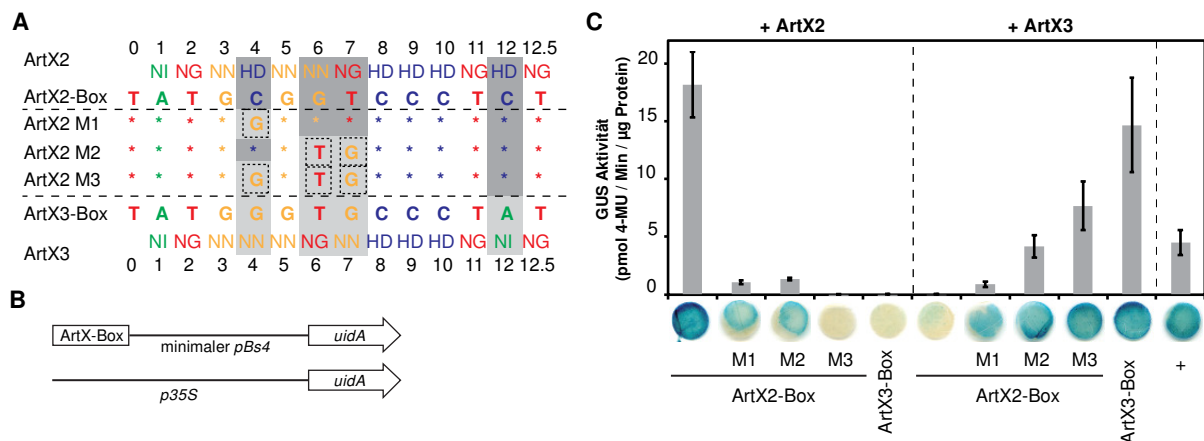
**Abbildung 3-14: Eingeschränkte transkriptionelle Geninduktion bei Fehlpaarungen im Randbereich der TAL-Box bei unterschiedlichen TAL-Effektoren.** Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

**Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 3-14:**

**A & B)** Aminosäuren 12 und 13 der *repeats* von Hax2 und des künstlich generierten ArtX5 und deren Boxen. Die Hax2- sowie die ArtX5-Box wurden analog zu den Studien an der ArtX2-Box am 5'- und 3'-Bereich zum komplementären Nukleotid mutiert (grau hinterlegt). **C)** Die Hax2- bzw. ArtX5-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **D & E)** Spezifische Reportergergeninduktion der Hax2- bzw. ArtX5-Boxen durch die korrespondierenden, TAL-Effektoren Hax2 bzw. ArtX5. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *hax2*, *artX5* bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Bei Einzelmutationsstudien der *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box wurde herausgefunden, dass die Erkennung von *AvrBs3* auch bei einzelnen Fehlpaarungen in der Mitte der Box teilweise nicht mehr gegeben war und keine HR ausgelöst wurde (Römer *et al.*, 2009a; Scholze, 2008). Besonders die Mutationen von Cytosin-Nukleotiden in der Box führten zum Verlust der Erkennung durch *AvrBs3* (Römer *et al.*, 2009a). Die künstlich generierten TAL-Effektoren ArtX2 und ArtX3 unterscheiden sich in der *repeat*-Abfolge in nur vier *repeats* (siehe Kapitel 3.2.2), deswegen wurden diese Boxen als Grundlage für Chimäre-DNA-Boxen (M1, M2, M3) genutzt und an diesen internen Fehlpaarungen (eins bis vier) zu den Effektoren untersucht. Die drei neuen Boxen für ArtX2 M1-M3 wurden mit dem minimalen *Bs4*-Promotor vor das GUS-Reportergergen kloniert (Abbildung 3-15 A, B).

Qualitative und quantitative GUS-Aktivitätstests zeigten für die ArtX2-Box-Variationen eine stark reduzierte Reportergergenaktivität im Vergleich zur ArtX2-Box (Abbildung 3-15). ArtX2-Box M1 und M2 wiesen mit einer bzw. zwei Fehlpaarungen zu ArtX2 eine Reduktion um ca. 90 % auf. Die Reporterkonstrukte der ArtX2 M3 (drei Fehlpaarungen) sowie die ArtX3-Box wurden nicht durch ArtX2 induziert (Abbildung 3-15, C). Bei der Ko-Expression von *artX3* mit der ArtX3-Box war eine starke GUS-Aktivität messbar. Die veränderten ArtX2-Boxen wiesen eine geringere GUS-Aktivität auf, die mit der Fehlpaarungsquote proportional war (Abbildung 3-15). Für die ArtX2-Box-Variationen war eine Reduktion bei ArtX2 M3 (eine Fehlpaarung zu ArtX3) um 50 %, bei ArtX2 M2 (zwei Fehlpaarungen zu ArtX3) um ca. 66 % und bei ArtX2 M1 (drei Fehlpaarungen zu ArtX3) um ca. 90 % der GUS-Aktivität zu verzeichnen. Die ArtX2-Box konnte nicht durch ArtX3 induziert werden (Abbildung 3-15, C).



**Abbildung 3-15: Fehlpaarungen wirken negativ auf die spezifische Induktion der TAL-Effektoren.** **A)** RVDs der *repeats* der künstlich generierten ArtX2 und ArtX3 und deren Boxen. Die Unterschiede von ArtX2 und ArtX3 sind grau hinterlegt. Die Sequenz der ArtX2-Box wurde schrittweise zur Sequenz der ArtX3-Box mutiert. Dies betraf die Nukleotide korrespondierend zum 4. (M1), 6. und 7. (M2) bzw. 4., 6. und 7. *repeat* (M3) (hellgrau hinterlegt). Die Triple-Mutante (M3) weist somit nur eine Fehlpaarung für *repeat* 12 zur ArtX3-Box auf. **B)** Die ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C)** Spezifische Reportergeninduktion der ArtX-Boxen durch die korrespondierenden, künstlichen Effektoren ArtX2 bzw. ArtX3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *artX*-Genen transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Diese Ergebnisse zeigten, dass durch Fehlpaarung von nur einem Bp mit einem *repeat* bei einem 12,5 *repeats* umfassenden TAL-Effektor eine deutliche Reduktion der transkriptionellen Geninduktion stattfand. Weiterhin war bei zwei und mehr Fehlpaarungen eine sehr starke Reduktion der Reportergenaktivität zu verzeichnen. Die Ergebnisse der ArtX2-Box-Fehlpaarungsstudie (Abbildung 3-15) gehen z.T. konform mit den Ergebnissen der Promotormutationsstudien von *Bs3*.

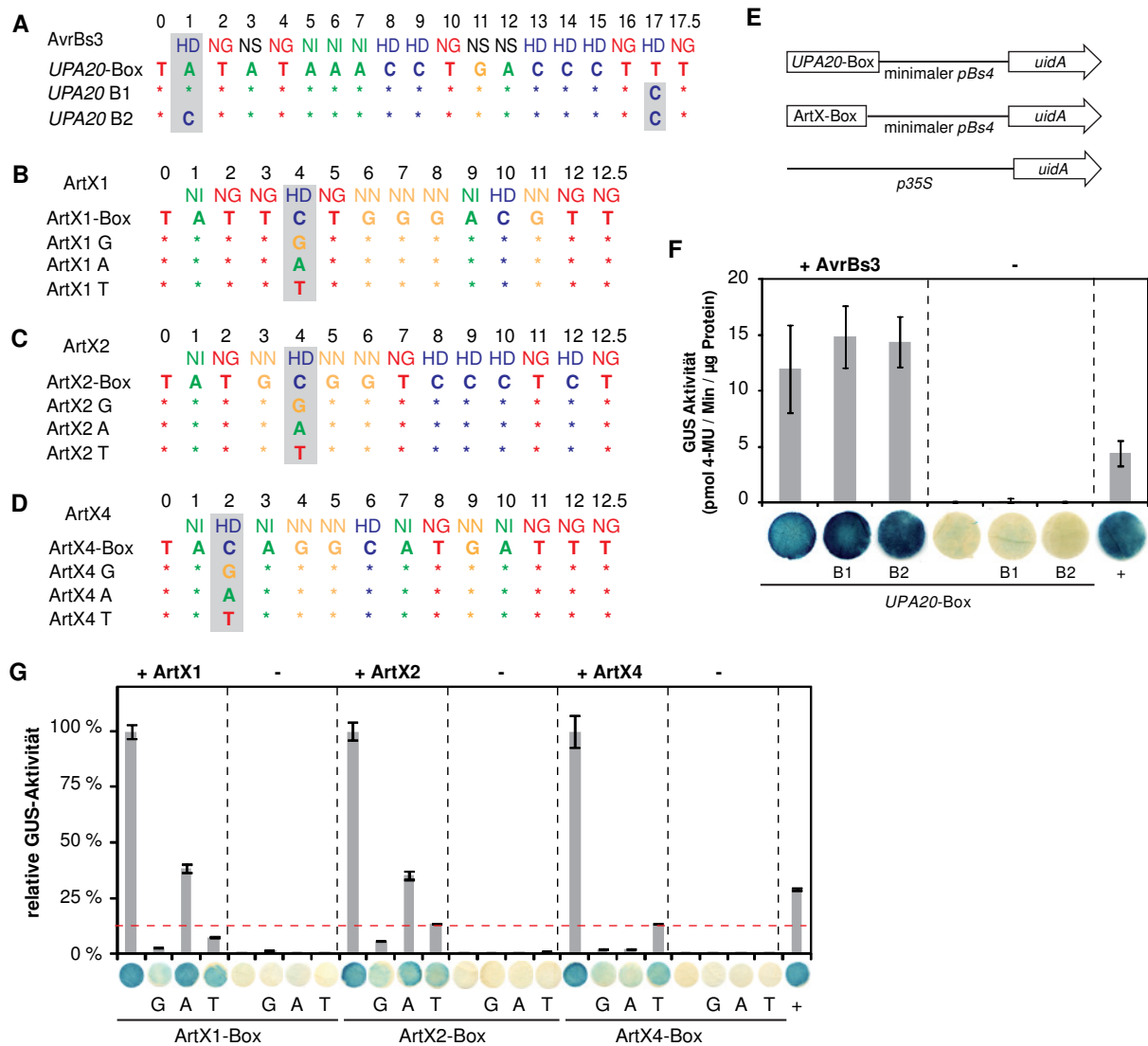
Die natürliche *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box wird trotz drei Fehlpaarungen durch *AvrBs3* induziert. *AvrBs3* weist als ersten *repeat* einen HD-*repeat* auf, der immer auf das A der TATA-Box der *UPA*-Konsensussequenz bzw. der *UPA*-Box trifft (Abbildung 3-2, Abbildung 3-16, Kay *et al.*, 2009; Scholze und Boch 2010). Interessanterweise wird die Erkennung und Geninduktion an den *UPA*-Genen (z.B. *UPA20*, *Bs3*) nicht beeinflusst (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Die weiteren Fehlpaarungen zwischen *AvrBs3* und der *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box betreffen den *repeat* 15: HD-A und den letzten halben *repeat* NG-C (Scholze und Boch 2010). Durch die Punktmutationen in der *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box wurde jeweils eine neue, aber z.T. bis vier Fehlpaarungen erzeugt, was bei einigen Mutanten die Erkennung und damit die Ausbildung der HR verhinderte (Römer *et al.*, 2009a). Die natürlichen Fehlpaarungen betrafen entweder HD-A-Paarungen oder den letzten halben *repeat*, für den gezeigt werden konnte, dass dieser

nicht essentiell für die Geninduktion ist (Abbildung 3-12). Durch die Fehlpaarung am letzten halben *repeat* und der zwei auftretenden HD-A-Paarungen könnte die Bindungsspezifität trotz zwei tolerierbarer Fehlpaarungen noch gegeben sein, was die Geninduktion am *Bs3*-Promotor bewirkte.

In dieser Arbeit führte die Mutation in ArtX2 M1 (G korrespondierend zum HD-*repeat*) zu einer drastischen Reduktion der GUS-Aktivität (Abbildung 3-15). In den Mutationsstudien der *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box wurde u.a. der Verlust der Erkennung bei der Mutation von Cytosin-Nukleotiden korrespondierend zu einem HD-*repeat* gezeigt (Römer *et al.*, 2009a; Scholze, 2008). Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den sieben auftretenden Paarungen von HD-*repeats* mit A fünf Mal die HR und ein Mal eine schwache HR ausgelöst wurde (Römer *et al.*, 2009a). Die anderen Fehlpaarungen (HD-G, HD-T) wurden meist nicht toleriert und es kam zum Verlust der HR (Römer *et al.*, 2009a). Die Fehlpaarungen in der ArtX2-Box-Fehlpaarungsstudie wurden quantitativ bestimmt und zeigten den gleichen Trend an. Zu viele Fehlpaarungen verhinderten die transkriptionelle Induktion durch einen TAL-Effektor und insbesondere HD-*repeat*-betreffende Fehlpaarungen hatten unterschiedliche Auswirkungen.

Aufgrund dieser Besonderheit sollte der Einfluss des ersten HD-*repeats* auf die Aktivierung eines TAL-Effektors näher untersucht werden. Dafür wurde die Sequenz der *AvrBs3<sub>UPA20</sub>*-Box (*UPA20*-Box) optimiert. Einerseits wurde die Fehlpaarung am 3'-Ende der Box (HD auf T) beseitigt (*UPA20* B1), damit der Einfluss der ersten Fehlpaarung mit dem HD-*repeat* sichtbar wird. Andererseits wurde die Box perfekt an das Modell der Sequenzspezifität angepasst, damit die Interaktion mit *AvrBs3* ohne Fehlpaarung stattfinden sollte (*UPA20* B2, Abbildung 3-16, A). Es wurden zudem für drei künstliche Effektoren mit 12,5 *repeats* (ArtX1, ArtX2, ArtX4) neue Boxen erstellt, in denen das korrespondierende Cytosin-Nukleotid für einen vorkommenden HD-*repeat* in ein Guanin- (G), in ein Adenin- (A) oder ein Thymin-Nukleotid (T) (kodierender Strang) mutiert wurde (Abbildung 3-16, B, C, D). Die verschiedenen Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor und vor das GUS-Reportergen kloniert (Abbildung 3-16, E). Anschließend GUS-Aktivitätstests zeigten, dass für die optimierten *UPA20*-Boxen B1 und B2 eine wenig höhere Reportergenaktivität messbar war, die aber laut Berechnung des t-Tests keine signifikante Steigerung zur *UPA20*-Box darstellte (Abbildung 3-16, F). Für die Box-Einzelmutanten korrespondierend zu einem HD-*repeat* in den ArtX-Boxen wurde jeweils eine starke Reduktion der Reportergenaktivität gemessen, dies variierte je nach Mutation (Abbildung 3-16, G).

## Ergebnisse



**Abbildung 3-16: Spezifische Induktion der TAL-Effektoren vermindert durch Fehlpaarungen am HD-repeat.** Aminosäuren 12 und 13 der *repeats* von AvrBs3 (**A**) und der künstlich generierten ArtX1 (**B**), ArtX2 (**C**), ArtX4 (**D**) und deren Boxen. **A**) Optimierung der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box (UPA20-Box), B1 mit einer, B2 mit zwei Veränderungen. **B**), - **D**) In den Boxen wurde jeweils korrespondierend zum ersten HD-repeat zu einem G, A oder T mutiert (grau hinterlegt). Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort. **E**) Die UPA20- bzw. ArtX-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **F**) Spezifische Aktivierung der UPA20-Box durch AvrBs3, drei Experimente wurden gemittelt. **G**) Aktivierung der optimalen und mutierten ArtX-Boxen durch den korrespondierenden Effektor, zum besseren Vergleich wurden die nicht-mutierten Boxen 100% gesetzt. **F** & **G**) GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *avrBs3*- oder *artX*-Genen bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Zum besseren Vergleich wurden die mutierten TAL-Boxen zur nicht-mutierten Box ins Verhältnis gesetzt. Wenn C zu A mutiert wurde, konnte eine mindestens um 65 % reduzierte Aktivität gemessen werden, bei den anderen Mutationen von C zu G oder C zu T war diese um ca. 87 % reduziert im Vergleich mit der Original-Box gemessenen Aktivität (Abbildung 3-16, G). Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt und die Daten müssten zur Bestätigung wiederholt werden. Parallele Spezifitätsmessungen zeigten jedoch bereits, dass ein HD-repeat als zweite und relativ schwache Erkennungsspezifität ein A-Nukleotid toleriert (Streubel, 2011).

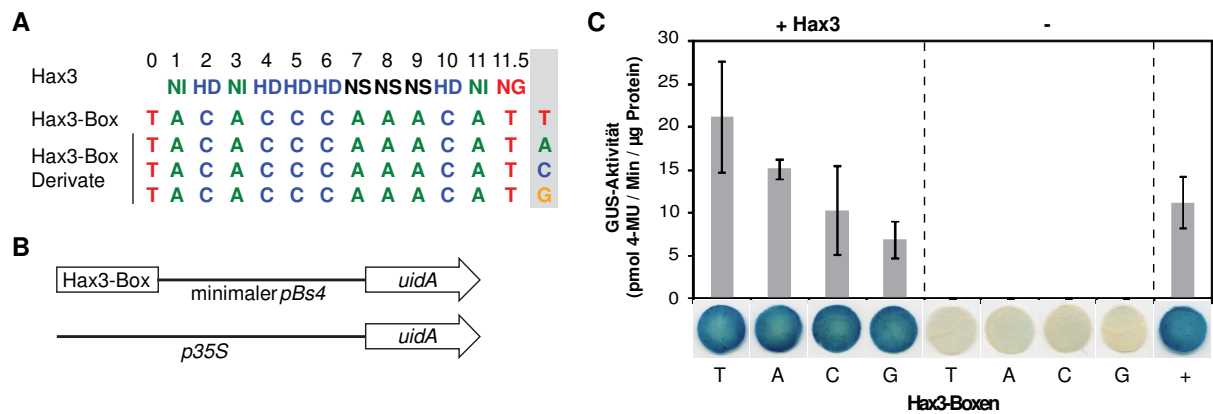
### 3.4 Untersuchung der Sequenzumgebung der Box

#### 3.4.1 Der Einfluss des ersten Nukleotids stromabwärts der Box auf die transkriptionelle Induktion durch Hax3

Wie oben gezeigt, erstreckt sich die Erkennungssequenz eines TAL-Effektors um ein Nukleotid mehr als dieser *repeats* aufweist. Grund dafür ist vermutlich der nullte *repeat* im N-terminalen Bereich, der die DNA-Erkennung zu T vermittelt. Die As-Sequenz nach den *repeats* könnte ebenfalls zur Erkennung von TAL-Effektoren beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass der den *repeats* nachgelagerte Bereich die Erkennung von Chimären aus Hax2 und AvrBs3 beeinflusste (Kay *et al.*, 2005).

Deswegen sollte untersucht werden, ob die Erkennung durch den *repeats* angrenzenden, nachfolgenden Bereich ähnlich wie beim nullten *repeat* beeinflusst wird. Hierbei wurde das erste, der Hax3-Box nachfolgende Nukleotid im Hax3-Reporterkonstrukt verändert. Dafür wurde das natürlicherweise im *Bs4*-Promotor vorkommende T-Nukleotid, was die Hax3-Box 3'-flankiert, zu einem A, C oder G mutiert (Abbildung 3-17, A) und die Box zusammen mit dem veränderten minimalen *Bs4*-Promotor vor ein promotorloses *uidA* kloniert (Abbildung 3-17, B). Nach der transienten Ko-Expression in *N. benthamiana* wurde die GUS-Aktivität bestimmt. Der GUS-Aktivitätstest zeigte, dass die transkriptionelle Geninduktion bei allen Reporterkonstrukten durch Hax3 erfolgte, jedoch mit sinkender Tendenz von T zu A zu C zu G (Abbildung 3-17, C). Dabei war die GUS-Aktivität bei A im Vergleich zu T um 25 % reduziert bei C zu T um ca. 50 % und bei G zu T fast 75 % (Abbildung 3-17, C). Das erste Nukleotid stromabwärts der Box beeinflusst somit vermutlich die Stärke der transkriptionellen Induktion, wenn auch in einem weit geringeren Maße als das initiale T-Nukleotid zu Beginn der Box.





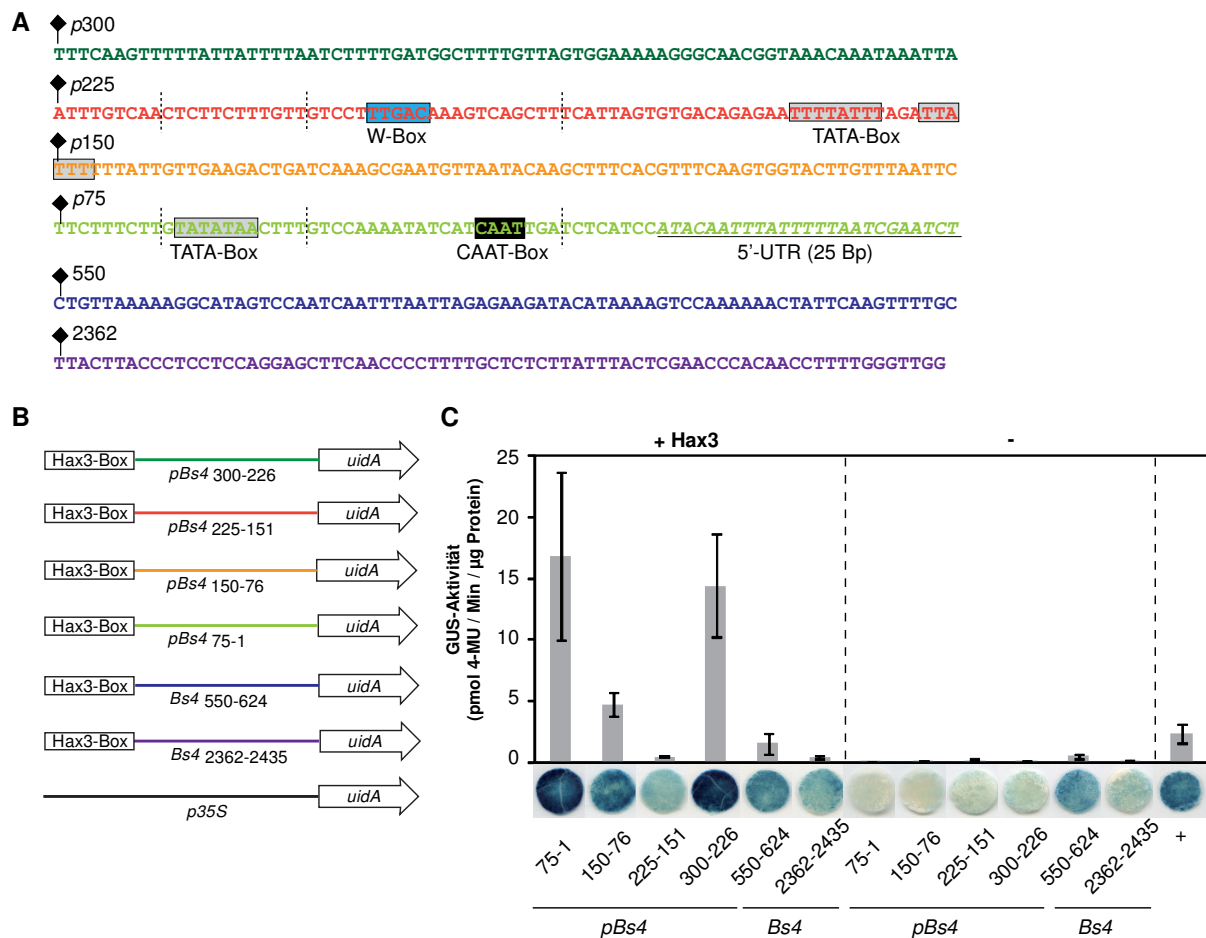
**Abbildung 3-17: Einfluss der Induktionsstärke durch das Hax3-Box 3'-flankierende Nukleotid.** **A)** RVDs der Hax3-repeats und vier mögliche Hax3-Boxen mit Basenaustauschen (grau hinterlegt). **B)** Die vier Hax3-Boxen wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C)** Reporterinduktion der Hax3-Boxen durch Hax3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *hax3* bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

### 3.4.2 Der Einfluss der Box stromabwärts gelegenen Sequenz auf die transkriptionelle Induktion durch Hax3

Es konnte gezeigt werden, dass die natürlichen Boxen korrespondierend zu den TAL-Effektoren AvrBs3, AvrBs3Δrep16 oder AvrXa27 an zwei unterschiedliche Stellen im *Bs3*-Promotor inseriert werden konnten und die Erkennung trotzdem spezifisch erfolgte (Römer *et al.*, 2009b). Es stellt sich die Frage, ob die Box allein für eine transkriptionelle Induktion durch TAL-Effektoren ausreichend ist, oder ob die direkte Sequenzumgebung dies positiv oder negativ beeinflussen kann. In allen hier genutzten Reporterkonstrukten wurde die entsprechende Box stromaufwärts des minimalen *Bs4*-Promotors (75 Bp) kloniert (Abbildung 3-1, Abbildung 3-4, Abbildung 3-5, Abbildung 3-7). Durch die Klonierung in pENTR-D und Rekombination in pGWB3 befindet sich stromaufwärts der Box immer die gleiche Sequenz (Boch *et al.*, 2009, S5).

Um in einem ersten Ansatz den Einfluss der stromabwärts gelegenen Sequenz der TAL-Box auf die Effizienz der TAL-Effektoren zu untersuchen, wurden neue Hax3-Reporterkonstrukte erstellt. Als Sequenz wurden 75 Bp aus verschiedenen Bereichen des *Bs4*-Promotors oder aus dem ORF von *Bs4* genutzt (Abbildung 3-18, A, Abbildung 6-3). Die Sequenzabschnitte wurden gleich lang gewählt, damit der Abstand zwischen Box und ATG konstant blieb. Die *Bs4*-ORF-Sequenzen wurden genutzt, um auch Sequenzen ohne offensichtliche Promotorelemente zu untersuchen. Die jeweiligen Sequenzabschnitte mit der 5'-klonierten Hax3-Box wurden vor das GUS-Reportergen kloniert (Abbildung 3-18, B).

Wie Abbildung 3-18, C zeigt, war eine deutliche GUS-Aktivität in dem bisher verwendeten Hax3-Reporterkonstrukt mit dem minimalen *Bs4*-Promotorabschnitt (*pBs4*<sub>75-1</sub>) zu verzeichnen. Eine ähnliche GUS-Aktivität durch Hax3 war mit dem Promotorabschnitt *pBs4*<sub>300-226</sub> sowie um ca. 66 % vermindert im *pBs4*<sub>150-76</sub> nachweisbar. Somit scheint die Transkription an TAL-Boxen, die in Promotorsequenzen inseriert sind, meist durch TAL-Effektoren induzierbar zu sein.



**Abbildung 3-18: Beeinflussung der Hax3-Induktion durch unterschiedliche Sequenzen stromabwärts der Hax3-Box. A)** Sequenzausschnitt des *Bs4*-Promotors (*p*) bzw. des *Bs4*-ORFs (*i*), die Positionen einzelner Basenpaare (Bp) sind nummeriert, die vorhergesagten Promotorelemente sind eingezeichnet: W-Box (blau), TATA-Box (grau) und CAAT-Box (schwarz) sowie die 25 Bp lange UTR (kursiv & unterstrichen), nach Schornack *et al.* 2005. Je 75 Bp sind unterschiedlich farbig markiert **B)** Die Hax3-Box wurde mit verschiedenen Abschnitten des *Bs4*-Promotors (dunkelgrün, rot, gelb, grün) und äquivalent langen Abschnitten des *Bs4*-ORFs (blau und lila) in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **C)** Reportergeninduktion der Hax3-Box in verschiedener Sequenzumgebung durch Hax3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *hax3* bzw. dem Leervektor (-) transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Jedoch konnte in den GUS-Aktivitätstests nicht für alle Reporterkonstrukte eine Induktion durch Hax3 nachgewiesen werden. Für die Reporterkonstrukte mit der Promotorsequenz *pBs4*<sub>225-151</sub> und beide Abschnitte aus dem ORF *Bs4*<sub>550-624</sub> und *Bs4*<sub>2362-2435</sub> war nur eine sehr schwache GUS-Aktivität, ähnlich der Basalaktivität, messbar. Diese Daten lassen vermuten, dass die Box allein nicht genügt, um die Transkription nachgelagerter Gene mittels eines TAL-Effektors zu induzieren und dass vermutlich die Sequenzumgebung eines geeigneten Promotorbereiches nötig ist.

Die Induktion eines Reporterkonstrukts durch Hax3 ist abhängig von der umgebenden Sequenz. Eine mögliche Ursache wären transkriptionsinhibierende Elemente, die eventuell durch Bindung von Faktoren die Transkription zeitweise blockieren (Core und Lis, 2008; Margaritis und Holstege, 2008). Andererseits könnten TAL-Effektoren mit pflanzlichen TFs interagieren, die ebenfalls eine DNA-Bindesequenz benötigen, die in den getesteten, nicht-funktionalen DNA-Abschnitten nicht enthalten waren. Beispiele für derartige *cis*-regulatorische Promotorelemente sind TATA-Boxen, CAAT-Boxen, Pyrimidin-reiche Sequenzabschnitte oder Inr-Elemente (Moscou und Bogdanove, 2009; Cíván und Švec, 2009; Ebert *et al.*, 1987; Juven-Gershon *et al.*, 2008; Kornberg, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007a; Yamamoto *et al.*, 2007b).

Die untersuchten Sequenzabschnitte des *Bs4*-Promotors wiesen verschiedene Motive auf. So besitzen die *Bs4*-Promotorabschnitte *pBs4*<sub>75-1</sub> und *pBs4*<sub>300-226</sub> eine potentielle TATA-Box bzw. TATA-Box-ähnliche Elemente im 5'-Bereich. Eine potentielle, imperfekte W-Box befindet sich in *pBs4*<sub>225-151</sub> (Abbildung 3-18), (Schornack *et al.*, 2005). Diese Promotorelemente könnten ein Einfluss auf die Transkriptionsinitiation haben, wie auch die UTR, die im *pBs4*<sub>75-1</sub> vorhanden ist und das Transkript stabilisieren könnte. Um diese Hypothesen zu klären, wurden Sequenzchimären ausgehend von zwei Sequenzabschnitten des *Bs4*-Promotors (*pBs4*<sub>75-1</sub> und *pBs4*<sub>225-151</sub>) mit einer Gesamtlänge von 75 Bp erzeugt. Dabei wurde eine mit jeder untersuchten TAL-Box als gut induzierbare Sequenz (*pBs4*<sub>75-1</sub>) bzw. eine mit der Hax3-Box als nicht induzierbare Sequenz eingestuftes Sequenzabschnitt des *pBs4*<sub>225-151</sub>-Konstruktes genutzt.

Die zwei Sequenzabschnitte des *Bs4*-Promotors *pBs4*<sub>75-1</sub> (A) und *pBs4*<sub>225-151</sub>(B) wurden in vier Sequenzbereiche unterteilt und diese in den Chimären neu kombiniert (Abbildung 3-19, A, B). Der Sequenzbereich *pBs4*<sub>A1</sub> zeichnet sich durch eine Pyrimidin-reiche Sequenz aus, in *pBs4*<sub>A2</sub> befindet sich die potentielle TATA-Box, in *pBs4*<sub>A3</sub> eine potentielle CAAT-Box, in

*pBs4<sub>A4</sub>* befindet sich der natürliche Transkriptionsstart und die 5'-UTR von 25 Bp. Im Sequenzbereich des *pBs4<sub>225-151</sub>* befinden sich kaum bekannte Promotorelemente, nur im *pBs4<sub>B3</sub>* eine potentielle W-Box.

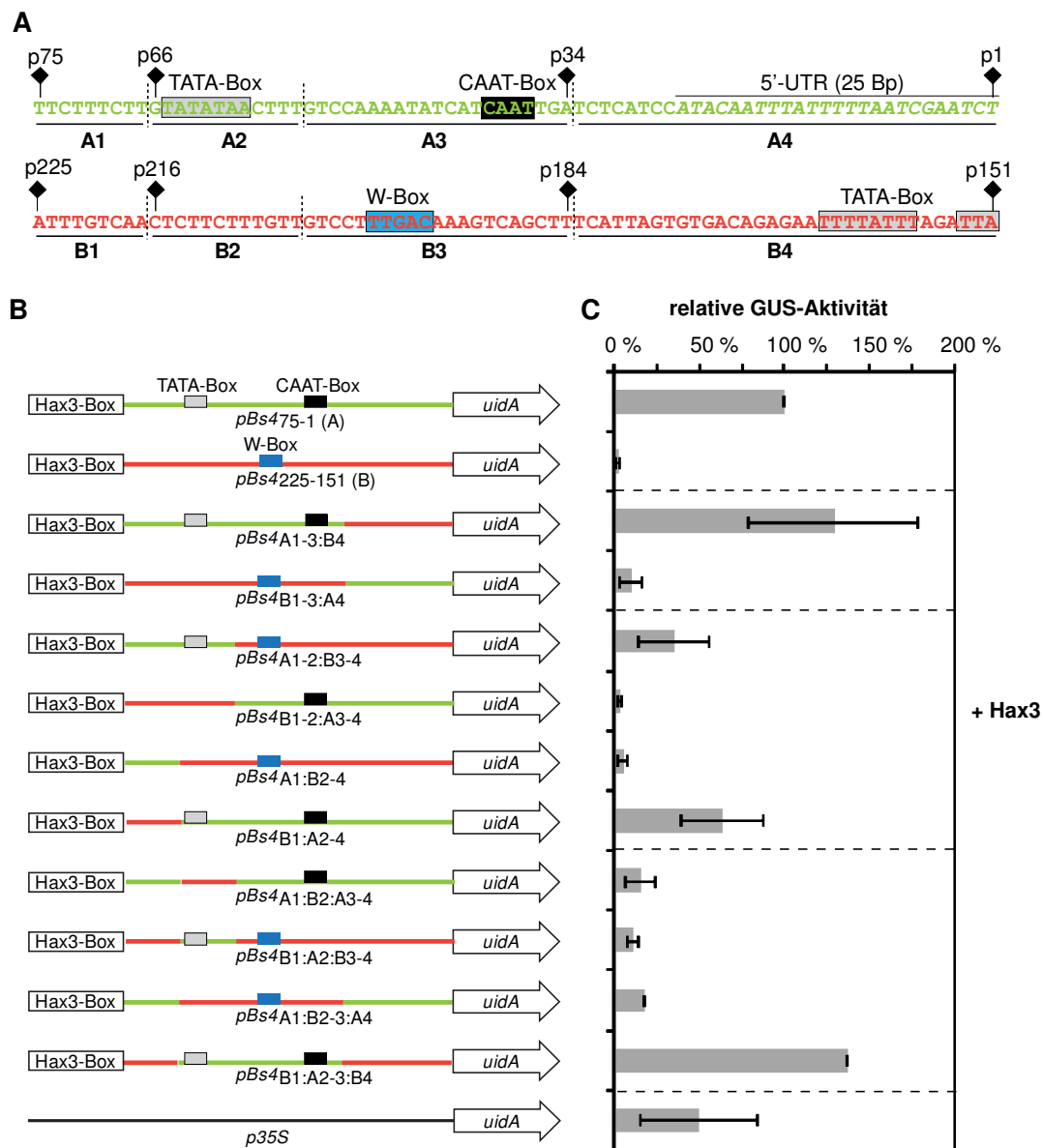
In den Chimären *pBs4<sub>A1-3:B4</sub>* und *pBs4<sub>B1-3:A4</sub>* wurde die UTR-Sequenzregion (*pBs4<sub>A4</sub>*) des *pBs4<sub>75-1</sub>* ausgetauscht. Weiterhin wurde der Pyrimidin-reiche Sequenzbereich inklusive der potentiellen TATA-Box (*pBs4<sub>A1-2:B3-4</sub>* und *pBs4<sub>B1-2:A3-4</sub>*) bzw. ohne die TATA-Box (*pBs4<sub>A1:B2-4</sub>* und *pBs4<sub>B1:A2-4</sub>*) von *pBs4<sub>75-1</sub>* mit den Bereichen des *pBs4<sub>225-151</sub>* ausgewechselt. Außerdem wurde die Sequenz der TATA-Box-Region allein (*pBs4<sub>A1:B2:A3-4</sub>* und *pBs4<sub>B1:A2:B3-4</sub>*) und in Kombination mit der CAAT-Box-Region (*pBs4<sub>A1:B2-3:A4</sub>* und *pBs4<sub>B1:A2-3:B4</sub>*) in den *pBs4*-Sequenzabschnitten ausgetauscht. Eine Übersicht aller Chimäre befindet sich in Abbildung 3-19, B.

Die *Bs4*-Promotorchimären wurden mit der Hax3-Box vor das GUS-Reportergen kloniert und nach transienter Ko-Expression mittels GUS-Enzymaktivitätstest die GUS-Aktivitäten bestimmt. Die Chimären wurden zum besseren Vergleich der GUS-Aktivität normiert, indem die Induktion der Hax3-Box im minimalen *Bs4*-Promotor (*pBs4<sub>75-1</sub>*) durch Hax3 als 100 % festgelegt wurde. Die Normierung ermöglicht die Kombination und den Vergleich von unterschiedlichen GUS-Aktivitätstests, da nicht alle zehn Chimären simultan untersucht wurden.

Die GUS-Aktivitätstests zeigten eine unterschiedliche Induktion der chimären Reporterkonstrukte auf. Bei den Reporterkonstrukten in denen die potentielle TATA-Box und potentielle CAAT-Box in der Sequenz vorkamen, waren die stärksten GUS-Aktivitäten messbar. Zwei dieser Konstrukte (*pBs4<sub>A1-3:B4</sub>* und *pBs4<sub>B1:A2-3:B4</sub>*) wiesen eine 25 % Steigerung der GUS-Aktivität im Vergleich zu der *pBs4<sub>75-1</sub>*-Sequenz auf (Abbildung 3-19, C). Das dritte Konstrukt mit der vorhergesagten TATA-Box und potentiellen CAAT-Box in der Sequenz (*pBs4<sub>B1:A2-4</sub>*) war auf ca. 70 % reduziert (Abbildung 3-19, C).

Die anderen Sequenzchimären mit Sequenzabschnitten der TATA-Box und potentieller W-Box bzw. potentieller CAAT-Box, oder potentieller W-Box, wiesen eine schwächer Induktion der Transkription auf, so dass keine bis maximal 20 % der GUS-Aktivität im Vergleich zu der *pBs4<sub>75-1</sub>*-Sequenz detektierbar war (Abbildung 3-19, C). Eine Ausnahme war hierbei das Konstrukt mit dem Pyrimidin-reichen Abschnitt, dem TATA-Box-Sequenzabschnitt und dem Sequenzabschnitt der potentiellen W-Box (*pBs4<sub>A1-2:B3-4</sub>*) was ca. 30 % der GUS-Aktivität der *pBs4<sub>75-1</sub>*-Sequenz aufwies (Abbildung 3-19, C).

Interessanterweise wies das sehr ähnliche Sequenzabschnitte beinhaltende Reporterkonstrukt mit nur dem TATA-Box-Bereich und Bereich der potentiellen W-Box (*pBs4*<sub>B1:A2:B3-4</sub>) eine geringere GUS-Aktivität auf. Diese war auch auf ca. 15 % im Vergleich zu der *pBs4*<sub>75-1</sub>-Sequenz reduziert (Abbildung 3-19, C).



**Abbildung 3-19: Untersuchung der transkriptionellen Induktion durch Hax3 in Abhängigkeit der stromabwärts gelegenen Sequenz. A)** Zwei Sequenzausschnitte des *Bs4*-Promotors, die Positionen der Basenpaare (Bp) sind nummeriert, die vorhergesagten Promotorelemente sind eingezeichnet: W-Box (blau), TATA-Box (grau) und CAAT-Box (schwarz) sowie die 25 Bp lange UTR (kursiv), nach Schornack *et al.* 2005. **B)** Die Hax3-Box wurde mit kombinierten Sequenzabschnitten des *Bs4*-Promotors in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. Für die Promotorchimären wurde die Promotorsequenz der Promotorabschnitte *pBs4*<sub>75-1</sub> (A, grün) und *pBs4*<sub>225-151</sub> (B, rot) neukombiniert. **C)** Reporterinduktion der Hax3-Box-Sequenzchimären durch Hax3. GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten *hax3* transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Sequenzabschnitte mit den potentiellen Promotorelementen TATA-Box und CAAT-Box einen positiven bzw. der Sequenzabschnitt mit der potentiellen W-Box einen negativen Einfluss auf die Induktion der Transkription haben. Der Sequenzabschnitt der UTR schien keinen Einfluss auf die Transkriptionsinduktion des Reportergens zu haben, wie die Chimären  $pBs4_{A1-3:B4}$  und  $pBs4_{B1-3:A4}$  belegten (Abbildung 3-19, B, C). Auch der Pyrimidin-reiche Sequenzabschnitt in A1 verändert nicht generell die Induktion des Reportergens was anhand der Chimären  $pBs4_{A1:B2-4}$  und  $pBs4_{B1:A2-4}$  gezeigt werden konnte. Wobei er sich positiv auf die Transkriptionsrate von  $pBs4_{A1-2:B3-4}$  im Vergleich zu  $pBs4_{B1:A2:B3-4}$  auswirkte (Abbildung 3-19, B, C).

Anhand der Sequenzchimären konnte der Sequenzbereich  $pBs4_{A2-A3}$  (Bp 66-34 des  $pBs4$ ) als aktivierender Sequenzabschnitt bzw. der Sequenzbereich  $pBs4_{B2-B3}$  (Bp 216-184 des  $pBs4$ ) als inhibierendes Element eingegrenzt werden (Abbildung 3-19). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Sequenz zwischen der Box und der UTR-Sequenz einen Einfluss auf die Induzierbarkeit durch Hax3 haben und dass Sequenzbereiche mit Promotorelementen wie TATA-Box oder CAAT-Box die Stärke der Induktion der Transkription beeinflussen.

### 3.5 Untersuchung der Funktionalität von TAL-Effektoren in heterologen, biologischen Systemen

Bisher wurde gezeigt, dass natürliche und künstliche TAL-Effektoren in der Lage sind, sequenzspezifisch Genabschnitte zu erkennen und die Transkription in der Pflanze zu induzieren. TAL-Effektoren stammen aus dem Phytopathogen *Xanthomonas* spp. und bisher war es nicht bekannt, ob der aktivierende Mechanismus generell in anderen Eukaryoten funktioniert. Pflanzliche und *in vitro*-Studien zeigten, dass TAL-Effektoren durch die *repeat*-Region in der Lage sind, spezifisch an ihre Zielsequenzen zu binden (Kay *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2009b). Somit sollten TAL-Effektoren generell in der Lage sein, DNA Sequenzspezifisch zu binden auch in anderen heterologen, biologischen Systemen.

Um zu untersuchen, ob TAL-Effektoren in der Lage sind spezifisch die Genexpression in anderen Eukaryoten zu induzieren, sollten dies zum Einen in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und zum Anderen in menschlichen Zellkulturen untersucht werden. Für diesen funktionellen Vergleich wurden für AvrBs3 und Hax3 je drei neue Derivate der Effektoren erzeugt, deren Sequenzen sich im C-terminalen Bereich unterschieden. AvrBs3 und Hax3

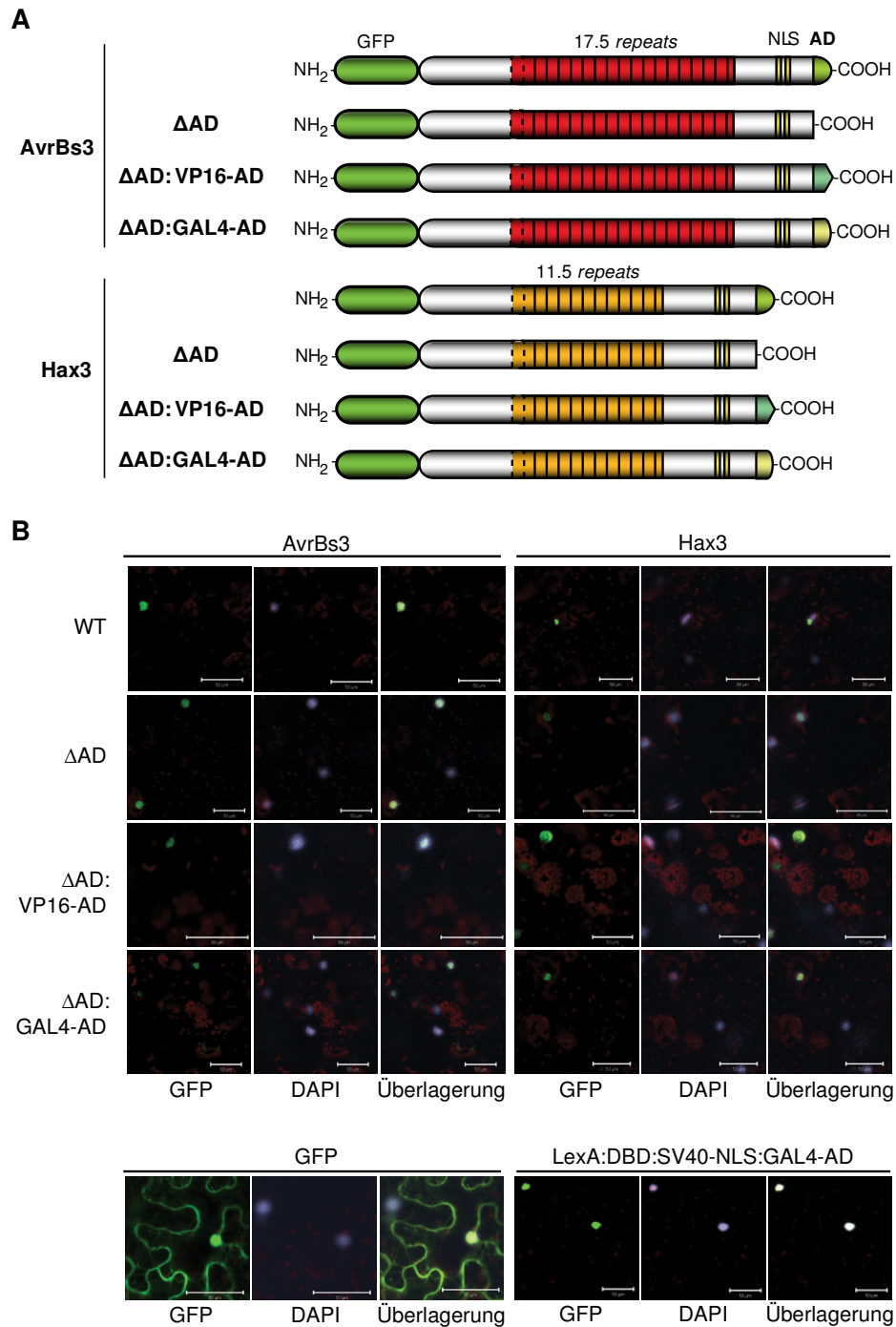
weisen im WT-Protein eine saure AD auf, diese wurde deletiert ( $\Delta$ AD) bzw. substituiert. Bei der Substitution wurde die AD einerseits mit der VP16-AD des Herpes Simplex Virus (HSV) und andererseits mit der GAL4-AD aus Hefe ausgetauscht (Abbildung 3-20, A).

Für die Untersuchungen in Hefe wurde eine Positivkontrolle (LexA-Kontrolle) generiert. Die LexA-DNA-Bindedomäne wurde mit dem SV40-NLS und der GAL4-AD fusioniert. Als Negativkontrolle diente GFP, denn alle verwendeten TAL-Effektoren besitzen ein N-terminales GFP.

Die neu generierten TAL-Effektor-Derivate wurden zunächst in der Pflanze getestet. Um die Expression und Kernlokalisierung der Effektoren nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer in *N. benthamiana* zu überprüfen, wurde die Lokalisierung am LSM untersucht. Alle Effektoren und die LexA-Kontrolle wurden im pflanzlichen Zellkern lokalisiert, wohingegen die GFP-Kontrolle im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert war (Abbildung 3-20, B). Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression und Kernlokalisierung aller neugenerierten TAL-Effektor-Derivaten korrekt stattfand.

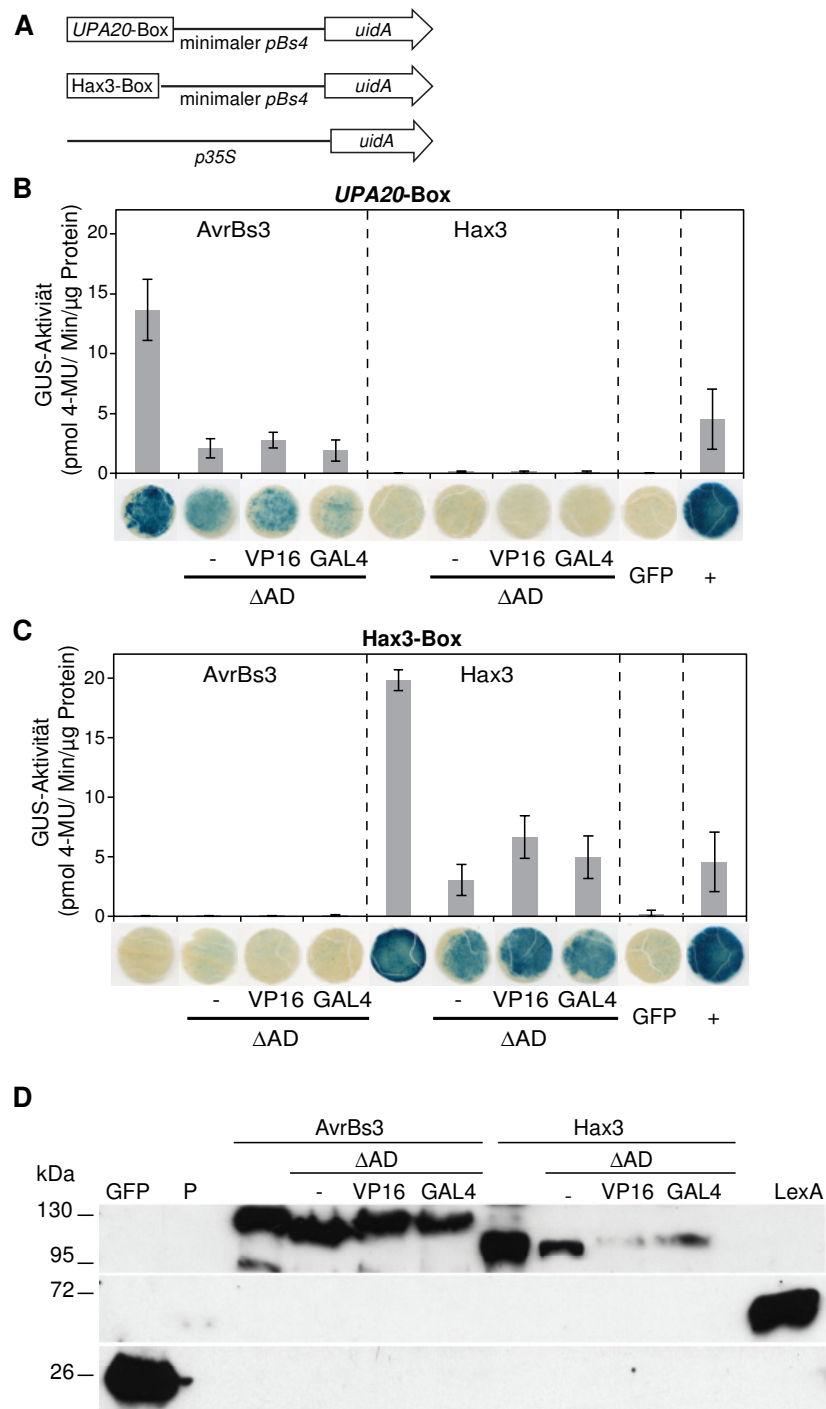
Parallel wurden die Derivate mit GUS-Reporterkonstrukten in *N. benthamiana* ko-exprimiert, welche die Hax3- bzw. AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box (UPA20-Box) beinhalten. Anschließend wurde das Blattmaterial in qualitativen und quantitativen GUS-Aktivitätstest untersucht.

Die Wildtyp-Effektoren induzierten stark und spezifisch die Transkription der korrespondierenden GUS-Reporterkonstrukte (Abbildung 3-21, B & C). Die TAL-Effektor-Derivate mit deletierter AD wiesen eine starke Reduktion der GUS-Aktivität um 80 bis 95 % auf. Die Substitution der AD mit der VP16-AD bzw. GAL4-AD wies ebenfalls eine starke Reduktion (70 bis 80 %) der GUS-Aktivität auf, jedoch weniger drastisch als die  $\Delta$ AD-Konstrukte (Abbildung 3-21, B & C). Bereits früher wurde in HR-Untersuchungen gezeigt, dass AvrBs3-Konstrukte mit substituierter VP16-AD eine Resistenzreaktion in der Pflanze stimulieren konnten (Szurek *et al.*, 2001). Keine GUS-Aktivität konnte für die LexA- und GFP-Kontrolle gemessen werden, ebenso konnten AvrBs3 und dessen Derivate nicht die Hax3-Box sowie Hax3 und dessen Derivate nicht die UPA20-Box induzieren (Abbildung 3-21, B & C). Diese Daten zeigen, dass AvrBs3 und Hax3 nach der Deletion der AD noch ca. 15 % ihrer Aktivität besitzen und dass die AD nur partiell mit der VP16-AD in der Pflanze komplementiert werden kann. Somit bewirken TAL-Effektoren in Abhängigkeit der AD die transkriptionelle Geninduktion in der Pflanze.



**Abbildung 3-20: Übersicht der TAL-Effektor-Derivate und deren Lokalisation in der Pflanze. A)** Modelhafte Darstellung der TAL-Effektoren AvrBs3 und Hax3. Der TAL Effektor AvrBs3 besitzt 17,5 *repeats* (rot) und Hax3 11,5 (beige). Alle Effektoren sind N-terminal mit GFP translational fusioniert und besitzen im C-terminalen Bereich neben den Kernlokalisierungssignalen (NLS) eine saure Aktivierungsdomäne (AD). In den Derivaten von AvrBs3 und Hax3 wurde die AD deletiert ( $\Delta$ AD) oder durch die VP16-AD bzw. GAL4-AD substituiert. **B)** GFP-markierte TAL-Effektoren lokalisieren im Zellkern. Die mit GFP translational fusionierten Effektoren und deren Derivate bzw. *35S:GFP* wurden transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden die Epidermiszellen von *N. benthamiana* mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) gefärbt und mittels LSM untersucht. Grün, GFP-Fluoreszenz; Blau, DAPI-Fluoreszenz; Rot, Auto-Fluoreszenz der Chloroplasten, Größenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m.





**Abbildung 3-21: Expression und Induktion durch die TAL-Effektor-Derivate in der Pflanze. A)** Die *UPA20*-Box und die *Hax3*-Box wurden vor den minimalen *Bs4*-Promotor in ein GUS-Reporterplasmid kloniert. **B) & C)** Spezifische Reporterinduktion der *UPA20*-Box bzw. *Hax3*-Box durch die dazugehörigen TAL-Effektoren *AvrBs3* bzw. *Hax3* und deren Derivate. Die GUS-Reporterplasmide wurden zusammen mit den *35S*-Promotor gesteuerten Genen der TAL-Effektoren und deren Derivate transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. *35S:uidA* (+) diente als Positivkontrolle. Blattscheiben wurden mit X-Gluc gefärbt und mit EtOH gebleicht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten; 4-MU, 4-Methylumbelliferon. **D)** Nachweis GFP-markierter TAL-Effektoren mittels Immunoblot. Die mit GFP translational fusionierten Effektoren *AvrBs3* und *Hax3* sowie deren Derivate bzw. eine GFP-Kontrolle wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurde das Blattmaterial von *N. benthamiana* geerntet, mit Lämmli-Puffer aufgeschlossen, 3µl bis 20µl über eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Anti-GFP im Immunoblot detektiert. P - nicht inokuliertes Pflanzenmaterial.

Um zu prüfen, ob die reduzierte Aktivität der TAL-Effektoren mit der VP16-AD bzw. GAL4-AD auf ein im Vergleich zum Wildtyp-AD reduziertes Expressionsniveau zurückzuführen ist, wurde die transiente Expression der acht Effektoren in *N. benthamiana* mittels Immunoblot detektiert. Die Expression aller Konstrukte inklusive der Kontrollen konnte nachgewiesen werden (Abbildung 3-21, D), wobei die geladene Proteinmenge nicht einheitlich war. Denn AvrBs3, AvrBs3 $\Delta$ AD, Hax3, Hax3 $\Delta$ AD, LexA- und GFP-Kontrolle wurden in einem viel stärkeren Maß exprimiert bzw. die anderen Proteine schneller degradiert. Dies könnte u.a. die zum Wildtyp verringerten GUS-Aktivitäten der TAL-Effektoren mit  $\Delta$ AD:GAL4-AD bzw.  $\Delta$ AD:VP16-AD beigetragen haben.

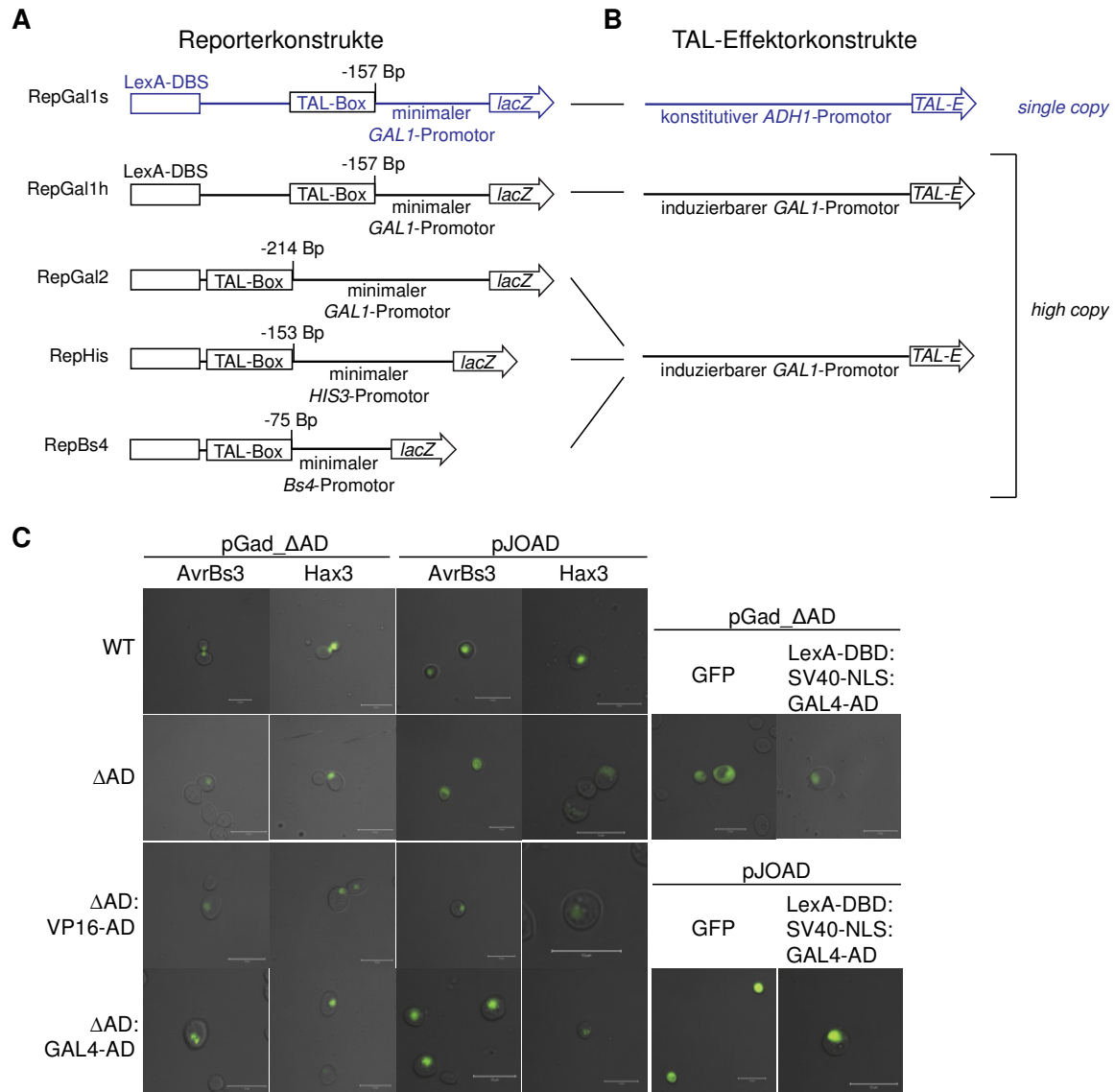
### **3.5.1 Untersuchung der Geninduktion durch TAL-Effektoren in *Saccharomyces cerevisiae***

Es war bekannt, dass AvrBs3 auch in *S. cerevisiae* spezifisch die UPA20-Box bindet (Hahn, 2009, Kay *et al.*, 2009). In diesen Untersuchungen wurde das Y1H-System genutzt. Nur in den Bäckerhefen, bei denen Köder-Sequenz (AvrBs3<sub>UPA20-Box</sub>) und zu untersuchendes Protein (AvrBs3:Gal4-AD) interagierten, wurde die Transkription des Reportergens induziert und die entsprechenden Hefezellen konnten so auf speziellem Mangelmedium wachsen (Hahn, 2009; (Kay *et al.*, 2009).

Um die spezifische Geninduktion durch TAL-Effektoren mit unterschiedlichen ADs in Hefe zu quantifizieren, sollte das *lacZ*-Reportergen genutzt werden, was für die  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym spaltet endständige Zuckerreste ab und anhand des Substratumsatzes können die vorhandene *lacZ*-Proteinmenge und damit die *lacZ*-Expressionsrate bestimmt werden. Das Reporterkonstrukt war aus drei Teilen aufgebaut. Im 5'-Bereich befand sich eine LexA-Bindestelle (LexA-DBS) vor dem minimalen *GALI*-Promotor, der die jeweilige TAL-Box beinhaltete und dem sich das promotorlose *lacZ*-Reportergen anschloss (Abbildung 3-22, A). Anhand der LexA-DBS lässt sich die Induktion des Reporters mit der LexA-Kontrolle überprüfen. Der minimale *GALI*-Promotor sollte keine eigene Basalaktivität aufweisen und somit sollte die  $\beta$ -Galactosidase nur durch die Induktion eines TAL-Effektors bzw. der LexA-Kontrolle transkribiert und translatiert werden.

Für die Studien in *S. cerevisiae* wurden die Effektoren sowohl in *single copy*-Plasmide, als auch in *high copy*-Plasmide kloniert (Abbildung 3-22, A). Die Expression in *single copy*-Plasmiden sollten eine unspezifische Geninduktion durch die Effektoren in *S. cerevisiae* verhindern. Da jedoch unklar war, ob die Proteinmenge bei *single copy*-Plasmiden für eine

gut nachweisbare Transkriptionsinduktion ausreicht, wurden parallel *high copy*-Plasmide genutzt. Die Reporterstrukture und Effektorplasmide wurden in *S. cerevisiae* ko-transformiert.



**Abbildung 3-22: Modelhafte Darstellung der Reporterstrukture und TAL-Effektorkonstrukte für die Aktivitätsstudien in *S. cerevisiae*.** **A**) In die  $\beta$ -Galactosidase-Reporterplasmide wurden eine LexA-DNA-Bindestelle (LexA-DBS) und je eine TAL-Box in den *GAL1*-Promotor, vor den minimalen *HIS3*-Promotor und *Bs4*-Promotor inseriert. Die Abstand zwischen Box und ATG ist angegeben. **B**) Unterschiedliche Expressionsplasmide für die TAL-Effektoren mit konstitutiven *ADH1*-Promotor bzw. mit induzierbaren *GAL1*-Promotor. **A**) & **B**) *single copy*-Konstrukte sind in blau, *high copy*-Konstrukte in schwarz dargestellt. **C**) Expressionsstudien der TAL-Effektoren AvrBs3 und Hax3 in *S. cerevisiae*. LSM-Aufnahmen der GFP-markierten Proteine und der GFP- bzw. LexA-Kontrolle. Die Expression wurde im *single copy*, konstitutiv exprimierenden Plasmiden (pGad\_ΔAD) und in induzierten, *high copy*-Plasmiden (pJOAD) untersucht.

Zuerst wurden die Hefe-Transformanten auf die Expression und Lokalisierung der TAL-Effektoren am LSM untersucht, da die Proteine GFP-markiert waren. Wie in Abbildung 3-22, C zu sehen, wurden alle TAL-Effektoren sowie die LexA-Kontrolle exprimiert und lokalisierten im Zellkern der *S. cerevisiae*-Zellen. Dabei wurde eine stärkere Fluoreszenz der LexA-DBD-Konstrukte im Vergleich zu den anderen Transformanten beobachtet. Die GFP-Kontrolle war sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu detektieren (Abbildung 3-22, C). Somit konnte gezeigt werden, dass die AvrBs3- und Hax3-Derivate sowie der LexA-Kontrolle in *S. cerevisiae* exprimiert wurden und diese im Kern lokalisierten.

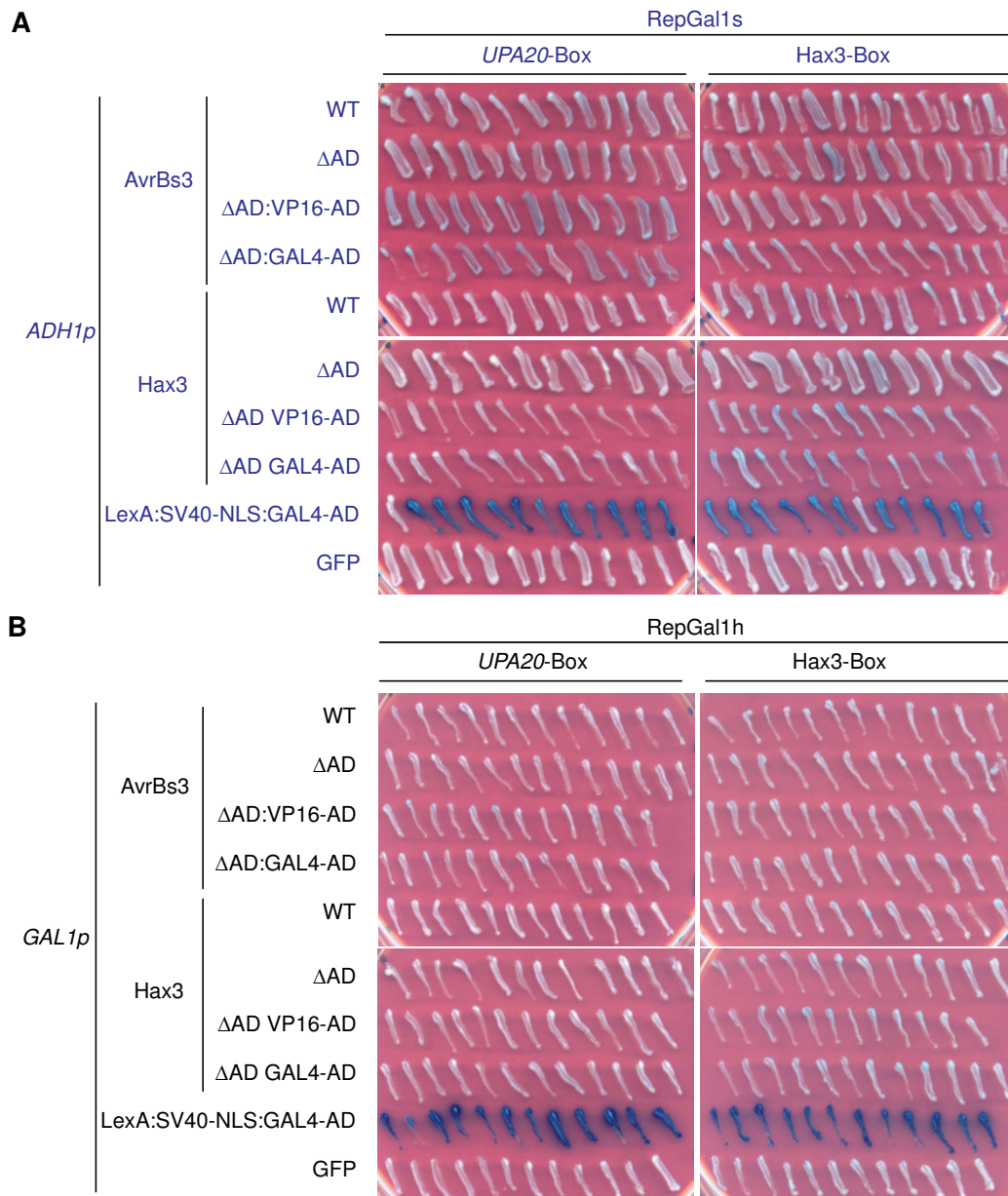
Ob die TAL-Effektoren die Transkription des  $\beta$ -Galactosidase-Reporters induzieren können, wurde durch Überpicken der Transformanten auf Hefemedium, was mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) versetzt war, analysiert. Die Hefezellen sollten bei Expression der  $\beta$ -Galactosidase das X-Gal umsetzen und eine blaue Färbung annehmen.

Die Induktion des *lacZ* in den Reporterkonstrukten RepGal1s und RepGal1h durch die TAL-Effektoren AvrBs3 und Hax3 erfolgte scheinbar nur in sehr geringem Maße, denn die Hefezellen waren nach drei Tagen nur sehr leicht blau (Abbildung 3-23).

Die Hefetransformanten mit den AvrBs3-Derivaten schienen hierbei nur die RepGal1s und RepGal1h mit der *UPA20*-Box zu induzieren, wohingegen die sehr leichte Blaufärbung der Hefezellen bei den RepGal1 mit der Hax3-Box mehr oder weniger überall auftrat (Abbildung 3-23). Die Transkription des Reportergens konnte jedoch in jeden der vier RepGal1-Reporter mit *UPA20*- bzw. Hax3-Box in *single copy*- bzw. *high copy*-Plasmiden deutlich durch die LexA-Kontrolle induziert werden, was an den stark blau verfärbten Hefezellen sichtbar war. Die GFP-Kontrolle war nicht in der Lage die Reporterkonstrukte RepGal1 mit *UPA20*- bzw. Hax3-Box zu induzieren, die Hefezellen blieben weiß (Abbildung 3-23).

Die Induktion des Reportergens durch die TAL-Effektoren schien damit nicht in dem gleichen Maß wie bei der LexA-Kontrolle zu funktionieren. Auch die erhöhte Kopienzahl in den *high copy*-Plasmiden bedingte keine verstärkte Induktion des Reportergens, im Vergleich zu den *single copy*-Plasmiden (Abbildung 3-23). Der Insertionspunkt der Box an Position -157 Bp war analog zum pflanzlichen Reportersystem in einem Abstand von 10 Bp vor der einer potentiellen TATA-Box gewählt worden (Yocum *et al.*, 1984). In Vorexperimenten mit der Insertion der Box an -100 Bp vor dem ATG bzw. -39 Bp vor dem potentiellen Transkriptionsstart im *GALI*-Promotor (Johnston und Davis, 1984) konnte auch keine Induktion des Reportergens gezeigt werden (S. Hahn, persönliche Mitteilung). Deswegen war

die Box in den RepGal1s- bzw. RepGal1h-Reportern auf -157 Bp mit einem 96 Bp Abstand zum potentiellen Transkriptionsstart vorverlegt worden. Womöglich war diese Position dennoch zu nah am ATG, obwohl in der Pflanze gezeigt werden konnte, dass die Transkription nach ca. 45 Bp (Römer *et al.*, 2009a) begann.

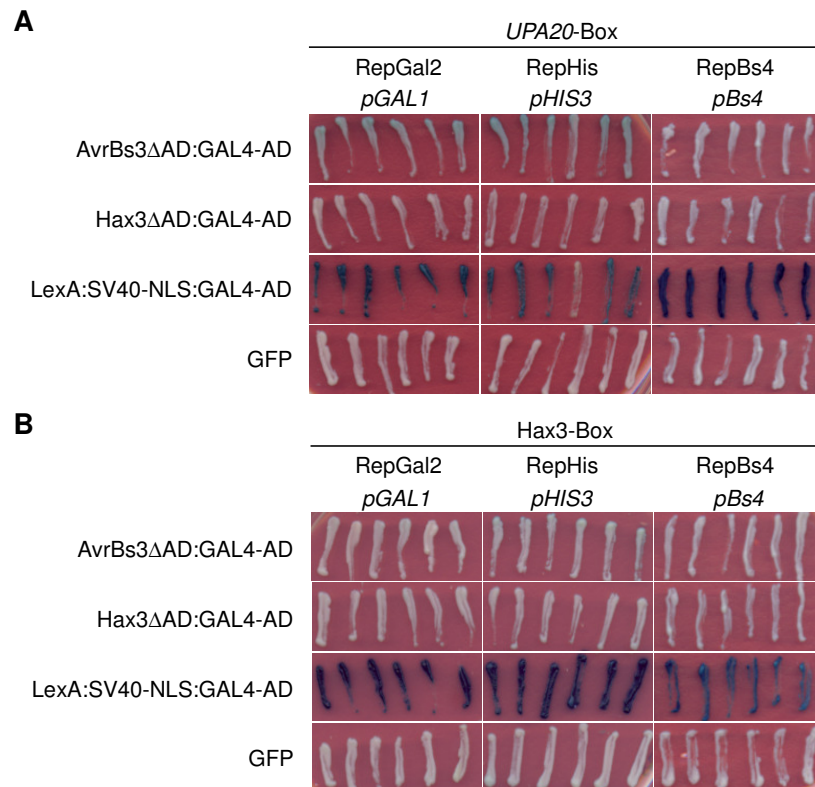


**Abbildung 3-23: Keine deutliche Induktion des Reportergens in *S. cerevisiae* durch einen TAL-Effektor, unabhängig der Kopienzahl. A)** Übersicht von Hefe-Transformanten nach der Ko-Transformation mit *single copy*-Plasmiden (blaue Schrift) des konstitutiv exprimierten AvrBs3 bzw. Hax3 und den Reporterkonstrukten RepGal1s mit der *UPA20*- bzw. Hax3-Box zwei Tage nach dem Überführen auf X-Gal-Medium. **B)** Hefetransformanten nach der Ko-Transformation mit *high copy*-Plasmiden (schwarze Schrift), die nach Induktion AvrBs3 bzw. Hax3 exprimierten, und das Reporterplasmid RepGal1h mit der *UPA20*- bzw. Hax3-Box beinhalten zwei Tage nach Umsetzen auf induzierendes Medium mit X-Gal.

Um auszuschließen, dass die Insertionsstelle der Box im minimalen *GALI*-Promotor für die transkriptionelle Aktivierung zu nah am ATG oder in einer ungünstigen Promotorregion war, wurden drei neue *high copy*-Reporterkonstrukte generiert. Zum Einen wurde die Box erneut weiter stromaufwärts im *GALI*-Promotor (-214 Bp) inseriert und zum Anderen wurde die Promotorsequenz zwischen TAL-Box und dem Reporter gen ausgetauscht. Hierbei wurden die Sequenzen des minimalen *HIS3*-Promotors (genutzter Promotor in den Studien von S. Hahn) und des minimalen *Bs4*-Promotors mit der entsprechenden TAL-Box vor das Reporter gen kloniert (Abbildung 3-22, A). Der minimale *Bs4*-Promotor wurde genutzt, da in den Pflanzenstudien dieser Arbeit zumindest gezeigt werden konnte, dass in Reporterkonstrukten mit TAL-Box und der *Bs4*-Promotorsequenz das stromabwärtsliegende Gen durch TAL-Effektoren induziert wurden.

Somit wurden drei neue *lacZ*-Reporterkonstrukte RepGal2, RepHis und RepBs4 generiert und in *high copy*-Plasmide kloniert (Abbildung 3-22, A). Für die Ko-Transformation wurde für den jeweiligen Effektor das TAL $\Delta$ AD:GAL4-AD-Konstrukt verwendet und als Kontrolle dienten wiederum die LexA-Kontrolle bzw. GFP.

Die Analyse der transkriptionellen Induktion des Reporter gens erfolgte analog nach dem Überpicken auf X-Gal-Medium. Erneut war bei den Reporterkonstrukten mit den minimalen *HIS3*-, *GALI*- und *Bs4*-Promotoren nur eine sehr leichte Blaufärbung der Ko-Transformanten mit einem TAL-Effektor zu beobachten (Abbildung 3-24). Eine Induktion des *UPA20*-Box-Reporterkonstruktes durch AvrBs3 $\Delta$ AD:GAL4-AD schien dabei minimal gegeben zu sein, da diese Hefezellen anscheinend mehr blauen Farbstoff akkumulierten, im Vergleich zu den Hax3-Box-Reporterkonstrukten (Abbildung 3-24). Eine deutliche und starke Blaufärbung und damit Reporter geninduktion konnte wiederum nur bei den LexA-exprimierenden Transformanten der *S. cerevisiae*-Zellen detektiert werden. Die Ko-Transformanten mit GFP wiesen keine Blaufärbung auf (Abbildung 3-24). Somit konnte in *S. cerevisiae* keine deutliche Geninduktion durch TAL-Effektoren in dem hier untersuchten Reportersystem gezeigt werden.



**Abbildung 3-24: Keine deutliche Induktion des Reportergens in *S. cerevisiae* durch einen TAL-Effektor unabhängig von der Promotorsequenz. A) & B)** Jeweils sechs Hefetransformanten nach der Ko-Transformation mit *high copy*-Plasmiden, die nach Induktion AvrBs3ΔAD:Gal4-AD, Hax3ΔAD:Gal4-AD, die LexA-Kontrolle bzw. GFP exprimierten, und den Reporterkonstrukten RepGal2 (*GAL1*-Promotor), RepHis (*HIS3*-Promotor), RepBs4 (minimaler *Bs4*-Promotor) mit der *UPA20*- bzw. Hax3-Box zwei Tage nach Umpicken auf induzierendes Medium mit X-Gal. Nur die LexA-Kontrolle induzierte die Transkription des *lacZ*-Reportergens (Blaufärbung durch X-Gal-Umsatz).

### 3.5.2 TAL-Effektoren induzieren die Transkription in *Homo sapiens*

Parallel zur Untersuchung der spezifischen Geninduktion der TAL-Effektoren in *S. cerevisiae* sollte mit den gleichen TAL-Effektor-Derivaten (Abbildung 3-20, A) die Induktion eines Luciferase-Reporters in menschlichen Zellkulturen untersucht werden. Dafür wurde die Hax3- bzw. *UPA20*-Box vor die Sequenz des minimalen Cytomegalie-Virus-Promotors (CMV<sub>min</sub>-Promotor, 112 Bp) inseriert und vor ein promotorloses Luciferase-Reportergen kloniert. Im 5'-Bereich vor der Box und dem Promotor befand sich ein 12 x  $\lambda$ -Operator, der mittels eines chimären Transaktivators und der Substanz Coumermycin die Transkription initiieren konnte und als Kontrolle für die Funktionalität des Luciferase-Reporters genutzt wurde.

Nach der Klonierung der Expressions- und Reporterplasmide wurden die weiteren Experimente in der AG Prof. Behrens durchgeführt. Die Luciferase-Aktivitätstests zeigten, dass die TAL-Effektoren AvrBs3 und Hax3 in der Lage waren jeweils spezifisch die

Transkription des Reportergens zu induzierten (Geißler *et al.*, 2011). Die TAL-Effektoren mit der VP16-AD induzierten am stärksten die Transkription des Luciferase-Gens, welche zwei bis drei Mal höher war im Vergleich zu den Effektoren mit Wildtyp-AD und 50 - 80 Mal höher im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Geißler *et al.*, 2011). Die TAL-Effektoren mit deletierter AD wiesen hierbei eine geringere Induktion des Reportergens auf, als die in der Pflanze aktiven Wildtyp-Effektoren. Die Fusion der GAL4-AD an die TAL-Effektoren bedingte eine Reportergeninduktion, die zwischen den TAL-Effektoren mit deletierter AD bzw. Wildtyp-AD lag (Geißler *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden die verschiedenen TAL-Effektor-Derivate nach der Transfektion auf Lokalisierung und Expressionsgrad untersucht. Alle Effektoren waren im Zellkern lokalisiert und GFP zusätzlich im Zytoplasma. Die Expressionsrate der einzelnen Effektoren war vergleichbar, wie mittels Immunoblot gezeigt werden konnte (Geißler *et al.*, 2011).

Diese Daten belegen, dass die transkriptionelle Geninduktion durch TAL-Effektoren auch in humanen Zellen spezifisch ausgelöst werden kann. Die Induktion der Transkription des Reportergens in humanen Zellen konnte zudem durch die Fusion der VP16-AD deutlich gesteigert werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren

TAL-Effektoren aus den Xanthomonaden sind schon seit über 20 Jahren bekannt (Bonas *et al.*, 1989; Swarup *et al.*, 1991). Die *repeat*-Regionen der Effektoren bestimmen die Virulenz und die Spezifität (Marois *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1994; Yang und Gabriel, 1995a). Promotorstudien an den *UPA*-Gene zeigten konservierte Nukleotidabfolgen um den Bereich der TATA-Box. Die konservierten Sequenzbereiche in den *UPA*-Promotoren und die Anordnung der *AvrBs3-repeat*-Typen innerhalb der *repeat*-Region weisen bei der richtigen Anordnung eine erstaunliche Korrelation auf (Abbildung 1-6, B). Aus diesem Grund wurde das Modell der Sequenzspezifität von TAL-Effektoren aufgestellt, was besagt, dass immer ein Bp von zwei As, genauer gesagt den RVDs eines *repeats*, erkannt wird (Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009) .

Dieses Modell der Sequenzspezifität sollte zu Beginn dieser Arbeit verifiziert werden. Dafür wurden anhand des Modells der Sequenzspezifität DNA-Erkennungssequenzen für die TAL-Effektoren Hax2, Hax3, Hax4 und AvrXa10, von denen bisher keine Zielsequenzen bekannt waren, abgeleitet und diese im transienten Reportersystem analysiert. Die spezifische Induktion der Transkription des GUS-Reportergens durch den jeweiligen TAL-Effektor wurde in GUS-Aktivitätstests gezeigt. Somit konnte das Modell der Sequenzspezifität erfolgreich bestätigt werden. Dabei wurde zum ersten Mal das Prinzip des Erkennungsmechanismus der TAL-Effektoren aus *Xanthomonas* spp. im Detail gezeigt. Dabei konnte die Erkennung für eine ganze Effektor-Familie aufgeklärt werden. Diese neue Erkenntnis hilft die Interaktion zwischen Phytopathogen und Pflanze weiter aufzuklären und angesteuerte Zielsequenzen in den Wirtspflanzen zu identifizieren. Weiterhin wurde die Spezifität der einzelnen RVDs bestimmt. Diese hängt vom jeweiligen *repeat*-Typ ab und kann mehr als ein Nukleotid umfassen. In den Studien zur Bestimmung der Spezifität konnte gezeigt werden, dass die Erkennung konform mit dem aufgestellten Modell war. Dabei erkennt der RVD NI das A-Nukleotid, NG das T-Nukleotid, HD das C-Nukleotid, sowie NN das A- und G-Nukleotid. Die Spezifität umfasste dabei ein oder zwei Nukleotide. Der *repeat*-Typ NS hingegen wies keine eindeutige Spezifität auf. Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Spezifität der RVDs variiert und ein, zwei oder kein spezielles Bp erkannt wird.

Das Modell der Sequenzspezifität konnte anhand der Box im Promotor von *Xa27* für den TAL-Effektor *AvrXa27* bestätigt werden (Gu *et al.*, 2005; Römer *et al.*, 2009b). Dabei wurde zunächst ein Promotorbereich mit TATA-Box und potentieller *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box im *Bs3*-HR-Reportersystem analysiert, und anschließend die *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box eingegrenzt (Römer *et al.*, 2009b). Nach der Insertion der *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box in den *Bs3*-Promotor mit *Bs3*-Reportergen konnte die Induktion der HR bei Ko-Expression mit *AvrXa27* gezeigt werden (Römer *et al.*, 2009b). Somit konnte in parallelen Arbeiten und unabhängig vom Modell der Sequenzspezifität die *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box eingegrenzt werden, die durch *AvrXa27* induziert wird. Der Bereich der eingegrenzten *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box stimmt mit der vorhergesagten Box überein (Boch *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009a).

Zudem gelang es in weiterführenden Arbeiten mit Hilfe des Modells der Sequenzspezifität die DNA-Bindeboxen einiger TAL-Effektoren des Reispathogens *Xoo* zu identifizieren. Dafür wurden die Effektoren *PthXo1*, *PthXo6* und *AvrXa7* sowie *TalC* genutzt, von denen bekannt war, dass sie die Gene *Xa13* (*Os8N3*), *OsTFX1* und *Os11N3* induzierten (Antony *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2006; Sugio *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2009). Für *PthXo1*, *PthXo6* und *AvrXa7* wurden einerseits komplette Promotorsequenzen der Zielgene (Antony, 2010; Römer *et al.*, 2010) und andererseits ein Bereich um die abgeleiteten Boxen in den Promotor von *Bs3* inseriert (Römer *et al.*, 2010) und vor ein GUS-Reportergen kloniert. GUS-Aktivitätsbestimmungen bestätigten die direkte Induktion der Genexpression jeweils durch die oben genannten TAL-Effektoren aus *Xoo* (Antony, 2010; Römer *et al.*, 2010). Auch wurde für den kürzlich identifizierten TAL-Effektor *TalC* gezeigt, dass er (wie auch *AvrXa7*) *Os11N3* induziert (Yu *et al.*, 2011). Dafür wurden einerseits der *Os11N3*-Promotor und andererseits die *TalC<sub>Os11N3</sub>*-Box vor den minimalen *Bs4*-Promotor vor ein promotorloses GUS-Reportergen inseriert. Die Induktion der Transkription wurde mittels transienten GUS-Expressionsstudien gezeigt, wobei beide GUS-Reporterkonstrukte durch *TalC* induziert wurden (Yu *et al.*, 2011).

Das Modell der Sequenzspezifität findet für alle oben erwähnten Effektoren aus den Stämmen von *Xcv*, *Xoo* und *Xca* erfolgreich Anwendung (Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009; Morbitzer *et al.*, 2010; Römer *et al.*, 2009b; Römer *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Es handelt sich vermutlich um einen universell nutzbaren Code der TAL-Effektorproteine aus *Xanthomonas* spp. (Tabelle 3-1). Anhand dieses Codes kann man nun für die TAL-Effektoren passende DNA-Bindesequenzen bestimmen.

In dieser Arbeit wurde neben den transienten Expressionsstudien das Modell der Sequenzspezifität in Hinsicht auf die spezifische Induktion von Endogenen untersucht. Bei diesem Ansatz wurden *hax2*-transgene *A. thaliana*-Pflanzen genutzt, die nach Ethanolinduktion den TAL-Effektor Hax2 produzieren. Hax2 induzierte im *A. thaliana*-Genom die Transkription verschiedener Gene: Die induzierten, transgenen Pflanzen verfärbten sich lila. Um die Ursache für diese Reaktion zu analysieren und Hax2-induzierte Gene zu identifizieren wurde ein *Microarray* durchgeführt und erste Kandidatengene ermittelt. (Auswertung der Daten in der Diplomarbeit von A. Wolf, 2012.) Zu den Genen, deren Expression nach Induktion am stärksten abwich, gehört *PAP1*, ein Regulator der Anthocyan-Synthese. Anhand dieses und anderer deregulierter Gene war ein Vergleich der Hax2-Box, bzw. von gekürzten Hax2-Boxen, mit den Promotorsequenzen möglich. *PAP1* weist in den 500 Bp vor dem ATG zwei potentielle Hax2-Boxen auf (Abbildung 6-1, Abbildung 6-2). Die Induktion von *PAP1* durch Hax2 konnte mit sq RT-PCR nachgewiesen werden und korreliert mit der verstärkten Bildung von Anthocyanen (Boch *et al.*, 2009). Somit wurde gezeigt, dass durch Hax2 spezifisch ein Endogen induziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit für das Modell der Sequenzspezifität für TAL-Effektoren gezeigt, dass DNA-Zielsequenzen und die nachfolgende Geninduktion durch TAL-Effektoren vorhersagbar sind. Diese Vorhersagbarkeit von Zielsequenzen hat den Vorteil, dass man für natürliche und bekannte Effektoren Zielgene über einen Vergleich der Box-Sequenz in Promotorbereichen finden kann. Für künftige Forschungsschwerpunkte wäre die Generierung eines TAL-Effektors für spezifische Zielsequenzen interessant, über den die Genexpression manipulierbar wird.

### 4.2 Generation und Analyse künstlicher TAL-Effektoren

Um zu untersuchen, ob die *repeat*-Reihenfolge in natürlichen TAL-Effektoren veränderbar ist, ohne dass die Induktion der Zielgene beeinträchtigt wird, werden manipulierte oder künstlich erzeugte TAL-Effektoren benötigt. Die Klonierung der *repeats* war durch die homologe Sequenz erschwert. Nur über ein TypIIS-Restriktionsenzym konnten die *repeats* isoliert und kloniert werden. Aufgrund der Klonierung mit Hilfe eines TypIIS-Restriktionsenzym war die Ligation der *repeats* in der korrekten Orientierung in einen minimalen Hax3-Effektor möglich. Jedoch konnte zunächst keine Reihenfolge der *repeat*-Typen bestimmt werden. Die über Ligation erzeugten künstlichen ArtX-Effektoren wiesen damit eine neue und willkürliche Reihenfolge der *repeats* auf. Alle zehn ArtX-Effektoren

waren in der Lage analog zu den natürlichen TAL-Effektoren spezifisch die Transkription des GUS-Reportergens zu induzieren. Alle zehn untersuchten ArtX-Effektoren wiesen eine ähnlich starke GUS-Aktivität auf. Daher hat die Reihenfolge der *repeats* in der *repeat*-Region in diesen TAL-Effektoren keinen Einfluss auf die Induktionsstärke. In parallelen Arbeiten wurde ebenfalls die unabhängige Erkennung der Nukleotide von den einzelnen RVDs beschrieben (Moscou und Bogdanove, 2009). Weiterhin konnte durch die gezielte Klonierung des gleichen *repeat*-Typs in den minimalen Hax3-Effektor ein künstlicher TAL-Effektor mit unterschiedlicher *repeat*-Anzahl des gleichen *repeat*-Typs generiert werden. Mit Hilfe dieser künstlichen TAL-Effektoren konnte ebenso ab einer minimalen Länge der *repeat*-Region die Geninduktion gezeigt werden (Kapitel 4.3).

Um die gezielte Genexpression natürlicher Promotoren zu stimulieren, musste die Generierung von künstlichen TAL-Effektoren optimiert werden, d.h. eine Positions-gerichtete Klonierung der *repeat*-Fragmente ermöglicht werden. Eine dafür geeignete Methode war das *golden gate cloning*, mit dem man beliebig viele Fragmente ohne zurückbleibende Restriktionsstellen aneinander klonieren kann (Engler *et al.*, 2008). Das *golden gate cloning* nutzt ebenfalls TypIIS-Restriktion kombiniert mit Ligation. Für die gezielte Klonierung von spezifischen TAL-Effektoren wurden die einzelnen *repeats* mit positionsspezifischen TypIIS-Restriktionsschnittstellen versehen und konnten somit ganz speziell aneinander gefügt werden (*golden TAL technology*). Diese Methodik wurde genutzt, um den künstlichen TAL-Effektor ArtBs4 zu generieren. Dieser 12,5 *repeats* umfassende TAL-Effektor induzierte die Transkription einerseits des GUS-Reportergens und andererseits des natürlichen *bs4* in *L. pennellii* LA2963.

Auch in parallelen Studien wurde ein künstlicher TAL-Effektor für den *Bs4*-Promotor generiert und dessen Fähigkeit der Geninduktion demonstriert (Morbitzer *et al.*, 2010). Zudem wurden ebenfalls weitere künstliche TAL-Effektoren für zwei Gene aus *A. thaliana* generiert. Diese TAL-Effektoren, dTALE(KNAT1) und dTALE(EGL3), induzierten spezifisch die Endogene *KNAT1* und *EGL3* (Morbitzer *et al.*, 2010).

Die *golden TAL technology* wurde weiterentwickelt, so dass über eine Zwei-Schritt-Klonierung mit zwei unterschiedlichen TypIIS-Restriktionsenzymen die Klonierungseffizienz deutlich gesteigert wurde (Streubel, 2011; Geißler *et al.*, 2011). Durch die Anwendung der *golden TAL technology* (Geißler *et al.*, 2011) bzw. verwandte Verfahren können nun TAL-Effektoren für beliebige Erkennungssequenzen verschiedenster Zielgene generiert werden, was bis vor wenigen Jahren undenkbar war. Interessanterweise wurden auch in parallelen

Arbeiten beruhend auf dem *golden gate cloning* diverse andere ähnliche Klonierungsmethoden entwickelt, die ebenfalls in der Lage sind, designte TAL-Effektoren zu generieren (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Morbitzer *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch die Generierung von zufällig ligierten, künstlichen TAL-Effektoren gezeigt, dass die Reihenfolge der *repeats* variabel ist und die *repeats* in der *repeat*-Region neu kombiniert werden können. Weiterhin gelang es durch die Entwicklung der *golden TAL technology* die Generierung von TAL-Effektoren mit vorhergesagter Erkennungsspezifität, wodurch nun für bekannte Gene spezifische TAL-Effektoren oder TAL-Effektor-Derivate generiert werden können.

#### 4.3 Eine minimale Länge der *repeat*-Region ist essentiell für die Geninduktion durch einen TAL-Effektor

In den Xanthomonaden kommen TAL-Effektoren mit verschiedenen langen *repeat*-Regionen vor, diese können 1,5 bis 33,5 *repeats* umfassen (Boch und Bonas, 2010). Die drei kürzesten, bekannten Effektoren sind Avr/pth3 (1,5 *repeats*) Avrxa5 (5,5 *repeats*) und AvxXa3 (8,5 *repeats*). Für diese Effektoren wurde eine Erkennung über die Resistenzgene *Xa3* und *xa5* beschrieben (Bai *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 1992; Iyer und McCouch, 2004; Wu *et al.*, 2007). Jedoch wurde bisher keine transkriptionelle Resistenzgen-Induktion durch diese TAL-Effektoren gezeigt. Ob auch TAL-Effektoren mit kurzen *repeat*-Regionen in der Lage sind eine stabile Geninduktion auszulösen, ist daher unbekannt.

Anhand der Untersuchung künstlicher TAL-Effektoren mit verschiedenen langen *repeat*-Regionen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mindestens 6,5 *repeats* bei einem TAL-Effektor nur mit HD-*repeats* bzw. 7,5 *repeats* bei einem TAL-Effektor mit gemischten *repeats* für eine transkriptionelle Induktion des Reportergens nötig sind (Boch *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der minimalen Länge der *repeat*-Region aus dieser Arbeit korrelieren mit dem derzeit bekannten Wissen über natürliche Effektoren. Hax3 ist mit 11,5 *repeats* der kürzeste natürlich vorkommende TAL-Effektor, von dem gezeigt werden konnte, dass er die Transkription von Zielgenen initiieren kann (Boch *et al.*, 2009; Streubel, 2011).

Die Mehrzahl der natürlich vorkommenden TAL-Effektoren weist 15,5 bis 19,5 *repeats* innerhalb der *repeat*-Region auf (Boch und Bonas, 2010). Damit umfassen die Zielsequenzen 17 bis 21 Bp. Durch diese Länge wird eine Spezifität erreicht, wie sie für ein Oligonukleotid

bei einer PCR typisch ist. Die Induktion bestimmter Gene über die angesteuerten Zielsequenzen im Wirtsorganismus ist damit sehr spezifisch. Die Interaktion der TAL-Effektoren mit der DNA erfolgt vermutlich über Wasserstoffbrücken zwischen den As der RVDs und der Base des Nukleotids. Vermutlich ist die Interaktion zwischen den TAL-Effektor-*repeats* und der DNA stabil genug, wenn in einem ausreichenden Maß Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden sind, wofür eine Mindestanzahl von *repeats* Voraussetzung ist. Um die Bindung unterschiedlich langer TAL-Effektoren an der DNA weiterführend zu untersuchen, eignen sich EMSA-Analysen.

Nach der Bindung der TAL-Effektoren an die DNA könnte die Transkriptionsinitiation über das Rekrutieren von TFs bewirkt werden. Darüber wie die sterische Bindung eines TAL-Effektors an die DNA erfolgt, kann bisher nur spekuliert werden. Bereits im Jahr 2000 konnte für den TAL-Effektor AvrXa7 gezeigt werden, dass dieser doppelsträngige DNA bindet. Dabei wurde keine spezifische Sequenz, sondern eine Affinität zu AT-reichen Sequenzen gezeigt (Yang *et al.*, 2000). Später konnte die DNA-Bindung für AvrBs3 an die Bereiche der AvrBs3<sub>UPA</sub>-Boxen gezeigt werden (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Hierbei wurde deutlich, dass nur die *repeat*-Region der TAL-Effektoren in der Lage ist DNA zu binden (Kay *et al.*, 2007). Somit wurde die *repeat*-Region als essentiell für die DNA-Bindung eingestuft. Auch in späteren DNaseI-Schutzexperimenten und weiteren Bindungsstudien wurden die Bindung von TAL-Effektoren an deren TAL-Box-DNA-Abschnitte demonstriert (Boch *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2010).

Wie der TAL-Effektor die Bindung an die DNA angeht, könnte über die Kristallisation eines TAL-Effektors mit DNA herausgefunden werden. Bisher ist diese Kristallisation noch nicht gelungen. Die 3D-Struktur des Proteins kann jedoch anhand bekannter DNA- bzw. RNA-bindender Proteine vorhergesagt werden, indem die Sekundärstruktur der As-Sequenz mit bekannten Proteinen verglichen wird. Laut PSIPRED-Vorhersagen weisen die *repeats* eine starke Ähnlichkeit zu den sogenannten TPR- (Tetratrico-Peptid-*repeats*) und PPR- (Pentatrico-Peptid-*repeat*) Proteinen auf (Murakami *et al.*, 2010; Schornack *et al.*, 2006).

Kürzlich publizierte Strukturdaten eines 1,5 *repeats* umfassenden TAL-Effektors, die über NMR (*nuclear magnetic resonance*) erhalten wurden, zeigen eine *helix-turn-helix*-Struktur der TAL-Effektor-*repeats*, die den TPR-Proteinen ähnelt (Murakami *et al.*, 2010). Die zwei  $\alpha$ -Helices sind dabei antiparallel angeordnet und interagieren womöglich über hydrophobe Gruppen. Die für die Interaktion wichtigen RVDs befinden sich demnach am Ende der ersten

Helix (Murakami *et al.*, 2010). Die Modellierung der TAL-*repeats* anhand der TPR-Struktur zeigte, dass die RVDs der TAL-*repeats* vermutlich nebeneinander am Ende der ersten Helix angeordnet und zur inneren Seite der Superhelix ausgerichtet sind (Murakami *et al.*, 2010; Schornack *et al.*, 2006; Scholze und Boch, 2011). Diese Position der RVDs ist durch die Randlage für die Interaktion mit der DNA sterisch vorteilhaft. Jedoch kann die Struktur der TAL-Effektoren abweichen, denn 1,5 *repeats* spiegeln womöglich nicht die gesamte *repeat*-Region wieder (Scholze und Boch, 2011).

Die konservierte As-Sequenz der *repeats* bedingt vermutlich eine gleiche Ausrichtung der RVDs in der 3D-Struktur, wenn die RVDs immer am Ende der Helix nahe dem *turn*-Bereich angeordnet sind (Murakami *et al.*, 2010; Scholze und Boch, 2011). Diese Positionierung könnte eine erhöhte Flexibilität für die RVDs in einer sonst fixierten 3D-Struktur erlauben. Die Reihenfolge der einzelnen *repeats*, die sich hauptsächlich in ihren RVDs unterscheiden, wäre somit für die Ausbildung der Struktur der gesamten *repeat*-Region nicht entscheidend. Die *repeat*-Region würde immer die gleiche 3D-Formation einnehmen wobei die Bindung zur DNA durch jeden *repeat*-Typ erfolgt (Scholze und Boch, 2011). D.h. jeder *repeat* bzw. *repeat*-Typ wäre damit theoretisch in der Lage die DNA zu binden. Diese mögliche Flexibilität in der *repeat*-Anordnung ist eine wichtige Voraussetzung, um künstliche TAL-Effektoren zu generieren, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenso wie die natürlichen TAL-Effektoren die Funktion eines Transkriptionsaktivators erfüllen können.

#### 4.4 Der Einfluss von Fehlpaarungen auf das Modell der Sequenzspezifität

In den aktuellen Publikationen über TAL-Effektoren und deren Derivate wurden immer nach dem Modell der Sequenzspezifität der TAL-Effektoren abgeleitete Boxen oder bereits bekannte Zielsequenzen aus Promotoren verwendet, um die Induktion durch einen TAL-Effektor zu zeigen (Geißler *et al.*, 2011; Morbitzer *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Römer *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich die Frage untersucht, wie genau der TAL-Effektor zu seiner Zielsequenz, passen muss. Bei der Untersuchung von einzelnen und multiplen Mutationen im 5'-Bereich der ArtX2- und Hax2-Box konnte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Fehlpaarungen näher charakterisiert werden. Wenn die Erkennung des initialen T-Nukleotid nicht stattfinden konnte, wurde eine um 50 % reduzierte Reporteraktivität gemessen. Bei Mehrfachmutationen war fast keine Induktion der

Transkription mehr möglich. Diese Daten zeigen, dass für die Erkennung der Zielsequenz der 5'-Bereich der Box wichtig ist und dort keine Mehrfachmutationen zugelassen werden. Anders verhält es sich mit dem 3'-Bereich der Box, der offenbar für die Erkennung weniger wichtig ist. Wenn durch eingefügte Mutationen Fehlpaarungen zum letzten halben oder zu den letzten zwei *repeats* entstanden, war dennoch eine Reporter-genaktivität messbar: Diese war mit der Genexpression des *35S:uidA*-Konstruktes vergleichbar. Die letzten zwei Nukleotide der Box sind bei einer ansonsten perfekt passenden *Box-repeats*-Interaktion offenbar nicht mehr entscheidend für die Erkennung und die Induktion der Transkription durch einen TAL-Effektor.

Bei dem relativ kurzen TAL-Effektor Hax4 mit 14,5 *repeats* führten bereits drei verteilte Fehlpaarungen zu einem Verlust der Induktion (Boch *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu weist die *AvrBs3<sub>Bs3</sub>*-Box auch drei Fehlpaarungen zu *AvrBs3* auf. Trotzdem ist *AvrBs3* mit seinen 17,5 *repeats* in der Lage diese Box zu binden und zu induzieren (Römer *et al.*, 2007). Fraglich ist, wie viele Fehlpaarungen bei der Bindung toleriert werden können bzw. welche Arten von Fehlpaarungen die Erkennung und Geninduktion verhindern.

In natürlichen Zielsequenzen von TAL-Effektoren sind diverse Fehlpaarungen zu finden, jedoch kommt es erstaunlich oft zur Geninduktion. Im Beispiel von *AvrXa27* (16,5 *repeats*) findet an der *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box mit drei Fehlpaarungen eine spezifische Induktion statt, jedoch nicht an der *AvrXa27<sub>Xa27</sub>*-Box bei 10 Fehlpaarungen (Römer *et al.*, 2009b). Auch bei *TalC* (21,5 *repeats*) bestehen zur optimalen *TalC<sub>Os11N3</sub>*-Box drei Fehlpaarungen, aber diese wird ebenso wie die optimale Box durch *TalC* erkannt (Yu *et al.*, 2011). Weiterhin wird die *Bs3-E*-Zielsequenz nur durch *AvrBs3Δrep16* (eine Fehlpaarung) nicht aber durch *AvrBs3* mit fünf Fehlpaarungen induziert (Römer *et al.*, 2009a). Offenbar werden bei mindestens 16,5 *repeats* umfassenden TAL-Effektoren meist drei Fehlpaarungen toleriert.

Diese Fehlpaarungsquote spiegelte sich auch beim Vergleich potentieller Boxen mit der RVD-Abfolge bekannter TAL-Effektoren wider (Boch *et al.*, 2009). Sofern nur ein bis drei Fehlpaarungen vorkamen, konnte die jeweilige Geninduktion gezeigt werden. Erst ab vier Fehlpaarungen kam es zum Verlust der Erkennung von TAL-Effektoren mit weniger als 18,5 *repeats* (Tabelle 4-1), (Boch *et al.*, 2009). Diese in der Natur vorkommenden, über die Box verteilten Fehlpaarungen werden entweder von den TAL-Effektoren toleriert oder sie beeinflussen lediglich die Stärke der Aktivierung bzw. Bindung. In jedem Fall findet anhand der Zielpromotoren eine spezifische Induktion der Transkription statt (Boch *et al.*, 2009).



Die spezifische Induktion konnte auch in Studien von Reis-Promotorsequenzen gezeigt werden. Dabei wurden die anhand des Modells der Sequenzspezifität identifizierten Boxen für die TAL-Effektoren AvrXa7 (24,5 *repeats*) und PthXo1 (23,5 *repeats*) mutiert (G. Antony, Dissertation, 2010). Durch die Mutation von drei zusätzlichen Bp in der Box (neun Fehlpaarungen) konnten diese Promotorsequenzen nicht mehr durch die jeweiligen TAL-Effektoren induziert werden (Antony, 2010). Die tolerierbaren Fehlpaarungen scheinen somit auch von der Länge der *repeat*-Region abhängig zu sein, denn TAL-Effektoren mit längeren *repeat*-Regionen tolerieren womöglich mehr Fehlpaarungen (Tabelle 4-1).

Ein Vergleich der Induktion zwischen nativer und optimaler Box wurde am Beispiel von AvrBs3 und der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box durchgeführt. Die Induktion durch AvrBs3 an dieser Box ist trotz der zwei Fehlpaarungen stark und konnte nach 24 und 48 Stunden nachgewiesen werden (Kay *et al.*, 2007). Bei der schrittweisen Optimierung von einer zu null Fehlpaarungen in der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box konnte gezeigt werden, dass zwar die Geninduktion leicht steigt, aber diese nicht signifikant erhöht ist. In einer parallelen Arbeit wurde analog die native mit der optimalen TalC-Box verglichen (Yu *et al.*, 2011). Die native TalC<sub>Os11N3</sub>-Box weist, anders als die optimale TalC-Box, drei Fehlpaarungen zu TalC auf. Beim Test beider Boxen im GUS-Reportersystem wurden beide Konstrukte durch TalC induziert, wobei die GUS-Aktivität der optimalen TalC-Box um ca. ein Drittel erhöht war (Yu *et al.*, 2011). Die optimierte TalC-Box bewirkte damit eine bessere Induktion.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Verlängerung der *repeat*-Region im 3'-Bereich von AvrBs3 die Spezifität des TAL-Effektors erhöht wurde. AvrBs3 induziert die Transkription aller *UPA*-Gene (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2007), darunter die von *UPA20* und *Bs3*. Die Induktion erfolgt trotz zwei Fehlpaarungen an der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box bzw. den drei Fehlpaarungen an der AvrBs3<sub>Bs3</sub>-Box, (Tabelle 4-1). Durch die Insertion von vier *repeats* (18 bis 20) wurde die *repeat*-Region spezifisch für *UPA20* oder *Bs3* verlängert. Nach der Insertion wiesen die jeweils 21,5 *repeats* umfassenden AvrBs3-Derivate zwar drei Fehlpaarungen zur eigenen Box, aber dafür sieben Fehlpaarungen zur anderen AvrBs3-Box auf. Das GUS-Reportergen wurde jeweils spezifisch trotz der drei Fehlpaarungen induziert, jedoch nicht mehr bei den sieben Fehlpaarungen (Morbiter *et al.*, 2010). Die Generierung von AvrBs3-Derivaten zeigte, dass durch die Verlängerung der *repeat*-Region die Erkennungsspezifität gesteigert werden kann (Morbiter *et al.*, 2010).

**Tabelle 4-1: Übersicht bekannter TAL-Effektoren und deren Boxen mit Anzahl der Fehlpaarungen.**

TAL-Effektor- Box	TAL-Effektor	repeat-Anzahl	Fehlpaarungen <sup>1</sup>	Position der Fehlpaarungen <sup>1</sup>	Erkennung/ Geninduktion <sup>2</sup>
AvrBs3 <sub>UPA20</sub> -Box	AvrBs3	17,5	2	1/ 17	Ja
AvrBs3 <sub>Bs3</sub> -Box	AvrHah1	13,5	1	13	Ja
AvrBs3 <sub>Bs3</sub> -Box	AvrBs3	17,5	3	1/ 15/17,5	Ja
AvrBs3 <sub>Bs3</sub> -Box	AvrBs3 $\Delta$ rep109	14,5	3	1/13/14,5	Ja
AvrBs3 <sub>Bs3</sub> -Box	AvrBs3 $\Delta$ rep16	13,5	4	1/11/12/13,5	Nein
AvrBs3 <sub>Bs3-E</sub> -Box	AvrBs3 $\Delta$ rep16	13,5	1	1	Ja
AvrBs3 <sub>Bs3-E</sub> -Box	AvrHah1	13,5	4	9/10/12/13	Nein
AvrBs3 <sub>Bs3-E</sub> -Box	AvrBs3 $\Delta$ rep109	14,5	4	1/13/14/14,5	Nein
AvrBs3 <sub>Bs3-E</sub> -Box	AvrBs3	17,5	5	1/14/15/17/17,5	Nein
AvrXa27 <sub>Xa27</sub> -Box	AvrXa27	16,5	3	3/4/16,5	Ja
AvrXa27 <sub>xa27</sub> -Box	AvrXa27	16,5	10	3/4/9/10/12/13/14/15/16 /16,5	Nein
PthXo1 <sub>Xa13</sub> -Box	PthXo1	23,5	4-5*	4*/10/11/19/21	Ja
PthXo1 <sub>xa13</sub> -Box/ PthXo1 <sub>Os8N3</sub> -Box	PthXo1	23,5	10-11*	2/4*/5/10/11/13/15/17/ 18/20/23,5	Nein
PthXo6 <sub>OsTFX1</sub> -Box	PthXo6	22,5	1-4*	2*/10/12*/19*	Ja
PthXo7 <sub>OsTFIly1</sub> -Box	PthXo7	21,5	3-4*	6/15*/16/18/	Ja
AvrXa7 <sub>Os11N3</sub> -Box	AvrXa7	24,5	6-7*	7/14/15/19/22/24,5	Ja
TalC <sub>Os11N3</sub> -Box	TalC	21,5	3	0/17/21	Ja

\* die Spezifität für den *repeat*-Typ HG und H\* und damit die genaue Fehlpaarungsanzahl ist noch nicht bekannt.

<sup>1</sup> die Positionen der Fehlpaarungen wurde anhand der Übersicht in Abbildung 3-2 bestimmt.

<sup>2</sup> die z.T. postulierten Boxen und Geninduktionen wurden aus Boch *et al.* (2009), Moscou und Bogdanove (2009), Römer *et al.* (2010) und Yu *et al.* (2011) entnommen.

Die in Tabelle 4-1 zusammengefassten Fehlpaarungen der TAL-Effektoren sind über die gesamte Box verteilt, befinden sich jedoch oft gehäuft in den letzten *repeats* bzw. Bp der Box. Der Einfluss dieser Fehlpaarungen wirkt sich nicht entscheidend auf die Erkennung aus. Deswegen können TAL-Effektoren trotz bis zu drei (ggf. vier bei PthXo1, PthXo6, PthXo7) Fehlpaarungen die Induktion der stromabwärts gelegenen Gene induzieren. Es erklärt auch, wie Einzel-Bp-Substitutionen im Promotor von *Bs3* die Erkennung durch AvrBs3

verhinderten. Durch diese eine zusätzliche Mutation entstanden insgesamt vier Fehlpaarungen in der AvrBs3<sub>Bs3</sub>-Box, aufgrund derer die Transkription des *Bs3*-Gens nicht mehr induziert werden konnte (Römer *et al.*, 2009a).

Die Bestimmung aller möglichen Zielsequenzen für TAL-Effektoren ist durch die Tolerierung von Fehlpaarungen eine komplexe Aufgabe. Theoretisch ist es möglich die anhand des Modells der Sequenzspezifität abgeleitete Sequenz der optimalen Box mit den Promotorbereichen des jeweiligen Genoms zu vergleichen. Auf diese Weise können Kandidatengene gefunden werden. Jedoch benötigt man durch die erlaubten Fehlpaarungen für die Identifizierung möglicher Zielsequenzen einen Algorithmus, der bis zu drei Fehlpaarungen berücksichtigt. Dabei kann bisher nicht vorhergesagt werden, an welchen Positionen welche Fehlpaarungen toleriert werden.

### 4.5 Der Einfluss der Promotorsequenz auf die Induktion durch einen TAL-Effektor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Box eines TAL-Effektors allein ausreicht, dass der TAL-Effektor die Transkription des stromabwärts gelegenen Gens induzieren kann. Nach dem Modell der Sequenzspezifität für TAL-Effektoren erkennt der Effektor spezifisch seine Box und induziert anschließend die Transkription (Boch *et al.*, 2009; Moscou und Bogdanove, 2009). In den bisher untersuchten Reporterkonstrukten waren die Boxen immer vor eine minimale *Bs4*-Promotorsequenz oder in einen *Bs3*-Promotor kloniert bzw. befanden sich in ihrem nativen Promotor (Boch *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009b). Deswegen wurde untersucht, ob die Sequenz nach der Box eine Promotorsequenz sein muss und ob bestimmte Promotorelemente wie z.B. die TATA-Box essentiell für die Geninduktion sind.

Dafür wurde die Hax3-Box vor verschiedene Promotorregionen des *Bs4*-Promotors und nicht-Promotorsequenzen kloniert. Dabei wurden nach dem Vorbild des minimalen *Bs4*-Promotors *pBs4*<sub>75-1</sub> jeweils kurze Sequenzabschnitte von 75 Bp Länge genutzt (Schornack *et al.*, 2005). Bedingt durch die Klonierung befand sich immer die gleiche Sequenz des Klonierungsvektors stromaufwärts der Box. Somit war immer der gleiche Einfluss von Seiten des 5'-Bereichs gegeben. Hingegen variierte der 3'-Sequenzbereich. Nicht alle der so erstellten Reporterkonstrukte konnten durch Hax3 induziert werden. Drei der vier Reporterkonstrukte mit Promotorsequenzen wurden induziert. Jedoch wurde keine Induktion bei den Konstrukten

mit nicht-Promotorsequenzen nachgewiesen. Die Induktion des Reportergens hängt damit von der Box stromabwärts liegenden Sequenz ab und Promotorsequenzen eignen sich offensichtlich besser als die eines ORFs. In den induzierbaren Reporterkonstrukten könnte die Induktion durch positiv wirkende Promotorelemente unterstützt worden sein, die z.B. in den klonierten *Bs4*-ORF-Sequenzen nicht vorkommen. Denkbar ist ebenfalls, dass die Geninduktion bei den nicht-induzierbaren Konstrukten durch negative bzw. inhibierende Elemente reduziert oder verhindert wurde. Zudem war die transkriptionelle Induktionsstärke in Reportern mit Promotorsequenzabschnitten unterschiedlich und könnte durch distal der Box liegende Promotorelemente zusätzlich positiv oder negativ beeinflussbar sein.

In den Sequenzabschnitten der Reporter *pBs4*<sub>75-1</sub> und *pBs4*<sub>300-226</sub> wurden potentielle TATA-Box-Elemente gefunden. Weiterhin befinden sich im *pBs4*<sub>75-1</sub> eine Pyrimidin-reiche Sequenz, eine potentielle CAAT-Box und die UTR (Schornack *et al.*, 2005). Pyrimidin-reiche Sequenzabschnitte kommen häufig in Promotoren vor (Yamamoto *et al.*, 2007a; Yamamoto *et al.*, 2007b; Civiň und Švec, 2009) und wurden auch als typisches Motiv nach einer TAL-Box beschrieben (Moscou und Bogdanove, 2009). Die Reporterkonstrukte *pBs4*<sub>75-1</sub> und *pBs4*<sub>300-226</sub> konnten durch Hax3 stark induziert werden, das Reporterkonstrukt *pBs4*<sub>225-151</sub> mit einer potentiellen W-Box hingegen nicht (Schornack *et al.*, 2005). Der kaum induzierbare Reporter *pBs4*<sub>225-151</sub> weist keine vorhersagbaren Promotorelemente auf, ebenso wie die nicht induzierbaren *Bs4*-ORF-Sequenzen. Da Box, Reporter gen und der induzierende TAL-Effektor jeweils konstant gehalten wurden, kann offenbar die Eigenschaft eines positiv oder negativ wirkenden Elements distal der Box die Transkription in diesen kurzen Sequenzabschnitten stark beeinflussen. Somit ist die Insertion der Box wahrscheinlich in einer leicht aktivierbaren Promotorregion am besten, die z.B. TATA-Boxen oder CAAT-Boxen enthalten. Dadurch wird die Induktionsfähigkeit des Gens durch TAL-Effektoren positiv beeinflusst, auch wenn die Erkennung und Bindung der DNA durch TAL-Effektoren vermutlich in jeder Sequenzumgebung stattfindet. Die Bindung der TAL-Effektoren an Boxen in nicht-Promotorsequenzen wurde bei TAL-Effektor-Derivaten bereits demonstriert (Cermak *et al.*, 2011; Christian *et al.*, 2010; Hockemeyer *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Mussolino *et al.*, 2011). Die spezifische Geninduktion ist hingegen abhängig von der Sequenzumgebung und es eignet sich anscheinend nicht jede beliebige Sequenz.

Um relevante Promotorbereiche näher einzugrenzen, wurden in dieser Arbeit Sequenzchimären erstellt und untersucht. Die Promotorabschnitte einer Pyrimidin-reichen Sequenz oder das Vorhandensein einer UTR schienen keinen Einfluss auf die Transkriptionsinduktion zu haben. Die Untersuchungen der potentiellen W-Box deuteten darauf hin, dass dieser Bereich auf die Transkriptionsinitiation einen negativen Einfluss hat, denn die GUS-Aktivitäten der potentiellen W-Box-enthaltenden Reporterkonstrukte waren alle reduziert. Weiterführende Studien zeigten jedoch, dass die potentielle W-Box keinen negativen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung durch Hax3 hatte (A. Klemm, J. Boch, unveröffentlicht). Die Mutation der potentiellen W-Box in der Sequenz des *pBs4*<sub>225-151</sub> führte zu keiner erhöhten Geninduktion im Vergleich zur Originalsequenz des *pBs4*<sub>225-151</sub> (A. Klemm, J. Boch, unveröffentlicht). Somit scheint kein WRKY-Faktor durch Bindung der potentiellen W-Box die transkriptionelle Aktivität dieses minimalen Promotorabschnittes zu inhibieren.

Die Ergebnisse der Sequenzchimäre verdeutlichten, wenn der Bereich der potentiellen TATA-Box und der Bereich um die potentielle CAAT-Box des minimalen *Bs4*-Promotors *pBs4*<sub>75-1</sub> in den äquivalenten Abschnitt des *pBs4*<sub>225-151</sub> inseriert wurden, erfolgte die Induktion durch Hax3 stark, im umgekehrten Chimäre jedoch nicht. Dies weist darauf hin, dass TATA-Box oder CAAT-Box positiv wirkende Elemente für die Transkriptionsinitiation in einem minimalen Promotorbereich darstellen. Bei der Untersuchung der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box im *Bs4*-Promotor mit 277 Bp wurde ebenfalls ein GUS-Reportersystem genutzt (Kay *et al.*, 2009). Dabei wurde die AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box je 79 Bp vor dem ATG inseriert und dabei einmal zusätzlich die potentielle TATA-Box (-65 Bp vor ATG) mutiert (TAGGTTAA) (Kay *et al.*, 2009). Die Induktion durch AvrBs3 an der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box war an der Insertionsstelle -79 Bp stark, unabhängig davon ob die potentielle TATA-Box intakt oder mutiert war (Kay *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit mit dem Promotorchimären nicht bestätigt werden. Wenn der Bereich der potentiellen TATA-Box (-65 Bp) im *pBs4*<sub>75-1</sub> ausgetauscht wurde (*pBs4*<sub>A1:B2:A3-4</sub>) kam es zu einer drastischen Reduktion der GUS-Aktivität. Die Mutation der potentiellen TATA-Box (-65 Bp) im 277 Bp langen *Bs4*-Promotor zerstörte jedoch nur eine der potentiellen TATA-Boxen, bei ca. -150 Bp wurde ein weiteres TATA-Box-Element beschrieben (Schornack *et al.*, 2005). Somit könnte diese zweite potentielle TATA-Box möglicherweise die Funktion der ersten potentiellen TATA-Box in dem längeren *Bs4*-Promotorkonstrukt übernommen haben (Kay *et al.*, 2009).

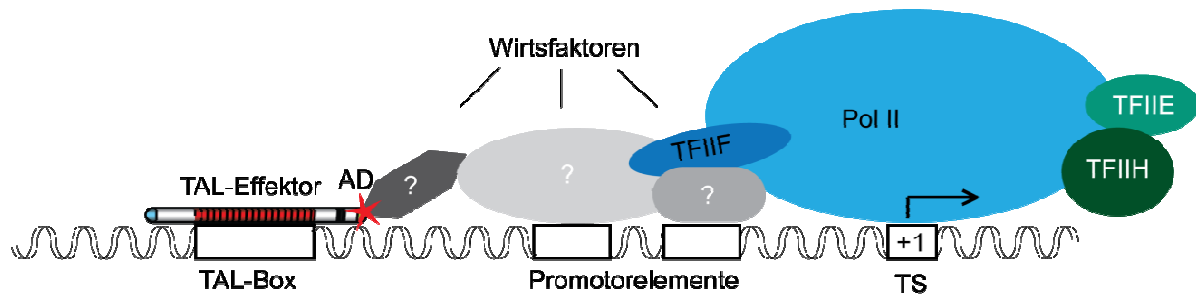
Ob der Insertionsort der TAL-Box relativ zur TATA-Box im minimalen *Bs4*-Promotor einen Einfluss hatte, wurde am Reporterkonstrukt der ArtHD-Box getestet. Es konnte festgestellt werden, dass eine signifikant höhere Initiation der Transkription möglich war, wenn die Box 10 Bp vor der TATA-Box des minimalen *Bs4*-Promotors inseriert und nicht direkt an die TATA-Box fusioniert war. Die Nähe einer TAL-Box zur TATA-Box wurde in anderen Versuchen nicht im Detail untersucht. Meist wurden die TAL-Boxen stromaufwärts in größeren Abständen als 10 Bp der TATA-Box in den nativen Promotor inseriert. So hatte die AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box 14 Bp Abstand zur potentiellen TATA-Box im 277 Bp umfassenden *Bs4*-Promotor (Kay *et al.*, 2009). In einer Promotorchimäre wurde die PthXo1<sub>Os8N3</sub>-Box durch die AvrXa7<sub>Os11N3</sub>-Box im *Os8N3*-Promotor ersetzt und befand sich damit vor der 24 Bp vor der natürlichen TATA-Box (Anthony, 2010). Diese Promotorchimäre war nur durch AvrXa7 induzierbar, wie GUS-Färbungen zeigten (Anthony, 2010). Die Insertionen der AvrXa27<sub>Xa27</sub>-Box bzw. der AvrBs3<sub>Bs3-E</sub>-Box lagen über 100 Bp vor der potentiellen TATA-Box im *Bs3*-Promotor (Römer *et al.*, 2009b). Die Geninduktion wurde mittels HR-Induktion gezeigt, was jedoch keinen genauen Rückschluss auf die Induktionsstärke zulässt. Durch die Insertion der AvrXa27<sub>Xa27</sub>-Box und zusätzlich der AvrBs3<sub>Bs3-E</sub>-Box in den *Bs3*-Promotor konnte zudem ein Promotor generiert werden, der durch drei TAL-Effektoren jeweils spezifisch induziert werden konnte (Römer *et al.*, 2009b). Die spezifische Erkennung von unterschiedlichen TAL-Boxen in einem Promotorkonstrukt konnte auch in dieser Arbeit anhand der Hax3- und ArtBs4-Box, sowie der Hax4- und ArtBs4-Box gezeigt werden. Die spezifische Geninduktion erfolgte in beiden experimentellen Ansätzen nur durch den jeweiligen TAL-Effektor. Dabei war es unwichtig, ob der Abstand zur TATA-Box 10 Bp oder über 100 Bp betrug. Auch in einem nativen Promotor können mehrere TAL-Boxen vorkommen. Beispiele dafür sind die Reispromotoren von *Os8N3* und *Os11N3*. Laut *Mircoarray*-Studien wird *Os8N3* nicht nur durch PthXo1 induziert, sondern auch durch die AvrXa7-Derivate PthXo4 und PthXo5 (Yang *et al.*, 2005). Die Boxen von PthXo4 und PthXo5 überlappen jeweils mit der TATA-Box im Gegensatz zur PthXo1<sub>Os8N3</sub>-Box, die 24 Bp vor der TATA-Box lokalisiert ist (G. Anthony, Dissertation, 2010). Somit kann das Endogen *Os8N3* durch bis zu drei TAL-Effektoren induziert werden. Im *Os11N3*-Promotor befindet sich 37 Bp vor einem TATA-Box-Motiv die TalC<sub>Os11N3</sub>-Box, während die AvrXa7<sub>Os11N3</sub>-Box mit der TATA-Box-Sequenz beginnt (Yu *et al.*, 2011; Römer *et al.*, 2010). Die Transkription von *Os11N3* wird ebenfalls durch den jeweiligen TAL-Effektor induziert (Yu *et al.*, 2011; Römer *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Induktion am Beispiel der Hax3-Box vor unterschiedlichen minimalen Promotorbereichen untersucht. Dort wurde die Stärke der Induktion eindeutig durch die Sequenz stromabwärts der Box beeinflusst. Generell scheint ein größerer Promotorbereich oder ein nativer Promotor eine bessere Sequenzumgebung für die transkriptionelle Geninduktion durch TAL-Effektoren zu sein. In Studien mit TalC wurde neben der nativen TalC<sub>Os11N3</sub>-Box vor dem minimalen *Bs4*-Promotor auch 341 Bp des nativen *Os11N3*-Promotors in einem GUS-Reporterkonstrukt kloniert und untersucht (Yu *et al.*, 2011). Der native Promotor konnte im Vergleich zur nativen TalC<sub>Os11N3</sub>-Box vor dem minimalen *Bs4*-Promotor die GUS-Reporterinduktion ca. das fünf Mal stärker induzieren (Yu *et al.*, 2011). Somit war die Induktionsstärke deutlich von der Sequenz bzw. Länge des Promotors abhängig.

In weiteren Studien wurden ebenfalls TAL-Boxen in längere, aber „fremde“ Promotorbereiche inseriert und die transkriptionelle Induktion untersucht (Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009a; Römer *et al.*, 2009b; Römer *et al.*, 2010). Dabei wurden TAL-Boxen an verschiedenen Positionen in die natürlichen *Bs3*- oder *Bs4*-Promotoren inseriert und die Transkriptionsinitiation bestimmt. Für alle untersuchten Reporterkonstrukte konnte eine Induktion durch den jeweiligen TAL-Effektor nachgewiesen werden (Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009a; Römer *et al.*, 2009b; Römer *et al.*, 2010). Zudem konnte eine Verschiebung des natürlichen Transkriptionsstarts auf 41-46 Bp nach der inserierten TAL-Box gezeigt werden (Römer *et al.*, 2009a). Der Insertionsort und die direkte Promotorumgebung der TAL-Box scheinen somit in einen natürlichen Promotor nicht essentiell für die Geninduktion durch den jeweiligen TAL-Effektor zu sein. Durch den TAL-Effektor bzw. dessen AD wird vermutlich die Interaktion mit Wirtsfaktoren vermittelt, die entweder direkt oder indirekt TFs rekrutieren und so die Transkription stimulieren (Abbildung 4-1). Dies zeigen die Versuche der TAL-Boxen in natürlichen Promotorsequenzen. Durch die Flexibilität der DNA könnten *Enhancer* an stromaufwärts oder stromabwärts gelegenen Elementen einen positiven Einfluss auf die Transkriptionsstärke ausüben. Dies ist bei einer limitierten, minimalen Promotorsequenz, in der Promotorelemente nötig sind, nicht möglich (Abbildung 4-1).

Die spezifische und insbesondere artifizielle Geninduktion sollte nur an dem betreffenden Gen erfolgen. Deswegen sind die Positionen oder Insertionsstellen von induzierbaren TAL-Boxen in einem nativen Promotor von besonderem wissenschaftlichem Interesse. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insertionsstelle für eine TAL-Box nicht willkürlich

gewählt werden kann, auch wenn einige Daten dafür sprechen (Kay *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2009a; Römer *et al.*, 2009b; Römer *et al.*, 2010). Die Insertion der TAL-Boxen sollte mit einem minimalen Abstand zu bekannten Promotorelementen erfolgen, damit eine starke Transkriptionsinitiation durch den TAL-Effektor stattfinden kann (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1: Modellhafte Darstellung der Interaktion des TAL-Effektors mit Wirtsfaktoren am Promotor.** Der TAL-Effektor erkennt und bindet seine TAL-Box. Über die AD interagiert der TAL-Effektor vermutlich mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie des Wirts, die direkt oder indirekt mit Promotorelementen und den Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Geninduktion auslösen.

#### 4.6 Die TAL-Effektor-vermittelte Geninduktion in verschiedenen Organismen

In den *in planta*-Studien dieser Arbeit wurden TAL-Effektoren genutzt, die keine Verkürzungen im N- oder C-Terminus aufwiesen. Neben der *repeat*-Region als DNA-Bindedomäne sind weitere Bereiche eines TAL-Effektors für dessen Virulenzfunktion wichtig. Dazu zählen einerseits die Kernlokalisierungssignale für den Kernimport (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Yang und Gabriel, 1995b), denn nur kernlokalisierte TAL-Effektoren können mit den nukleären DNA-Promotorsequenzen interagieren und dort als Transkriptionsaktivator wirken (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Yang und Gabriel, 1995b; Yang *et al.*, 2005). Andererseits ist die saure AD ebenso essentiell (Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). Nur mit der nativen AD oder der VP16-AD aus dem *Herpes Simplex* Virus (HSV) lösten die TAL-Effektoren AvrXa10 und AvrBs3 eine Resistenzreaktion aus (Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999).

Damit TAL-Effektoren in anderen Organismen analog die Transkription induzieren, war es sinnvoll die AD für die verschiedenen Organismen zu variieren. Die native AD bewirkte zwar in den Pflanzen eine gute Geninduktion, sie könnte jedoch in anderen Organismen nicht funktional sein. Die für die Transkriptionsinitiation benötigten Wirtsfaktoren variieren vermutlich zwischen den Spezies (Abbildung 4-1). Deswegen wurden in dieser Arbeit AD-



modifizierte AvrBs3- und auch Hax3-Effektoren erstellt und untersucht. Als ADs für die Substitution wurden die VP16-AD (77As) des HSV und die GAL4-AD aus *S. cerevisiae* genutzt. Für beide konnte gezeigt werden, dass Proteine mit diesen ADs die Transkription in menschlichen Zellen bzw. in *S. cerevisiae* initiieren (Campbell, 1984; Triezenberg *et al.*, 1988; Ma und Ptashne, 1987b).

Die TAL-Effektor-Derivate wurden zuerst in der Pflanze untersucht. Dabei wurde die durch TAL-Effektoren mit verschiedenen ADs ausgelöste Geninduktion im Vergleich zu früheren Arbeiten quantifiziert. Die Effektoren mit deletierter AD lösten dabei eine, im Gegensatz zum Wildtypprotein, nur noch auf ca. 20 % reduzierte Induktion des GUS-Reportergens aus, ähnlich wie die Substitution der nativen AD zur GAL4-AD aus Hefe. AvrBs3 und Hax3 mit der Substitution der nativen AD zur VP16-AD aktivierten ebenfalls auf ca. 30 % reduziert das GUS-Reportergen (Geißler *et al.*, 2011). Dabei besteht zwischen der nativen AvrBs3-AD und der VP16-AD keine As-Sequenzhomologie (Szurek *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte in vorangegangenen Experimenten für AvrBs3 $\Delta$ AD:VP16-AD gezeigt werden, dass diese Substitution der VP16-AD eine schwache HR in resistenten Paprikapflanzen induzierte (Szurek *et al.*, 2001). Ähnliche Experimente zeigten auch eine Komplementation mit AvrXa10 $\Delta$ AD:VP16-AD in Reis (Zhu *et al.*, 1999). Dort gelang die Komplementation auch nach der Substitution mit einer minimalen Version der VP16-AD (20 As) (Zhu *et al.*, 1999). Diese besteht nur noch aus der zweiten Subdomäne der VP16-AD, welche für die transkriptionelle Aktivierung erforderlich ist und eine autonome Transkriptionsaktivität hat (Sullivan *et al.*, 1998; Uesugi *et al.*, 1997).

Diese Substitution der AD in den TAL-Effektoren bestätigte, dass die AD essentiell ist und zeigte, dass eine Geninduktion nach der Deletion der AD auf ca. 20 % im Vergleich zum nativen TAL-Effektor zu schwach ist, um eine makroskopisch sichtbare Resistenzreaktion auszulösen (Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte mit der auf ca. 30 % reduzierten Induktion durch die TAL $\Delta$ AD:VP16-AD-Konstrukte eine bzw. eine abgeschwächte Resistenzreaktion beobachtet werden (Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999). Somit ist die AD entscheidend für die induzierte Transkriptmenge und sollte an den befallenen Wirt angepasst sein.

Die durch die TAL-Effektoren AvrBs3 und Hax3 induzierte Transkriptmenge in den menschlichen Zellen wurde auch stark durch die AD beeinflusst. Die spezifische Geninduktion mit der substituierten VP16-AD war hierbei am stärksten (Geißler *et al.*, 2011).

Jedoch war auch die native AD in der Lage die Transkription zu induzieren. Dabei war die Luciferaseaktivität im Vergleich zu der VP16-AD auf ca. 30 % reduziert (Geißler *et al.*, 2011). Der Austausch der nativen AD gegen die heterologe GAL4-AD verringerte die Luciferaseaktivität auf ca. 20 %. Eine ähnlich schwache Aktivität (ca. 10 %) konnte durch TAL-Effektoren mit deletierter AD nachgewiesen werden (Geißler *et al.*, 2011). Somit konnte die spezifische Geninduktion durch die *Xanthomonas* TAL-Effektoren auf das humane System übertragen werden. Dabei vermittelte die AD aus einem humanpathogenen Virus die beste Geninduktion in den menschlichen Zelllinien (Geißler *et al.*, 2011).

In parallelen Arbeiten konnte ebenfalls im humanen System gezeigt werden, dass TAL-Effektoren die Geninduktion mit einer für das humane System angepassten AD stimulierten (Miller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011). Dabei wurde die AD entweder substituiert (Zhang *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011) oder die VP16-AD an den C-Terminus des TAL-Effektors (trotz der nativen AD) fusioniert (Miller *et al.*, 2010). Die Fusion der VP16-AD an den vollständigen C-Terminus (278 Aa) des TAL-Effektors TALE13 wies dabei eine ähnlich hohe Reporter-geninduktion auf, wie zwei C-terminal verkürzte Varianten (133 Aa bzw. 95 Aa) ohne native AD mit Fusion der VP16-AD (Miller *et al.*, 2010). TALE13 bewirkte dabei eine ca. 70-fach stärkere Reporter-geninduktion als die Kontrolle mit TALE13 $\Delta$ repeats bzw. ganz ohne TAL-Effektor. Eine  $\Delta$ AD-Variante wurde nicht als Kontrolle einbezogen (Miller *et al.*, 2010). In ähnlichen Experimenten wiesen AvrBs4-Derivate mit verkürzten N- und C-terminalen Bereichen und der Fusion mit der VP16-AD ebenfalls eine etwa 70-fach gesteigerte Reporter-geninduktion im Vergleich zur Leer-Kontrolle auf (Mussolino *et al.*, 2011). Bei der Substitution der nativen NLS und nativen AD durch eine auf das Säugetiersystem angepasste NLS des großen Simian Virus (SV40) T-Antigen und der künstlichen AD VP64, konnte in einem Fluoreszenz-basierten Reportersystem analog die spezifische Geninduktion gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2011). Diese Daten zeigten, dass TAL-Effektoren in menschlichen Zellen ebenfalls Zielsequenzen erkennen und die Transkription induzieren, wobei eine an das humane System angepasste AD die Induktion deutlich steigert (Geißler *et al.*, 2011). Die AD kann dabei am TAL-Effektor wie ein Modul ausgetauscht werden, ohne dass die Erkennung beeinträchtigt wird.

Es konnte zudem in der vorliegenden sowie in parallelen Arbeiten auch die Induktion von Endogenen in den humanen Zellen durch TAL-Effektoren demonstriert werden (Geißler *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Die Induktion von unterschiedlichen Genen,

wie *NTF3*, *IFN1 $\alpha$*  *IFN1 $\beta$* , *PUMA*, *SOX2* oder *KLF4* wurde durch künstlich generierte TAL-Effektoren, die eine VP16-AD besaßen, ausgelöst. Dabei war eine zwei- bis zwanzigfach höhere Geninduktion im Vergleich zur Kontrolle ohne TAL-Effektor in der RT-PCR nachweisbar (Geißler *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Somit sind die TAL-Effektoren in der Lage auch in heterologen Organismen spezifisch chromosomale DNA-Zielsequenzen zu binden und die Transkription des 3'-gelegenen Endogens zu induzieren.

In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant die Transkriptionsinitiation auch in anderen eukaryotischen Organismen zu untersuchen. Dafür eignen besonders sich Modellorganismen wie Mücke (*Anopheles* spp.), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), Obstfliege (*Drosophila melanogaster*), Zebrafisch (*Danio rerio*) und Ratte (*Rattus* spp.). In den letzten Monaten wurden TAL-Effektor-Derivate, sogenannte TALEN (Kapitel 4.7), in einem Großteil dieser Organismen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass TALEN ihre jeweilige Zielsequenz in *C. elegans* (Wood *et al.*, 2011), *D. rerio* (Huang *et al.*, 2011; Sander *et al.*, 2011) und *Rattus* spp. (Tesson *et al.*, 2011) spezifisch erkennen.

In den Untersuchungen der verschiedenen eukaryotischen Organismen fehlte bis vor kurzem neben den *Anopheles* spp. und *D. melanogaster* noch ein weiterer klassischer Modellorganismus: die Bäckerhefe (*S. cerevisiae*).

In dieser Arbeit sollte die spezifische Geninduktion anhand eines Reportergens in *S. cerevisiae* quantifiziert werden. Dafür wurden verschiedene *lacZ*-Reporterkonstrukte mit der AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box und der Hax3-Box erstellt. Diese sollten durch die AvrBs3- und Hax3-Derivate induziert werden und die Expression des *lacZ* nachweisbar sein. Allerdings konnte trotz der Nutzung verschiedener Vektorsysteme, Promotorsequenzen bzw. Abstände zwischen der entsprechenden TAL-Box und ATG keine spezifisch gesteigerte Geninduktion durch AvrBs3 oder Hax3 gezeigt werden.

In vorangegangenen Y1H-Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass AvrBs3 fusioniert mit der GAL4-AD die AvrBs3<sub>UPA20</sub>-Box *in vivo* bindet (Kay *et al.*, 2009) und dass AvrBs3 die Transkription des *HIS3*-Reportergens initiiert (Hahn, 2009). Ausgehend von diesen Experimenten hätte die Induktion des *lacZ*-Reportergens theoretisch stattfinden sollen. Ein Unterschied zu den vorherigen Y1H-Studien besteht in der N-terminalen Fusion des TAL-Effektors mit GFP. Diese Fusion könnte sich in *S. cerevisiae* störend auf die Interaktion mit

der DNA auswirken, obwohl ein solcher Effekt in der Pflanze und den menschlichen Zelllinien nicht beobachtet werden konnte.

In den vorangegangenen Experimenten war an AvrBs3 und die AvrBs3-Derivate ein C-terminales FLAG-Epitop fusioniert, was die Erkennung und Geninduktion anscheinend nicht beeinträchtigte (Hahn, 2009). Die AvrBs3 $\Delta$ AD-Konstrukte waren in der Lage, ähnlich wie das native AvrBs3, die Induktion der Transkription zu induzieren (Hahn, 2009). Die Induktion durch einen TAL-Effektor scheint somit in *S. cerevisiae* nicht der C-terminalen AD abhängig zu sein. Das deutet auf eine andersartige Induktion der Transkription hin. In der Pflanze oder im tierischen System erfolgt die transkriptionelle Induktion nur mit einer AD (Geißler *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Szurek *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998). Die zuvor demonstrierte spezifische Induktion des Wachstumsreporters HIS3 lässt sich möglicherweise durch eine höhere Sensitivität erklären, d.h. dass bei diesem System bereits geringe Transkriptraten bzw. geringen Mengen des Proteins genügen, um ein Wachstum der Hefezellen zu gewährleisten (Hahn, 2009).

In dieser Arbeit konnte mit dem experimentellen Ansatz keine spezifische Geninduktion durch verschiedene TAL-Effektoren in *S. cerevisiae* gezeigt werden. Die Geninduktion durch TAL-Effektoren in *S. cerevisiae* scheint einem anderen Mechanismus als in der Pflanze oder tierischen Zellen zu unterliegen. Jedoch konnte die Erkennung und Bindung von Zielsequenzen durch TALEN (näheres im Kapitel 4.7) im Hefe-Stamm YPH500 gezeigt werden (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Einerseits wurde durch die TALEN die DNA-Sequenz von zwei *lacZ*-Genfragmenten wieder hergestellt, so dass *lacZ* exprimiert werden konnte (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Andererseits wurden durch designte TALEN auch Modifikationen im Hefe-Genom vorgenommen (Li *et al.*, 2011). Somit konnte erneut die Erkennung und Bindung der TAL-Effektoren bzw. von TALEN in Hefe demonstriert werden. Die spezifische Geninduktion in Hefe durch einen TAL-Effektor scheint jedoch von mehr als der Bindung abhängig zu sein. Dies deutet darauf hin, dass die Geninduktion in Hefe sehr komplex ist. Die transkriptionelle Induktion folgt in den Hefestämmen womöglich einem anderen Mechanismus als in andern Eukaryoten. Der generelle Mechanismus der Geninduktion in Hefe könnte von weiteren Faktoren abhängig sein oder weist mehr bzw. andere Komponenten für die Transkriptionsinitiation auf, die womöglich nicht in der Lage sind mit dem TAL-Effektor zu interagieren. Denkbar wäre auch, dass TAL-Effektoren als „fremd“ erkannt werden und dass diese Proteine zu schnell abgebaut werden, als die

Transkription stabil induziert werden kann. Möglicherweise muss die Position der TAL-Box in der Promotorsequenz eine bestimmte Stelle einnehmen, damit ein Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren erfolgen kann. In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, welche Promotorsequenzen oder Komponenten der Transkriptionsmaschinerie in Hefezellen für die transkriptionelle Induktion generell und besonders im Bezug auf TAL-Effektoren nötig sind.

### 4.7 Biotechnologische Aspekte von TAL-Effektoren

Künstlich generierte TAL-Effektoren stellen ein neues Werkzeug dar, um gezielt Gene zu aktivieren. Dadurch können genregulatorische Prozesse und Signalwege in einem Organismus von Interesse untersucht werden. Neben der Nutzung der TAL-Effektoren als künstliche Transkriptionsaktivatoren, kann die *TAL-repeat*-Region als programmierbare DNA-Bindedomäne mit anderen funktionellen Einheiten wie Endonukleasen kombiniert und in der Biotechnologie genutzt werden. Dadurch könnten sequenzspezifisch Veränderungen in der DNA vorgenommen und gezielte Genom-Modifikation generiert werden.

Gegenwärtig werden für solche Modifikationen Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) genutzt (Osakabe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Zink-Finger-Proteine sind DNA-bindende Proteine, enthalten Zink und greifen die DNA wie mit Fingern (Klug, 2010). Dabei können sich die Finger-Motive mehrfach im Protein wiederholen (Klug, 2010). Ein Zink-Finger besteht dabei aus zwei  $\beta$ -Faltblättern sowie einer  $\alpha$ -Helix und bindet an drei Bp. Dabei interagieren die As eins, drei und sechs der Helix mit drei Nukleotiden des kodierenden Strangs, sowie die As zwei der Helix mit einem Nukleotid vom nicht-kodierenden Strang (Isalan *et al.*, 1997; Isalan *et al.*, 1998). Zink-Finger-Proteine wurden eingesetzt um gezielt Gene zu aktivieren bzw. zu reprimieren oder nach der Fusion mit der FokI-Nuklease als ZFN zu modifizieren (Klug, 2010). ZFN wurden bereits für zielgerichtete Genommodifikationen in verschiedenen Organismen, darunter *A. thaliana*, *Drosophila* spp. und *C. elegans*, genutzt (Maeder *et al.*, 2008; Osakabe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Nach dem Spalten der DNA durch die ZFN entstehen Mutationen (InDels) durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder Sequenzaustausche durch die Reparatur über homologe Rekombination (HDR, *homology-directed repair*) (Puchta und Hohn, 2010). Die homologe Rekombination kann zur Markierung eines Gens über kleine, definierte Änderungen (Punktmutationen) oder zur Versetzung eines Gens in eine gezielte Genom-Region genutzt werden (Porteus, 2009).

Die DNA-Bindung ist bei den ZFN abhängig von der Spezifität der Nachbar-Zink-Finger. Nicht immer kann eine ZFN an ihre Zielsequenz binden und die Nuklease-Aktivität eingesetzt werden (Kim *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2008). Deswegen müssen multiple ZFNs generiert werden und hinsichtlich ihrer Bindung und Nuklease-Aktivität untersucht werden, bevor die ortsspezifische Modifikation der Endogene erfolgen kann (Porteus, 2009; Shukla *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2009).

Die Kombination von TAL-Effektoren mit der enzymatischen Domäne der FokI-Nuklease wurde in parallelen Arbeiten generiert und untersucht, wodurch sogenannte TALEN (TAL-Effektor-Endonukleasen) entstanden (Cermak *et al.*, 2011; Christian *et al.*, 2010; Hockemeyer *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Mussolino *et al.*, 2011). Für die Spaltung doppelsträngiger DNA muss in der ZFN bzw. TALEN ein FokI-Dimer vorliegen, wobei TALEN-Homodimere eine palindromische Sequenz und TALEN-Heterodimere unterschiedliche Erkennungssequenzen haben (Klug, 2010, Miller *et al.*, 2010).

Die Spaltung der DNA kann mit TALENs spezifischer und universeller erreicht werden als mit den ZFN, da die Erkennung und damit auch die DNA-Modifikation auf das Nukleotid genau erfolgt. Die Genommodifikation erfolgt analog zu den ZFN durch die Reparatur des NHEJ oder HDR (Urnov *et al.*, 2010). Die Spaltung der DNA ist dabei nur von dem Abstand (meist 15 bis 24 Bp) der TALN-Monomere abhängig (Cermak *et al.*, 2011; Christian *et al.*, 2010; Hockemeyer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011). Unterschiedliche DNA-Modifikationen durch TALEN wurden in verschiedenen Organismen gezeigt. Dazu gehört das pflanzliche System (Cermak *et al.*, 2011; Christian *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Mahfouz *et al.*, 2011), die humanen Zellen (Miller *et al.*, 2011; Cermak *et al.*, 2011; Hockemeyer *et al.*, 2011), aber auch der Zebrafisch (Huang *et al.*, 2011; Sander *et al.*, 2011), der Fadenwurm (Wood *et al.*, 2011) und die Ratte (Tesson *et al.*, 2011).

Die Nutzung von TALEN hat den entscheidenden Vorteil, dass sie anhand der Zielsequenz sehr spezifisch die DNA erkennen und binden. Zusätzlich sind sie programmierbar und leicht zu generieren. Damit können anhand spezieller Genommodifikation weitere Fragestellungen untersucht werden. Ein Beispiel ist die Herstellung und Charakterisierung von *knock out*-Mutanten (vgl. Tesson *et al.*, 2011). Auch ob bekannte, genombedingte Erbkrankheiten durch Stammzell-Modifikationen behandelt werden könnten, kann unter Anwendung dieser Strategie analysiert werden.

Der Einsatz von TAL-Effektoren oder deren Derivaten bietet sich an, denn die *repeat*-Region kann durch die *golden TAL technology* sehr schnell auf jede beliebige Sequenz angepasst werden (Geißler *et al.*, 2011). Auch die in anderen Laboren verfügbaren „Baustein-Sets“ können für die Generierung von TAL-Effektoren genutzt werden (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Morbitzer *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Somit stellen sie einen multifunktionalen Geneditierungsfaktor mit spezifischer programmierbarer DNA-Bindesequenz dar und können in der Zukunft eine breite Anwendung in biotechnologischen Fragestellungen finden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. und Martin, G. B. (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 601-611.
- Antony, G. (2010) Molecular basis of *avrXa7* mediated virulence in bacterial blight of rice. Kansas State University
- Antony, G., Yang, B. und White, F. F. (2009) The alternate major effector AvrXa 7 in bacterial blight of rice evades host resistance by targeting an alternate major host susceptibility gene. *Phytopathology*, 99.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H. W., Horn, M. und Rattei, T. (2009) Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS pathogens*, 5, e1000376.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. und Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415, 977-983.
- Bai, J., Choi, S. H., Ponciano, G., Leung, H. und Leach, J. E. (2000) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Molecular plant-microbe interactions*, 13, 1322-1329.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T. und Bonas, U. (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14, 629-638.
- Banito, A., Kpemoua, K. E. und Wydra, K. (2008) Expression of resistance and tolerance of cassava genotypes to bacterial blight determined by genotype x environment interactions. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection (JPDP)*, 4, 152-161.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. und Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, 145-152.
- Bittel, P. und Robatzek, S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 10, 335-341.
- Boch, J. und Bonas, U. (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 419-436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. und Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 1509-1512.
- Bogdanove, A. J., Schornack, S. und Lahaye, T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 13, 394-401.
- Boller, T. und He, S. Y. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324, 742-744.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J. und 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, 81-88.
- Bonas, U., Stall, R. E. und Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, 218, 127-136.



- Bradbury, J. F. (1984) Genus II. *Xanthomonas*. Bergey's manual of systematic bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore., 1, 199-210.
- Brunings, A. M. und Gabriel, D. W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol Plant Pathol, 4, 141-157.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2002) Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J, 21, 5313-5322.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2009) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS Microbiol Rev, 34, 107-133.
- Büttner, D. und He, S. Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. Plant Physiol, 150, 1656-1664.
- Campbell, M. E. M., J.W. Palfreyman, and C M. Preston (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trf122S-acting polypeptide responsible for the stimulation of immediate early transcription. MoL Biol. , 180, 1-19.
- Cao, Y., Ding, X., Cai, M., Zhao, J., Lin, Y., Li, X., Xu, C. und Wang, S. (2007) The expression pattern of a rice disease resistance gene *Xa3/Xa26* is differentially regulated by the genetic backgrounds and developmental stages that influence its function. Genetics, 177, 523.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. und Voytas, D. F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res, 39, e82.
- Chakrabarty, P. K., Duan, Y. P. und Gabriel, D. W. (1997) Cloning and characterization of a member of the *Xanthomonas avr/pth* gene family that evades all commercially utilized cotton *R* genes in the United States. Phytopathology, 87, 1160-1167.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B. und Frommer, W. B. (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature, 468, 527-532.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. und Voytas, D. F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics, 186, 757-761.
- Chu, Z., Fu, B., Yang, H., Xu, C., Li, Z., Sanchez, A., Park, Y. J., Bennetzen, J. L., Zhang, Q. und Wang, S. (2006) Targeting *xal3*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. Theor Appl Genet, 112, 455-461.
- Civán, P. C. P. und Švec, M. Š. M. (2009) Genome-wide analysis of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) TATA box and Y Patch promoter elements. Genome, 52, 294-297.
- Coll, N. S., Epple, P. und Dangl, J. L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. Cell Death Differ, 18, 1247-1256.
- Core, L. J. und Lis, J. T. (2008) Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. Science, 319, 1791-1792.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C. und Genin, S. (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Mol Microbiol, 53, 115-128.
- Cutino-Jimenez, A. M., Martins-Pinheiro, M., Lima, W. C., Martin-Tornet, A., Morales, O. G. und Menck, C. F. (2009) Evolutionary placement of Xanthomonadales based on conserved protein signature sequences. Mol Phylogenet Evol, 54, 524-534.
- Delannoy, E., Lyon, B. R., Marmey, P., Jalloul, A., Daniel, J. F., Montillet, J. L., Essenberg, M. und Nicole, M. (2005) Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Annu Rev Phytopathol, 43, 63-82.

- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S. und Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8024-8029.
- Dye, D. W., Lelliott, R. A., Buchanan, R. E. und Gibbons, N. E. (1959) The genus *Xanthomonas*. *Commonwealth Phytopathol. News*, 5, 1-3.
- Ebert, P. R., Ha, S. B. und An, G. (1987) Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5745-5749.
- Engler, C., Kandzia, R. und Marillonnet, S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 3, e3647.
- Espinosa, A. und Alfano, J. R. (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol.*, 6, 1027-1040.
- Eulgem, T. (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci*, 10, 71-78.
- Eulgem, T. und Somssich, I. E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 10, 366-371.
- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M. und Manceau, C. (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst Appl Microbiol*, 34, 156-165.
- Fritig, B., Heitz, T. und Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol*, 10, 16-22.
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J. E. und Tsuyumu, S. (2006) Suppression of Defense Response in Plants by the *avrBs3/pthA* Gene Family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 19, 342-349.
- Gabriel, D. W. (1997) Targeting of protein signals from *Xanthomonas* to the plant nucleus. *Trends in Plant Science (United Kingdom)*.
- Gamas, P., de Carvalho Niebel, F., Lescure, N. und Cullimore, J. V. (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9, 233-242.
- Geißler, R., Scholze, H., Hahn, S., Streubel, J., Bonas, U., Behrens, S. E. und Boch, J. (2011) Transcriptional Activators of Human Genes with Programmable DNA-Specificity. *PLoS One*, 6, e19509.
- Göhre, V. und Robatzek, S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 189-215.
- Greenberg, J. T. (1997) Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 525-545.
- Greenberg, J. T. und Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6, 201-211.
- Gu, K., Sangha, J. S., Li, Y. und Yin, Z. (2007) High-resolution genetic mapping of bacterial blight resistance gene *Xa10*. *Theor Appl Genet*, 116, 155-163.
- Gu, K., Tian, D., Qiu, C. und Yin, Z. (2009) Transcription activator-like type III effector *AvrXa27* depends on *OsTFIIAγ5* for the activation of *Xa27* transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Pathol*, 10, 829-835.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G. L., White, F. F. und Yin, Z. (2005) *R*-gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435, 1122-1125.

- Gürlebeck, D., Thieme, F. und Bonas, U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.*, 163, 233-255.
- Hahn, S. (2009) Analyse des molekularen Mechanismus der Aktivität des Typ-III-Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Hayward, A. C., Swings, J. G. und Civerolo, E. L. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. *Xanthomonas.*, 1-119.
- He, P., Shan, L. und Sheen, J. (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol*, 9, 1385-1396.
- Herbers, K., Conrads-Strauch, J. und Bonas, U. (1992) Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature*, 356, 172-174.
- Heuer, H., Yin, Y. N., Xue, Q. Y., Smalla, K. und Guo, J. H. (2007) Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl Environ Microbiol*, 73, 4379-4384.
- Hieb, A. R., Halsey, W. A., Betterton, M. D., Perkins, T. T., Kugel, J. F. und Goodrich, J. A. (2007) TFIIA changes the conformation of the DNA in TBP/TATA complexes and increases their kinetic stability. *Journal of molecular biology*, 372, 619-632.
- Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A. und Oldroyd, G. E. D. (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell Online*, 21, 545.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., Cost, G. J., Zhang, L., Santiago, Y. und Miller, J. C. (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*.
- Hoiby, T., Zhou, H., Mitsiou, D. J. und Stunnenberg, H. G. (2007) A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769, 429-436.
- Hopkins, C. M., White, F. F., Choi, S. H., Guo, A. und Leach, J. E. (1992) Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 451-459.
- Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S. und Zhang, B. (2011) Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 699-700.
- Ingle, R. A., Carstens, M. und Denby, K. J. (2006) PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays*, 28, 880-889.
- Isalan, M., Choo, Y. und Klug, A. (1997) Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 5617.
- Isalan, M., Klug, A. und Choo, Y. (1998) Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers. *Biochemistry*, 37, 12026-12033.
- Iyer, A. S. und McCouch, S. R. (2004) The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 1348-1354.
- Jiang, G. H., Xia, Z. H., Zhou, Y. L., Wan, J., Li, D. Y., Chen, R. S., Zhai, W. X. und Zhu, L. H. (2006) Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog TFIIA $\gamma$ 1. *Mol Genet Genomics*, 275, 354-366.
- Johnston, M. und Davis, R. W. (1984) Sequences that regulate the divergent *GALI-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* , 4, 1440-1448.

- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L. und Hirt, H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 415-424.
- Jones, J. D. und Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J. Y., Theisen, J. W. und Kadonaga, J. T. (2008) The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 253-259.
- Kay, S. (2008) Funktionelle Analyse des Typ-III-Effektors AvrBs3 und homologer Proteine aus *Xanthomonas campestris*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kay, S., Boch, J. und Bonas, U. (2005) Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 838-848.
- Kay, S. und Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol*, 12, 37-43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318, 648-651.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R. und Bonas, U. (2009) Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 $\Delta$ rep16. *Plant J*, 59, 859-871.
- Khan, J. A., Wang, Q., Sjölund, R. D., Schulz, A. und Thompson, G. A. (2007) An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143, 1576.
- Kim, J. S., Lee, H. J. und Carroll, D. (2010) Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nature methods*, 7, 91-91.
- Klug, A. (2010) The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Quarterly reviews of biophysics*, 43, 1-21.
- Knippers, R. (2006) *Molekulare Genetik*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knoop, V., Staskawicz, B. und Bonas, U. (1991) Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol*, 173, 7142-7150.
- Kornberg, R. D. (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12955-12961.
- Krishnamurthy, S. und Hampsey, M. (2009) Eukaryotic transcription initiation. *Curr Biol*, 19, R153-156.
- Lee, S., Hirt, H. und Lee, Y. (2001) Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J*, 26, 479-486.
- Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P. und Yang, B. (2010) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 39, 359-372.
- Li, T., Huang, S., Zhao, X., Wright, D. A., Carpenter, S., Spalding, M. H., Weeks, D. P. und Yang, B. (2011) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987b) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, 51, 113-119.
- Mackey, D., Holt, B. F., 3rd, Wiig, A. und Dangl, J. L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 743-754.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J. E., Winfrey, R. J. und Townsend, J. A. (2008)

- Rapid “Open-Source” Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification. *Molecular cell*, 31, 294-301.
- Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. und Zhu, J. K. (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2623-2628.
- Margaritis, T. und Holstege, F. C. (2008) Poised RNA polymerase II gives pause for thought. *Cell*, 133, 581-584.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U. (2002) The *xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15, 637-646.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D. und Rebar, E. J. (2010) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 29, 143-148.
- Morbitzer, R., Elsaesser, J., Hausner, J. und Lahaye, T. (2011) Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res*, 39, 5790-5799.
- Morbitzer, R., Römer, P., Boch, J. und Lahaye, T. (2010) Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 21617-21622.
- Moscou, M. J. und Bogdanove, A. J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 1501.
- Mudgett, M. B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 509-531.
- Müller, F., Demény, M. A. und Tora, L. (2007) New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14685.
- Murakami, M. T., Sforca, M. L., Neves, J. L., Paiva, J. H., Domingues, M. N., Pereira, A. L., Zeri, A. C. und Benedetti, C. E. (2010) The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. *Proteins*, 78, 3386-3395.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T. und Cathomen, T. (2011) A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*.
- Nürnberger, T. und Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, 6, 372-379.
- Osakabe, K., Osakabe, Y. und Toki, S. (2010) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 12034.
- Park, H. J., Han, S. W., Oh, C., Lee, S., Ra, D., Lee, S. H. und Heu, S. (2008) Avirulence gene diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolated in Korea. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1500-1509.
- Pedley, K. F. und Martin, G. B. (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 541-547.
- Porteus, M. H. (2009) Zinc fingers on target. *Nature*, 459, 21.
- Ptashne, M. und Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386, 569-577.
- Puchta, H. und Hohn, B. (2010) Breaking news: Plants mutate right on target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 11657.

- Rademaker, J. L., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. und de Bruijn, F. J. (2005) A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95, 1098-1111.
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Müller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., Winfrey, R. J., Sander, J. D., Fu, F. und Townsend, J. A. (2008) Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods*, 5, 374-375.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. und Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*, 318, 645-648.
- Römer, P., Recht, S. und Lahaye, T. (2009b) A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20526-20531.
- Römer, P., Recht, S., Strauss, T., Elsaesser, J., Schornack, S., Boch, J., Wang, S. und Lahaye, T. (2010) Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol*, 187, 1048-1057.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U. und Lahaye, T. (2009a) Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper *Bs3* alleles. *Plant Physiol*, 150, 1697-1712.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. und Bonas, U. (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9368-9373.
- Ryan, R. P., Koebnik, R., Szurek, B., Boureau, T., Bernal, A., Bogdanove, A. und Dow, J. M. (2009) Passing GO (gene ontology) in plant pathogen biology: a report from the *Xanthomonas* Genomics Conference. *Cell Microbiol*, 11, 1689-1696.
- Samudrala, R., Heffron, F. und McDermott, J. E. (2009) Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS pathogens*, 5, e1000375.
- Sander, J. D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R. T., Joung, J. K. und Yeh, J. R. J. (2011) Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 697-698.
- Scholze, H. (2008) Vergleichende funktionelle Analysen der *Xanthomonas*-Effektorproteine AvrBs3 und AvrHah1. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Scholze, H. und Boch, J. (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr Opin Microbiol*, 14, 47-53.
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Baulcombe, D., Ganai, M., Baker, B., Bonas, U. und Lahaye, T. (2004) The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J.*, 37, 46-60.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T. und Lahaye, T. (2006) Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.*, 163, 256-272.
- Schornack, S., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Jones, J. B. und Lahaye, T. (2008) Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol*, 179, 546-556.
- Schornack, S., Peter, K., Bonas, U. und Lahaye, T. (2005) Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4*- but not in pepper *Bs3*-mediated perception. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 1215-1225.
- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., Mitchell, J. C., Arnold, N. L., Gopalan, S. und Meng, X. (2009) Precise genome

- modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459, 437-441.
- Smale, S. T. und Kadonaga, J. T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, 72, 449-479.
- Stall, R. E., Jones, J. B. und Minsavage, G. V. (2009) Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 265-284.
- Streubel, J. (2011) Spezifitäten von *repeat*-Typen aus TAL-Effektoren. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Sugio, A., Yang, B., Zhu, T. und White, F. F. (2007) Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA $\gamma$ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10720-10725.
- Sullivan, S. M., Horn, P. J., Olson, V. A., Triezenberg, S. J., Koop, A. H., Niu, W. und Ebright, R. H. (1998) Mutational analysis of a transcriptional activation region of the VP16 protein of herpes simplex virus. *Nucleic Acids Research*, 26, 4487.
- Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R. H. und Gabriel, D. W. (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. *Phytopathology*, 81, 802-809.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. und Van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, 26, 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. und Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol*, 46, 13-23.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B. J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A. I., Meng, X. und Zhang, L. (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 695-696.
- Townsend, J. A., Wright, D. A., Winfrey, R. J., Fu, F., Maeder, M. L., Joung, J. K. und Voytas, D. F. (2009) High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases. *Nature*, 459, 442.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. und McKnight, S. L. (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes & development*, 2, 718.
- Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A. J. und Verdine, G. L. (1997) Induced helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science*, 277, 1310.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. und Gregory, P. D. (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11, 636-646.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. und Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, 87, 1307-1316.
- Van der Hoorn, R. A. L. und Kamoun, S. (2008) From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell Online*, 20, 2009.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. und Schell, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252, 169-170.
- Vauterin, L., Rademaker, J. und Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90, 677-682.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni, N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E. und Civerolo, E. L. (1990) Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 312.

- Weber, E., Gruetzner, R., Werner, S., Engler, C. und Marillonnet, S. (2011) Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning. *PLoS One*, 6, e19722.
- White, F. F. und Yang, B. (2009) Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiol*, 150, 1677-1686.
- Wood, A. J., Lo, T. W., Zeitler, B., Pickle, C. S., Ralston, E. J., Lee, A. H., Amora, R., Miller, J. C., Leung, E. und Meng, X. (2011) Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science (New York, NY)*.
- Wu, X. M., Li, Y. R., Zou, L. F. und Chen, G. Y. (2007) Gene-for-gene relationships between rice and diverse *avrBs3/pthA* avirulence genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, 56, 26-34.
- Yamamoto, Y., Ichida, H., Matsui, M., Obokata, J., Sakurai, T., Satou, M., Seki, M., Shinozaki, K. und Abe, T. (2007a) Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC genomics*, 8, 67.
- Yamamoto, Y. Y., Ichida, H., Abe, T., Suzuki, Y., Sugano, S. und Obokata, J. (2007b) Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, 6219.
- Yang, B., Sugio, A. und White, F. F. (2005) Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 142-149.
- Yang, B., Sugio, A. und White, F. F. (2006) Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10503-10508.
- Yang, B. und White, F. F. (2004) Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 17, 1192-1200.
- Yang, B., Zhu, W., Johnson, L. B. und White, F. F. (2000) The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9807-9812.
- Yang, Y., De Feyter, R. und Gabriel, D. W. (1994) Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 7, 345-355.
- Yang, Y. und Gabriel, D. W. (1995a) Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *Journal of bacteriology*, 177, 4963.
- Yang, Y. und Gabriel, D. W. (1995b) *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8, 627-631.
- Yocum, R. R., Hanley, S., West, R. W., Jr., und Ptashne, M. (1984) Use of *lacZ* fusions to delimit regulatory elements of inducible divergent *GAL7-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1985-1998.
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., Feng, J., Verdier, V. und Szurek, B. (2011) Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice Nodulin-3 *Os11N3* gene. *Mol Plant Microbe Interact.*, 24, 1102-1113.
- Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C. und Wang, S. (2009) Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor in race-specific bacterial resistance conferred by a recessive *R* gene *xa13* in rice. *Plant and Cell Physiology*, 50, 947.



- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G. M. und Arlotta, P. (2011) Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 29, 149-153.
- Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C. J., Dobbs, D. und Peterson, T. (2009) High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 12028.
- Zhang, X., Dai, Y., Xiong, Y., DeFraia, C., Li, J., Dong, X. und Mou, Z. (2007) Overexpression of Arabidopsis MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant J*, 52, 1066-1079.
- Zhao, Y., Damicone, J. P., Demezas, D. H. und Bender, C. L. (2000) Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Plant disease*, 84, 1008-1014.
- Zhou, J. M. und Chai, J. (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol*, 11, 179-185.
- Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J. M., Johnson, L. B. und White, F. F. (1998) AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 11, 824-832.
- Zhu, W., Yang, B., Wills, N., Johnson, L. B. und White, F. F. (1999) The C terminus of AvrXa10 can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the herpes simplex virus. *The Plant Cell Online*, 11, 1665.

## 6 Anhang

AAAAC TGGTAAAATGGTAAGAAAAAATATATAAAAAAATAGCCTTATTA AAAATTTATATCTCCTATTTCTCTATCCAAACTACACGGATGAAG  
 CTTAT **TGTTATTTCATCCACCCTTTTCT** CAATTCTGTCCTATTTCTTGTGCATGAACTTCTCCATCTTGTAAATCGGATAAATCATACCCAAAT  
 TTTTCTTTCTGAAAACATATATACCCGAACATTAATTACTATCGTCCTTTCTCCTAATTTTGTAAAGAACATGTTTGTGTTTGTAGTACT  
 GAAAAAGGATGGAGATACTTGCTAGATCCTATGAACCTTTTCTCTCTAGGACAAATCAGTAACCAACAATAACTTAGCAAATTAAGCAGGACA  
 GCTAATACATAAAAATGTGGATATCAAACATGCACGTCACCTTCTTTTTTCCGTCACGTGTTTTATAAATTTCT **TCACATACTCACACTCTCTA**  
**TAA** GACCTCCAATCATTTGTGAAACCATACTATATATAACCTCTTCTCTTGACCAATTTACTTATACCTTTTACAATTTGTTTATATATTTTACG  
 TATCTATCTTTGTTCCATG (At1G56650)\*

**Abbildung 6-1: Ausschnitt der intergenischen Sequenz stromaufwärts von At1G56650 aus *A.thaliana*.** \* UTR ist kursiv dargestellt, die TATA-Box ist durch Unterstreichen hervorgehoben. Zwei Hax2-Boxen (gelb hinterlegt) mit je sieben Fehlpaarungen befinden sich stromaufwärts von At1G56650. Dabei befindet sich Box 1 -481 bis -458 Bp und die Box2 -130 bis -107 Bp vor dem ATG.

At1G56650 Hax2	AAAAC TGGTAAAATGGTAAGAAAAAATATATAAAAAAATAGCCTTATTA AAAATTTATAT	2340
At1G56650 Hax2	CTCCTATTTCTCTATCCAAACTACACGGATGAAGCTTAT <b>TGTTATTTCATCCACCCTTTT</b>	2400
	-----TGTTATTCTCACACTCTCCTT	21
	***** ** ** *	
At1G56650 Hax2	<b>CT</b> CAATTCTGTCCTATTTCTTGTGCATGAACTTCTCCATCTTGTAAATCGGATAAATCAT	2460
	AT-----	23
	*	
At1G56650 Hax2	ACCCAAATTTTTCTTTCTGAAAACATATATACCCGAACATTAATTACTATCGTCCTTTC	2520
At1G56650 Hax2	TCCTAATTTTGTAAAGAACATGTTTGTGTTTGTAGTACTGAAAAAGGATGGAGATAC	2580
At1G56650 Hax2	TTGCTAGATCCTATGAACCTTTTCTCTCTAGGACAAATCAGTAACCAACAATAACTTAG	2640
At1G56650 Hax2	CAAATTAAGCAGCAGCTAATACATAAAAATGTGGATATCAAACATGCACGTCACCTTCT	2700
At1G56650 Hax2	TTTTTCCGTCACGTGTTTTATAAATTTCT <b>TCACATACTCACACTCTCTATAA</b> GACCTCC	2760
	-----TGTTATTCTCACACTCTCCTTAT-----	
	* ** ***** **	
At1G56650 Hax2	AATCATTGTGAAACCATACTATATATAACCTCTTCTTGACCAATTTACTTATACCTTT	2820
At1G56650 Hax2	TACAATTTGTTTATATATTTTACGTATCTATCTTTGTTCCATG	2863*

**Abbildung 6-2: Sequenzvergleich von At1G56650 mit der Hax2-Box.** \* Im Sequenzvergleich konnten zwei Hax2-Boxen (gelb hinterlegt) mit je sieben Fehlpaarungen (rot) identifiziert werden. Die Boxen befinden sich -481 bis -458 Bp und -130 bis -107 Bp stromaufwärts des ATG von At1G56650. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm ClustalW Version 2.0.12 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) und den Standardeinstellungen durchgeführt.

ATACAATTTATTTTTAAATCGAATCT**ATGG**CATCTTCTTCTTCTTCTTCTGCAAGTAATTCAAAGTATTATCCTCGATGGAAAGT  
 ACGTTGTTTTCTAAGTTTCAGAGGTGAAGACACTCGAAAAACATTTACAGGTCACTTATACGAAGGTTTGAGAAATAGAGGA  
 ATAAACACATTTCAAGATGATAAAAGACTAGAGCATGGAGATTCAATCCAAAAGAACCTTGAGAGCTATAGAAGATTCTCA  
 AGTTGCACCTTATCATTCTCAAAGAAATATGCTACATCTAGGTGGTCTTGAATGAACTAGTGAAGATCATGGAATGCAAAG  
 AGGAAGAAAATGGACA**AA**CAGTCATACCGATCTTTTATA**AT**GTGGATCCATCAC**AT**GTTCGATACCAA**ACT**GAAAGCTTTGGA  
 GCAGCATTTGCCAAACACGAATCAAAGTATAAGGAT**GAT**GTGGAGGGATGCAGAAGGTGCAAAGATGGAGA**ACT**GCCTTAA**C**  
 TGCTGCCGCAAATCTAAAAGGATATGATATCCGTAACGG**GTT**AGTTGAATACACATA**AA**TACTTTTTAA**TGTTTTACTGTTAA**  
**AAAGGCATAGTCCAATCAATTTAATTAGAGAAGATACATAAAAGTCCAAAA**ACT**ATTCAAGTTTTGCA**ACT**CCATACTTGA**  
**AACTATAGAGTATTGTTATTACCTGA**ACT**ATTCTATTCTATTAA**TACCCT**GTGATTTATA**CAATATATATAGAGTAT****  
**ATGAAATACTTGTTGGTATTGGACTTTCTTACATTGGCCAAATCAATTTTCTTCTTTATGTAGGATTGAATCAGAGAATATT**  
**CAGCAGATCGTAGATTGCATCTCTTCCAAATTTTGTACGA**AT**GTCTATTCTTTATCTTTTTGCAAGATATTGTGGGAATAAA**  
 TGCTCACTTAGAGAAACTAAAATCGAACTTCAAATAGAAATCAAT**GAT**GTTCGGATTTAGGGATCTGGGAATAGCGGGAG  
 TCGTAAAACAAGAAATAGCAAAGCCATTTTGGATACTCTATCTTATCAATTTGAAGCTTCTTGTTTTCTGCTGATGTTAAA  
 GAATTTGCAAAAAGAAATAAACTGCATTTCTTACAAAATATTCTTCTCTGAACTGTTAAGGAAAAAAATGATTACGTCTA  
 CAACAAGTATGATGGAAAGGTGATGATTTCAAACAGACTTTGTTCTTGAAGGTTCTAATTTGTGCTTGATGATATAGATCATG  
 GTGATCAGATGGAGTATTAGCAGGTGATATTTGTTGTTTGGTAAATGGCAGCAGAGTATTGTAACAATAGAAACAACAT  
 TTGATAGAGAAAGATGATCGATATACGAAGTGTCTACACTCCCTGATCATGAAGCTATGCAATTATCAATATGCATGCTTT  
 TAAAAAGAAGTTCCAAATGAGGATTTAAGGAGTTGGCGTTAGAGATAGTAAATCACGCTAAAGGCCCTCCCTTTAGCCCTCA  
 AGGTGTTGGGCTGTTTTATTGCATAAAAAAAATCTCTTT**AT**GGAAAATAACAGTAGAGCAAATAAAGAAAGACTCTAATTC  
 GAAATTTGTTGAACA**ACT**CAAATAAGTTATGATGGTTGGAGTCCGAAGAGCAGGAAATATTTTAGATATAGCATGTTTCTT  
 CCGCGGAGAGAAAAGAAAAGAGGTCATGCAAATTTAAGAGTTGTGACTTTGGAGCTGAATACGGATTGGATGTTCTGATTA  
 ATAAATCTTGTGTTTCATATCTGAAAATGACAGGATGAAATG**CAATG**ATGATTTGATTAGAGATATGGGTAGATATGTTGGTAA  
 ATGCAAAAAGCTTCAGAAAAAACGTAGCAGAATATGGGATGTTGAAGATTTCAAAGAAGTGATGATAGACTATACGGTAA**AGTAA**  
**GCTTAA**CAAT**GCAATGATATTTAATTTCTAATTTTTATATTCCAAGGAACTTATAGGCTAATCAATACAGTTTATGAATAAT**  
**GACTCATTGATCTTTATACCAGGGGACCATGACAGTGAAGCAATCTGGTTAGTTGCTTGAAGAAGTACGTTTTAATAAGG**  
 AGGCAATGAAAAAAATGAAAAGGCTTAGGATATTACACATATTTGATGGTTTTGTCAAATCTTCTCTCGCCCTCCCTCTCC  
 AATCCAATGATTGAGAAAGAAGATGATTCCACGACTTAGTCGTAGATCACCATGATGACTCTATTGAGTACCTGTCCAA  
 TA**ACT**TGCGTTGGTTAGTCTGGAATC**ACT**ATTCTTGGAAAGT**CA**TTGCCAGAAAATTTAAACCAGAAAAGCTTGTTCATCTTG  
 AACTCGTTGGAGTTGCTTCTCATTATTTATGGAAGAAAACAGAGTAA**CAAT**TATTATTACTTT**ACTTACTCCCTCC**CT**CAGGAG**  
**CTTCA**CCCCT**TTTTGCTCTCTTATTACTCGAACCCACA**CC**TTTTGGGTTGGAAGT**GAGGGTGCTCAACTCCCTCTTGT**CA**  
 TTTTGGTCTGACACAAAGATCATTATCTTCTCTATTTGAATAACAGCATTGGCGTCTCTACGAAAGCTAGATCTCAGCT  
 TATCTAAAGTCTGGTGCAAACACCAGATTTACGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTGAATCTGGAGTACTGTAGTAAGCTT  
 GAAGAGGTTCACTATCCCTAGCATATGCGAAAACTCATGAGTTAAATTTGAGTTGGTGACAAAGCTTAGGAGATTCC  
 ATATATTAACATGGAACTCTTGAATCTCTGGATCTACAATATTGCTATGGTATAATGGTGTTCAGAAAATCATCGGAACGA  
 TGAAGCCGGAGTTAATGATTCTCTCAGCAAACACTATGATAACTGA**ACT**ACCATCATCTCTCAGTACCCA**ACT**CATCTCACA  
 GAGCTAGATTGGAGTGGCATGGA**AA**CCCTTGAAGCTTCCAAGCAGATTGTCAAGTTGAAAAGATTGGTTCACCATCAGGGAA  
 GTCGTACTGCTTAAACGCTTAAAAGCTTGCCTGAAGAGATTGGTGATTAGAAA**ACT**TGGAGGAACTTGATGCTTCGCGTACTC  
 TAATTTACAGCTCCATCTCCATTGTCGGCTTGAACAAGCTTAAATCCTTGAAGTTAATGAAACGAAACACATTAACAGAT  
 GATGTGTGCTTTGTTTCTCCTGTAATAACGGTTACTCTCATTGGAAATTTCTGGAGCTCGGTTCTCCAATTT**CGAAGA**  
 TGGAGAATTCGGAGATATTGGATGTTATCCTCTTGAAGAGTTACGTCTCGAGGGAGATAATTTCAATCATT**GGCC**TC  
 AAAGCATAGCCAACTTGGTGC**ACT**TCGATCTTATACATAAAAGATTGCAGGAGTCTTACAAGTCTGCCAGAAATTTCCACCG  
 CAATTAGATACAATTTGCAGATTGGAGCAATGATTTGATCTGTAAGTCACTGTTTCTAAATATCTCATCATTTCAACATAA  
 CATCTCTGCTT**CGAT**TGCTTAAAGAGTGTACGAGTTTGGGAGTAGTATCCCAATCTGGTTCCACCATCAGGGAA  
 CAGATACAAGTGTTCAGTCAATTTGCCTGAAA**ACT**GGTATGATCAGATAACTTCTTGGGATTGCTGTATGTTACTATGGC  
 AATTTAACTGAGAACACAGCTGAATTGATTATGAGTTCTGCAGGGATGCCATGATCACCTGGAACTTTTGTATCGAATCA  
 TTCAGAATGATACATATATTAGGATTCATTTTTCTTGGTACCTTTTGTGGCTTATGGGATACATCTAACGCCAATGGTAAAA  
 CACCAAATGACTATAAGCACATTATGTTATCTTTCTCAAGAAATTGAAGGAGTGTGGAGTTCGTTTGTCTATGAAGATGAA  
 TCTGTGCTTGAGACCACAATGATGA**ACT**TACCATTGGGGTAAGGAGGATCAGATACGACGACGACGATAGTGAACATTATGA  
 GGAGGCTGGTTGTTCTCTTCTAAGAAAACAAAGATCA**TAA**TATAGGTATATAAACTTGTGATCACTTGCTGTTGTTATTAAT  
 AATTCATTT**CGAT**GCTCTATGTTGGTTGTTAAATATCTCTCATGTTATGACAGGGAGCAGAGGGCGGAGCCAGAAATTTCAATAA  
 GAGGGCTCAAATCTGTAGAAATAGATAGCTGAAGGGTTT**GACAT**CTTACTATATATATACATATAAACTTATTTAA**CCAT**  
 GTATAAATAATATAATTTTCTGTCGAATGGGGTTTGGATGA**ACCCT**CTTATGAAGGTACAATGAAGCATCAATCAAAGTGTG  
 AGACAGTGGAGGAACGTTCAATATAGCAAACATAAAATCATATTTGATGTTATAGTTATAGTTAGCATCATTGTA**AA**TTT  
 TGTACAAATGTTT**CGT**CTTTATTAATTCATTTTGTACATTGTA**AA**TTTGTATAATAACATCTGTATTGTAATAATTATAAG  
 TGTATATGATGAATATATATGATATATATACTTTTCTCTG<sup>\*,\*\*</sup>

**Abbildung 6-3: Sequenz von Bs4.**

\* Die UTR ist kursiv dargestellt und Intron-Sequenzen sind gelb hinterlegt. Genutzte Sequenzabschnitte für Hax3-Box-GUS-Reporterkonstrukte sind fettgedruckt und unterstrichen. Die Oligonukleotide für sq RT-PCR sind unterstrichen, das Amplifikationsprodukt ist grau hinterlegt.

\*\* Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY438027.1>:

*Lycopersicon esculentum* bacterial spot disease resistance protein 4 (Bs4) gene, Bs4-MM allele, complete cds; GenBank: AY438027.1; CDS (26..537,812..1901,2015..2368,2540..4024)

# Anhang

Bs4-L.e.	ATACAATTTATTTTAAATCGAATCTATGGCATCTTCTTCTTCTTCTTCTGCAAGTAATTC	60
Bs4-L.p.	-----ATGGCAGCTTCTTCTTCTT-----CTGCGAGTAATTC	32
	*****	
Bs4-L.e.	AAAGTATTATCCTCGATGGAAGTACGTTGTTTTCTAAGTTTCAGAGGTGAAGACTCTCG	120
Bs4-L.p.	AAAGTATTATCCTAGATGGAAGTACGTTGTTGTTTTCTAAGTTTCAGAGGTGAAGACTCTCG	92
	*****	
Bs4-L.e.	AAAAACATTTACAGGTCACCTTATACGAAGGTTTGAGAAATAGAGGAATAAACACATTCA	180
Bs4-L.p.	AAAAACATTTACAGGTCACCTTATACGAAGGTTTGAGAAATAGAGGAATAAACACATTCA	152
	*****	
Bs4-L.e.	AGATGATAAAAAGACTAGAGCATGGAGATTCAATTCCAAAAGAACTCTTGAGAGCTATAGA	240
Bs4-L.p.	AGATGATAAAAAGACTAGAGCATGGAGATTCAATTCCAAAAGAACTCTTGAGAGCTATAGA	212
	*****	
Bs4-L.e.	AGATTCTCAAGTTGCACTTATCATTCTTCTCAAAGAATTATGCTACATCTAGGTGGTGCTT	300
Bs4-L.p.	AGATTCTCAAGTTGCACTTATCATTCTTCTCAAAGAATTATGCTACATCTAGGTGGTGCTT	272
	*****	
Bs4-L.e.	GAATGAAGTAGTGAAGATCATGGAATGCAAAGAGGAAGAAAATGGACAAACAGTCATACC	360
Bs4-L.p.	GAATGAAGTAGTGAAGATCATGGAATGCAAAGAGGAAGAAAATGGACAAACAGTCATACC	332
	*****	
Bs4-L.e.	GATCTTTTATAATGTGGATCCATCACATGTTTCGATACCAAACGAAAGCTTTGGAGCAGC	420
Bs4-L.p.	GATCTTTTATAATGTGGATCCATCACATGTTTCGATACCAAACGAAAGCTTTGGAGCAGC	392
	*****	
Bs4-L.e.	ATTTGCCAAACACGAATCAAAGTATAAGGATGATGTTGAGGGGATGCAGAAGGTGCAAAG	480
Bs4-L.p.	ATTTACCCAACACGAATCAAAGTATAAGGATGATGTTGAGGGGATGCAGAAGGTGCAAAG	452
	**** *	
Bs4-L.e.	ATGGAGAAGTGCCTAAGTCTGCTGCCGCAAATCTAAAAGGATATGATATCCGTAAACGGGTT	540
Bs4-L.p.	ATGGAGAAGTGCCTAAGTCTGCTGCCGCAAATCTAAAAGGATATGATATCCGTAAACGGGTT	512
	*****	
Bs4-L.e.	AGTTGAATACACATAATTACTTTTAAATGTTTTACTGTTAAAAAGGCATAGTCCAATCAA	600
Bs4-L.p.	AGTTGAATACACATAATTACTTTTAAATGTTTTACTGTTAAAAAGGCATAGTCTTATCAA	572
	*****	
Bs4-L.e.	TTTAATTAGAGAAGATACATAAAAAGTCCAAAAAATATTCAAGTTTGGCAACTTCCATAC	660
Bs4-L.p.	TTTAATTAGAGAAGATACATAAAAAGTCCAAAAAATATTCAAGTTTGGCAACTTCCATAC	632
	*****	
Bs4-L.e.	TTGAAAACATATAGAGTATTGTTATTACCTGAACTATTCTATTTCCTATTTAATACCTGCT	720
Bs4-L.p.	TTGAAAACATATAGAGTATTGTTATTACCTGAACTATACTATTTCCTGTTTAAATACCTGCT	692
	*****	
Bs4-L.e.	TGATTATTAACAATATATATAGAGTATATGAAATACTTGTGGTATTGACTTTCTTACA	780
Bs4-L.p.	TGATTATTAACAATATATATAGAGTATATGAAATACTTGTGGTATTGACTTTCTTACA	752
	*****	
Bs4-L.e.	TTGTCCACAATCAATTTTCTTCTTTATGTAGGATTGAATCAGAGAATATTCAGCAGATCG	840
Bs4-L.p.	TTGTCCACAATCAATTTTCTTCTTTATGTAGGATTGAATCAGAGAATATTCAGCAGATCA	812
	*****	
Bs4-L.e.	TAGATTGCATCTTCCAAATTTGTACGAA	900
Bs4-L.p.	TAGATTGCATCTTCCAAATTTGTACGAA	872
	*****	
Bs4-L.e.	TTGTGGGAATAAATGCTCACTTAGAGAACTAAAATCGAACTTCAAATAGAAATCAATG	960
Bs4-L.p.	TTGTGGGAATAAATGCTCACTTAGAGAACTAAAATCGAACTTCAAATAGAAATCAATG	932
	*****	
Bs4-L.e.	ATGTTCCGATTTTAGGGATCTGGGAATAGGCGGAGTCGGTAAAACAAGAATAGCAAAG	1020
Bs4-L.p.	ATGTTAGGATTTTAGGGATTTGGGAATAGGCGGAGTCGGTAAAACAAGAATAGCAAAG	992
	*****	

# Anhang

---

Bs4-L.e.	CCATTTTTGATACTCTATCTTATCAATTTGAAGCTTCTTGTTTTCTTGCTGATGTTAAAG	1080
Bs4-L.p.	CCATTTTTGATACTATATCTTATCAATTTGAAGCTTCTTGTTTTCTTGCTGATGTTAAAG *****	1052
Bs4-L.e.	AATTTGCAAAAAGAATAAACTGCATTCTTTACAAAATATTCTTCTCTCTGAACTGTTAA	1140
Bs4-L.p.	AATTTGCAAAAAGAATAAACTGCATTCTTTACAAAATATTCTTCTCTCTGAACTGTTAA *****	1112
Bs4-L.e.	GGAAAAAAATGATTACGTCTACAACAAGTATGATGGAAAGTGTATGATTCCAAACAGAC	1200
Bs4-L.p.	GGAAAAAAATGATTACGTCTACAACAAGTACGATGGAAAGTGTATGATTCCGAACAGAC *****	1172
Bs4-L.e.	TTTGTTCTTTGAAGGTTCTAATTGTGCTTGATGATATAGATCATGGTGATCAGATGGAGT	1260
Bs4-L.p.	TTTGTTCTTTGAAGGTGCTAATTGTGCTTGATGATATAGATCATGGTGATCAGATGGAGT *****	1232
Bs4-L.e.	ATTTAGCAGGTGATATTTGTTGGTTTGGTAATGGCAGCAGAGTTATTGTAACAACTAGAA	1320
Bs4-L.p.	ATTTAGCAGGTGATGTTTGGTTTGGTAATGGCAGCAGAGTTATTGTAACAACTAGAA *****	1292
Bs4-L.e.	ACAAACATTTGATAGAGAAAGATGATGCGATATACGAAGTGTCTACACTGCCTGATCATG	1380
Bs4-L.p.	ACAAACATTTGATAGAGAAAGATGATGCGATATACGAAGTGTCTACACTGCCTGATCATG *****	1352
Bs4-L.e.	AAGCTATGCAATTATTCAATATGCATGCTTTTAAAAAAGAAGTCCAAATGAGGATTTTA	1440
Bs4-L.p.	AAGCTATGCAATTATTCAATATGCATGCTTTTAAAAAAGAAGTCCAAATGAGGATTTTA *****	1412
Bs4-L.e.	AGGAGTTGGCGTTAGAGATAGTAAATCACGCTAAAGGCCTCCCTTTAGCCCTCAAGGTGT	1500
Bs4-L.p.	AGGAGTTGGCGTTAGAGATAGTAAATCACGCTAAAGGCCTCCCTTTAGCCCTCAAGGTGT *****	1472
Bs4-L.e.	GGGGCTGTTTATTGCATAAAAAAATCTCTCTTTATGGAAAATAACAGTAGAGCAAATAA	1560
Bs4-L.p.	GGGGCTGTTTATTGCATAAAAAAATCACTCTTTATGGAAAATAACAGTAGAGCAAATAA *****	1532
Bs4-L.e.	AGAAAGACTCTAATTCAGAAATGTTGAACAACTCAAATAAGTTATGATGGGTTGGAGT	1620
Bs4-L.p.	AGAAAGACTCTAATTCAGAAATGTTGAACAACTCAAATAAGTTATGATGGGTTGGAGT *****	1592
Bs4-L.e.	CCGAAGAGCAGGAAATATTTTTAGATATAGCATGTTTCTTCCGCGGAGAGAAAAGAAAAG	1680
Bs4-L.p.	CCGAAGAGCAGGAAATATTTTTAGATATAGCATGTTTCTTCCGCGGAGAGAAAAGAAAAG *****	1652
Bs4-L.e.	AGGTCATGCAAATCTTAAGAGTTGTGACTTTGGAGCTGAATACGGATTGGATGTTCTGA	1740
Bs4-L.p.	AAGTCATGCAAATCTTAAGAGTTGTGACTTTGGAGCTGAATACGGATTGGATGTTCTGA * ***** *	1712
Bs4-L.e.	TTAATAAATCTCTTGTTTCATATCTGAAAATGACAGGATTGAAATGCATGATTTGATTA	1800
Bs4-L.p.	TTAATAAATCTCTTGTTTCATATCTGAAAATGATAGGATTGAAATGCATGATTTGATTA *****	1772
Bs4-L.e.	GAGATATGGGTAGATATGTGGTGAAAATGCAAAAAGCTTCAGAAAAACGTAGCAGAATAT	1860
Bs4-L.p.	GAGATATGGGTAGATATGTGGTGAAAATGCAATAAGCTTCAGAAAAACGTAGCAGAATAT *****	1832
Bs4-L.e.	GGGATGTTGAAGATTTCAAAGAAGTATGATAGACTATACGGTAAGTAAGCTTAACAATG	1920
Bs4-L.p.	GGGATGTTGAAGATTTCAAAGAAGTATGATAGACTATACAGTAAGTAAGT----- *****	1883
Bs4-L.e.	CAATGATATTTAATTTCTAATTTTTATATTCCAAGGAACCTTATAGGCTAATCAATACAGT	1980
Bs4-L.p.	-AATGATATTTAATTTCTAATTTTTATATTCCAAGGAATGTATAGACTAATTAATACAGT *****	1942
Bs4-L.e.	TTATGAATAATTGACTCATTGATCTTTATACCAGGGGACCATGACAGTGAAGCAATCTG	2040
Bs4-L.p.	TTATGAATAATTGACTCATTGATCTTTATACCAGGGGACCATGACAGTGAAGCAATCTG *****	2002

# Anhang

---

Bs4-L.e.	GTTTAGTTGCTTTGAAGAAGTACGTTTTAATAAGGAGGCAATGAAAAAATGAAAAGGCT	2100
Bs4-L.p.	GTTTAGTTGCTTTGAAGAAGTATGTTTTAATAAGGAGGCAATGAAAAAATGAAAAGGCT *****	2062
Bs4-L.e.	TAGGATATTACACATATTTGATGGTTTTGTCAAATTTCTTCTCTCGCCTCCCTCTTCCAA	2160
Bs4-L.p.	TAGGATATTACACATATTTGATGGTTTTGTCAAATTTCTTCTCTCGCCTCCCTCTTCCAA *****	2122
Bs4-L.e.	TTCCAATGATTCAGAAGAAGAAGATGATTCCTACGACTTAGTCGTAGATCACCATGATGA	2220
Bs4-L.p.	TTCCAATGATTCAGAAGAAGAAGATGTTTCTACGACTTAGTCGTAGATCACCATGATGA *****	2182
Bs4-L.e.	CTCTATTGAGTACCTGTCCAATAACTTGCGTTGGTTAGTCTGGAATCACTATTCTTGAA	2280
Bs4-L.p.	CTCTATTGAGTACCTGTCCAATAACTTGCGTTGGTTAGTCTGGAATCACTATTCTTGAA *****	2242
Bs4-L.e.	GTCATTGCCAGAAAATTTTAAACCAGAAAAGCTTGTTTCATCTTGAACCTCCGTTGGAGTTC	2340
Bs4-L.p.	GTCATTGCCAGAAAATTTTAAACCAGAAAAGCTTGTTTCATCTTGAACCTCCGTTGGAGTTC *****	2302
Bs4-L.e.	GCTTCATTATTTATGGAAGAAAACAGAGGTAACATTATTATTTACTTTACTTACCCTCCT	2400
Bs4-L.p.	GCTTCATTATTTATGGAAGAAAACAGAGGTAACATTATTATTTACTTTACTTACCCTCCT *****	2362
Bs4-L.e.	CCAGGAGCTTCAACCCCTTTTGCTCTCTTATTTACTCGAACCCACAACCTTTTGGGTTGG	2460
Bs4-L.p.	CCAGGAGCTTCAACCCCTTCTGCTCCCTTATTAACCTCGAACCTTTTGGGTTGG *****	2422
Bs4-L.e.	AAGTGAGGGTGCTCAACTCCCTCTTGTCATTTTTGGTCTGACACAAAGATCATTATTCTT	2520
Bs4-L.p.	AAGTGAGGGTGCTCAACTCCCTCTTGTCATTTTTGGTCTAACACAGAGATCATTATTCTT *****	2482
Bs4-L.e.	TCTCTATTTTGAATAACAGCATTGCGCTCTACGAAAGCTAGATCTCAGCTTATCTAA	2580
Bs4-L.p.	TCTCTATTTTGAATAACAGCATTGCGCTCTACGAAAGCTAGATCTCAGCTTATCTAA *****	2542
Bs4-L.e.	AAGTCTGGTGCAAACACCAGATTTACGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTTGAATCTGGA	2640
Bs4-L.p.	AAGTCTGGTGCAAACACCAGATTTACGGGGATGCCAAATTTGGAGTATTTGAATCTGGA *****	2602
Bs4-L.e.	GTACTGTAGTAAGCTTGAAGAGGTTCACTATTCCTTAGCATATTGCGAAAACTCATTGA	2700
Bs4-L.p.	GTACTGTAGTAAGCTTGAAGAGGTTCACTATTCCTTAGCATATTGCGAAAACTCATTGA *****	2662
Bs4-L.e.	GTTAAATTTGAGTTGGTGTACAAAGCTTAGGAGATTTCCATATATTAACATGGAATCTCT	2760
Bs4-L.p.	GTTAAATTTGAGTTGGTGTACAAAGCTTAGGAGATTTCCATATATTAACATGGAATCTCT *****	2722
Bs4-L.e.	TGAATCTCTGGATCTACAATATTGCTATGGTATAATGGTGTTCAGAAATCATCGGAAC	2820
Bs4-L.p.	TGAATCTCTGGATCTACAATATTGCTATGGTATAATGGTGTTCAGAAATCATCGGAAC *****	2782
Bs4-L.e.	GATGAAGCCGGAGTTAATGATTCTCTCAGCAAACACTATGATAACTGAACTACCATCATC	2880
Bs4-L.p.	AATGAAGCCGGAGTTAATGATTCTCTCAGCAAACACTATGATAACTGAACTACCATCATC *****	2842
Bs4-L.e.	TCTTCAGTACCCAACCTCATCTCACAGAGCTAGATTTGAGTGGCATGGAAAACCTTGAAGC	2940
Bs4-L.p.	TCTTCAGTACCCAACCTCATCTCACAGAGCTAGATTTGAGTGGCATGGAAAACCTTGAAGC *****	2902
Bs4-L.e.	TCTTCCAAGCAGCATTGTCAAGTTGAAAGATTTGGTGAAGCTAAATGTGTCGTACTGCTT	3000
Bs4-L.p.	TCTTCCAAGCAGCATTGTCAAGTTGAAAGATTTGGTGAAGTTAAATGTGTCGTACTGCTT *****	2962
Bs4-L.e.	AACGCTTAAAAGCTTGCCTGAAGAGATTGGTGATTTAGAAAACCTTGGAGGAACCTTGATGC	3060
Bs4-L.p.	AACGCTTAAAAGCTTGCCTGAAGAGATTGGTGATTTAGAAAACCTTGGAGGAACCTTGATGC *****	3022

# Anhang

---

Bs4-L.e.	TTGCGTACTCTAATTTACAGCCTCCATCTTCCATTGTCCGCTTGAACAAGCTTAAATC	3120
Bs4-L.p.	TTGCGTACTCTAATTTACAGCCTCCATCTTCCATTGTCCGCTTGAACAAGCTTAAATC *****	3082
Bs4-L.e.	CTTGAAGTTAATGAAACGAAACACATTAACAGATGATGTGTGCTTTGTGTTTCTCTCTGT	3180
Bs4-L.p.	CTTGAAGTTAATGAAACGAAACACATCATTAGATGATGTGTGCTTTGGTGTTCCTCCGGT ***** * *****	3142
Bs4-L.e.	GAATAACGGGTTACTCTCATTGAAATTCTGGAGCTCGGTTCTCCAATTTCAAGATGG	3240
Bs4-L.p.	GAATAACGGGTTACTCTCATTGAAATTCTGGAGCTCGGTTCTCCAATTTCAAGATGG *****	3202
Bs4-L.e.	AAGAATTCGGAAGATATTGGATGTTTATCCTCTTTGAAAGAGTTACGTCTCGAGGGAGA	3300
Bs4-L.p.	AAGAATTCGGAAGATATTGGCTGTTTATCCTCTTTGAAAGAGTTACGTCTCGAGGGAGA *****	3262
Bs4-L.e.	TAATTTCAATCATTTCGCTCAAAGCATAGCCCAACTTGGTGCACTTCGATTCTTATACAT	3360
Bs4-L.p.	TAATTTCAATCATTTCGCTCAAAGCATAGCCCAACTTGGTGCACTTCGATTCTTGTACAT *****	3322
Bs4-L.e.	AAAAGATTGCAGGAGTCTTACAAGTCTGCCAGAATTTCCACCGCAATTAGATACAATATT	3420
Bs4-L.p.	AAAAGATTGCAGGAGTCTTACAGTCTGCCAGAATTTCCACCGCAATTGGATACAATATT *****	3382
Bs4-L.e.	TGCAGATTGGAGCAATGATTGATCTGTAAGTCACTGTTTCTAAATATCTCATCATTCCA	3480
Bs4-L.p.	TGCAGATTGGAGCAATGATTGATCTGTAAGTCACTGTTTCTAAATATCTCATCATTCCA *****	3442
Bs4-L.e.	ACATAACATCTCTGCTTCAGATTTCGTTGTCGTTAAGAGTGTTCACGAGTTGGGGAGTAG	3540
Bs4-L.p.	ACATAACATCTCTGCTTCAGATTTCGTTGTCGTTAAGAGTGTTCACGAGTTGGGGAGTAA *****	3502
Bs4-L.e.	TATCCCAATCTGGTTCACCATCAGGGAACAGATACAAGTGTTCAGTCAATTTGCCTGA	3600
Bs4-L.p.	CATCCCAAGTTGGTTCACCATCAAGGAACAGATACAAGTGTTCAGTCAATTTGCCTGA *****	3562
Bs4-L.e.	AAACTGGTATGTATCAGATAACTTCTTGGGATTCGCTGTATGTTACTATGGCAATTTAAC	3660
Bs4-L.p.	AAATTGGTATGTATCAGATAACTTCTTGGGATTCGCTGTATGTTACTATGGCAATTTAAT *** *****	3622
Bs4-L.e.	TGAGAACACAGCTGAATTGATTATGAGTTCTGCAGGGATGCCATGTATCACCTGGAAACT	3720
Bs4-L.p.	TGAGAACACAGCTGAATTGATTATGAGTTCTGCAGGGATGCCATGTATCACCTGGAAACT *****	3682
Bs4-L.e.	TTTGTTATCGAATCATTTCAGAAATGTACATATATTAGGATTCATTTTTCTTGGTACCTTT	3780
Bs4-L.p.	TTTGTTATCGAATCATTTCAGAAATGTACATATATTAGGATTCATTTTTCTTGGTACCTTT *****	3742
Bs4-L.e.	TGCTGGCTTATGGGATACATCTAACGCCAATGGTAAAACACCAAATGACTATAAGCACAT	3840
Bs4-L.p.	TGCTGGCTTATGGGATACATCTAACGCCAATGGTAAAACACCAAATGACTATAAGCACAT *****	3802
Bs4-L.e.	TATGTTATCTTTTCTCAAGAATTGAAGGAGTGTGGAGTTCGTTTGTCTATGAAGATGA	3900
Bs4-L.p.	TATGTTATCTTTTCTCCAGAATCGAAGGAGTGTGGAGTTCGTTTGTCTATGAAGATGA *****	3862
Bs4-L.e.	ATCTGTGCTTGAGACCACCAATGATGAACCTTACCATTGGGGTAAGGAGGATCAGATACGA	3960
Bs4-L.p.	ATCTTTGCTTGAGACCACCAATGATGAACCTTACCATTGGGGTAAGGAGGATCAGATACGA **** *****	3922
Bs4-L.e.	CGACGACGATAGTGAACATTATGAGGAGGCTGGTTGTTTCTCTTCTAAGAAACAAAGATC	4020
Bs4-L.p.	CGACGACGATAGTGAACATTATGAGGAGGCTAGTTGTTTCTCTTCTAAGAAACAAAGATC *****	3982
Bs4-L.e.	ATAATATAGGTATATAAACTTGTGATCACTTGCTGTTTGTATTAATAATTCATTTCGAT	4080
Bs4-L.p.	ATAA----- ****	3986

## Anhang

---

```
Bs4-L.e.      GCTCTATGTGGTTGTTAAATATCTCTCATGTTATGACAGGGAGCAGAGGGCGGAGCCAGAA 4140
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      TTTTCAATAAGAGGGCTCAAAATCTGTAGAAATAGATAGCTGAAGGGGTTTGACATCTTA 4200
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      CTATATATATACATATAAACTTATTTTAACCATGTATAAATAATATAATTTTTTCGTCGAA 4260
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      TGGGGTTTGGATGAACCCCTTCTATGAAGGTACAATGAAGCATCAATCAAAGTGTGAGAC 4320
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      AGTGGAGGAACGTTTCACATATAGCAAACATAAAAAATCATATTTGTATGTTATAGTTATAG 4380
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      TTAGCATCATTGTAATTTTGTACAAATGTTTCAGTTCTTTATTAATTCATTTTGTACAT 4440
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      TGTAAATTTGTATAATAACATCTGTATTTGTATAATTATAAGTGTATATGATGAATATAT 4500
Bs4-L.p.      -----

Bs4-L.e.      ATGTATATATATACTTTTCTCTCG 4524 *, **
Bs4-L.p.      -----
```

### Abbildung 6-4: Sequenzvergleich von *Bs4* aus *L. esculentum* und *L. pennellii*.

\* Darstellung der Sequenzunterschiede zwischen *Bs4* aus *L. esculentum* (L.e.) und dem nicht HR-induzierenden *Bs4* aus *L. pennellii* (L.p.) Der grau hinterlegte Bereich wurde für die Amplifikation in der sq RT-PCR genutzt. Das Sequenzalignent wurde mit dem Programm ClustalW Version 2.0.12 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) und den Standardeinstellungen durchgeführt.

Quellen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY438027.1>

*Lycopersicon esculentum* bacterial spot disease resistance protein 4 (*Bs4*) gene, *Bs4*-MM allele, complete cds; GenBank: AY438027.1; CDS (26..537, 812..1901, 2015..2368, 2540..4024)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY438028.1>

*Lycopersicon pennellii* bacterial spot disease resistance protein 4 (*Bs4*) gene, *bs4*-pen2963 allele, exons 1 through 4 and partial sequence; GenBank: AY438028.1; CDS (<1..509, 784..1877, 1977..2330, 2502..>3986)



Tabelle 6-1: Plasmidliste

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
<b>Effektorkonstrukte, Entry-Vektoren</b>						
pCR8	Hax3-NING	spec	pC3SE26	minimaler Hax3-Effektor mit NI-NG- <i>repeats</i> , nach <i>Esp31-cut-ligation</i> in pCR8	Minimaler Hax3-Effektor NI-NG, für Klonierung künstlicher ArtXs, Entry	A. Landgraf
pCR8	Hax3-NING_HD#2	spec	pC3NIHD	PCR-Mutagenese von pC3SE26 (Hax3 NI-NG) von AL mit Oligonukleotiden NG_115_HD und NG_115_HD-R zu minimalen Hax3-Effektor mit NI-HD- <i>repeats</i>	Minimaler Hax3-Effektor NI-HD, für Klonierung künstlicher ArtHDs, Entry	Diese Arbeit
pCR8	X1 #AR42	spec	pCX1	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 10,5 <i>repeats</i> , NI NN HD NN NI NI HD NG NN HD NG	Künstlicher Effektor ArtX6, Entry	Forschungsgruppenpraktikum (FGP) A. Richter
pCR8	X2 #AR58.1	spec	pCX2 SA	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 10,5 <i>repeats</i> , NI NN HD NI NI NG NG NN NG HD NG; <i>repeat-Region Stul-Agel</i> in pCX7,5 umkloniert	Künstlicher Effektor ArtX7, Entry	Diese Arbeit
pCR8	X3 #AR59	spec	pCX3	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 12,5 <i>repeats</i> , NI HD NI NN NN HD NI NG NN NI NG NG NG	Künstlicher Effektor ArtX4, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X4 #AR83	spec	pCX4	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 10,5 <i>repeats</i> , NI NG NN NG NN NI NI NG NN NI NG	Künstlicher Effektor ArtX8, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X5 #AL88	spec	pCX5	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 12,5 <i>repeats</i> , NI NG NG HD NG NN NN NN NI HD NN NG NG	Künstlicher Effektor ArtX1, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X6 #AL96	spec	pCX6	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 12,5 <i>repeats</i> , NI NG NN HD NN NN NG HD HD HD NG HD NG	Künstlicher Effektor ArtX2, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X7 #AL136.1	spec	pCX7 SA	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 10,5 <i>repeats</i> , NI NI NG HD NN NG NN HD NG NN NG; <i>repeat-Region Stul-Agel</i> in pCX7,5 umkloniert	Künstlicher Effektor ArtX9, Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pCR8	X8 #L138.1	spec	pCX8 SA	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 12,5 repeats, NI NI NG NN HD HD HD HD NN NN HD NG NG; <i>repeat-Region Stul-Agel</i> in pCX7,5 umklont	Künstlicher Effektor ArtX5, Entry	Diese Arbeit
pCR8	X9 #AL161	spec	pCX9	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 10,5 repeats, NI NG NN NN NI HD HD NN NG NN NG	Künstlicher Effektor ArtX10, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X10 #AL195	spec	pCX10	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 12,5 repeats, NI NG NN NN NN NG NN HD HD HD NG NI NG	Künstlicher Effektor ArtX3, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X4,5 #AR78	spec	pCX4,5	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 4,5 repeats, NI NN NI NI NG	Künstlicher Effektor ArtX4,5, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X5,5 #AR80	spec	pCX5,5	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 5,5 repeats, NI HD NG NN NI NG	Künstlicher Effektor ArtX5,5, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X6,5 #AR102.1	spec	pCX6,5 SA	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 6,5 repeats, NI NG NN NN NN NG NG; <i>repeat-Region Stul-Agel</i> in pCX7,5 umklont	Künstlicher Effektor ArtX6,5, Entry	FGP A. Richter
pCR8	X7,5 #AL67	spec	pCX7,5	<i>Esp31-cut-ligation</i> , pC3SE26 mit 7,5 repeats, NI NG NN HD NN NG NN NG	Künstlicher Effektor ArtX7,5, Entry	FGP A. Richter
<b>Box-Promotorfusionen für Reporterkonstrukte, Entry-Vektoren</b>						
pENTR D	C18_1#4	kan	pEC18_1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden PolyC_18_1 und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	ArtHD-Box p75 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	C18_2#10	kan	pEC18_2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden PolyC_18_2 und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	ArtHD-Box p65 vor 65-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12F	kan	pEP12F	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P12F und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax2-Box TT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F	kan	pEP13F	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P14F	kan	pEP14F	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P14F und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	P13G#3	kan	pEP13G	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13G und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	A+ Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13H#1	kan	pEP13H	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13H und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	C+ Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13I#3	kan	pEP13I	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13I und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	G+ Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GA #1	kan	pEP12GA	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13GA und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax2-Box GA vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GC #2	kan	pEP12GC	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13GC und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax2-Box GC vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GG#2	kan	pEP12GG	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13GG und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax2-Box GG vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GT #4	kan	pEP12GT	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13GT und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax2-Box GT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13FBs4p30 0.2N	kan	pEp300.N	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p300_rev und P13F_p300 in pENTR-D	Hax3-Box vor 300-226 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13FBs4p22 5.5	kan	pEp225	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p225_rev und P13F_p225 in pENTR-D	Hax3-Box vor 225-151 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13FBs4p15 0.4	kan	pEp150	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p150_rev und P13F_p150 in pENTR-D	Hax3-Box vor 150-76 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13FBs4Exo n1/15	kan	pEP13FEx1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Bs4_Ex1_F und Bs4_Ex1_R in pENTR-D	Hax3-Box vor 624-500 Bp <i>Bs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	P13FBs4Exon3/P5	kan	pEP13FEx3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Bs4_Ex3_F und Bs4_Ex3_R in pENTR-D	Hax3-Box vor 2435-2362 Bp <i>Bs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box1.2 NG_A	kan	pEHax4 NG_A	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NG_A und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NG_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box2.2 NG_C	kan	pEHax4 NG_C	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NG_C und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NG_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box3.1 NG_G	kan	pEHax4 NG_G	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NG_G und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NG_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box4.3 HD_A	kan	pEHax4 HD_A	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_HD_A und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box HD_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box5.5 HD_G	kan	pEHax4 HD_G	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_HD_G und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box HD_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box6.6 HD_T	kan	pEHax4 HD_T	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_HD_T und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box HD_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box7.1 NI_C	kan	pEHax4 NI_C	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NI_C und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NI_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box8.1 NI_G	kan	pEHax4 NI_G	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NI_G und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NI_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box9.5 NI_T	kan	pEHax4 NI_T	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_NI_T und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NI_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box10.6 NS_C	kan	pEHax4 NS_C	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_N_C und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NS_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	Hax4box11.2 NS_G	kan	pEHax4 NS_G	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_N_G und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NS_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	Hax4box12.2 NS_T	kan	pEHax4 NS_T	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden Hax4_N_T und Bs4PR/B01_Xba in pENTR-D	Hax4-Box NS_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	AR5box14 NN_C	kan	pEAR5box NN_C	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden AK_NN_C und Bs4PR/B01_Xba Kristinin pENTR-D	ArtX1-Box NN_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	AR5box15.2 NN_T	kan	pEAR5box NN_T	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden AK_NN_T und Bs4PR/B01_Xba Kristinin pENTR-D	ArtX1-Box NN_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	AR5box13.3 NN_A	kan	pEAR5box NN_A	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden AK_NN_A und Bs4PR/B01_Xba Kristinin pENTR-D	ArtX1-Box NN_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBox_4,5_A R80.1	kan	pE4,5Box.1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_4,5_AR80 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX4,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBox_5,5_A R78.2	kan	pE5,5Box.2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_5,5_AR78 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBox_6,5_A R102.4	kan	pE6,5Box.4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_6,5_AR102 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX6,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBox_7,5_AL 67.2	kan	pE7,5Box.2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_7,5_AL67 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX7,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBoxpCX1_2	kan	pEpCX1boxNeu	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_pCX1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX6-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	pBoxpCX3_1	kan	pEpCX3boxNeu	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden pBOX_pCX3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	P12GT1 o.Xba	kan	pEP12GT oX	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P12F und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box TT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F.3 o.Xba	kan	pEP13F. oX	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P14F.6 o.Xba	kan	pEP14F oX	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P14F und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	U20box.1 o.Xba	kan	pEU20b oX	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden U20b in 74 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	UPA20-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap1a/5	kan	pEP13F1a	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F und p225/3_in_74_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1-3:B4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap1b/54	kan	pEP13F1b	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p225 und p74/3_in_225_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1-3:A4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13Fp225A/ T.1	kan	pEp225A/T	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p225_A/T und P13F_p225_rev in pENTR-D	Hax3-Box +T vor 224-151 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap3a.1	kan	pEP13F 3a	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p74/1_in_p225 und P13Fp225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1-2:B3-4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap3b.1	kan	pEP13F 3b	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p225/1_in_74 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1-2:A3-4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap4a.1	kan	pEP13F 4a	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p74/1.1_in_p225 und P13Fp225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1-:B2-4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap4b.1	kan	pEP13F 4b	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p225/1.1_in_p74 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1-:A2-4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	P13K (A nach Box)	kan	pEP13K	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13K und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax3-Box +A vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13L (C nach Box)	kan	pEP13L	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13L und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax3-Box +C vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13M (G nach Box)	kan	pEP13M	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13M und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax3-Box +G vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap5a.1	kan	pEP13F 5a swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p225/1.2 in p74 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1:B2:A3-4</i> mit Hax3-Box,Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap5b.1	kan	pEP13F 5b swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p74-1.2 in 225 und P13F_p225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1:A2:B3-4</i> mit Hax3-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GT swap3a.2	kan	pEP12GT 3a swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P12GT und P13F_p225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1-2:B3-4</i> mit Hax2-Box,Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GT swap3b.1	kan	pEP12GT 3b swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden H2 swap3b-F und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1-2:A3-4</i> mit Hax2-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GT swap4a.1	kan	pEP12GT 4a swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden H2 swap4a-F und P13F_p225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4A1-:B2-4</i> mit Hax2-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P12GT swap4b.1	kan	pEP12GT 4b swap in Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden H2 swap4b-F und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4B1-:A2-4</i> mit Hax2-Box, Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F p225 lang1	kan	pEP13Fp225L	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P13F_p225 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax3-Box vor 225-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 A1.2	kan	pEboxX2 A1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	boxArtX2 A2.2	kan	pEboxX2 A2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 A3.2	kan	pEboxX2 A3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 A4.1	kan	pEboxX2 A4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 A5.3	kan	pEboxX2 A5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 A6.1	kan	pEboxX2 A6	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-A6 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 M1.1	kan	pEboxX2 M1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-M1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box M1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 M2.2	kan	pEboxX2 M2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-M2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box M2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 M3.2	kan	pEboxX2 M3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-M3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box M3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 B1.2	kan	pEboxX2 B1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-B1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 B2.1	kan	pEboxX2 B2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-B2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	boxArtX2 B3.5	kan	pEboxX2 B3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-B3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit



Vektor	Insert	Resis- tenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	P13F swap 6a.8	kan	pEp13F 6a swap im Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden p74/1.1_in_p225 und p74/3_in_p225_R in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4</i> A1:B2-3:A4 mit Hax3-Box,Entry	Diese Arbeit
pENTR D	P13F swap 6b.9	kan	pEp13F 6b swap im Bs4p	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden P225/1.1_in_p74 und P13F_p225_rev in pENTR-D	Chimär- <i>pBs4</i> B1:A2-3:B4 mit Hax3-Box,Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX1 M1.3	kan	pEArtX1M1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX1-M1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX1-Box M1 (G) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX1 M4.5	kan	pEArtX1M4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX1-M4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX1-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX1 M5.1	kan	pEArtX1M5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX1-M5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX1-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX2 M4.1	kan	pEArtX2M4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-M4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX2 M5.1	kan	pEArtX2M5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-M5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX2-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX4 M1.1	kan	pEArtX4M1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX4-M1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX4-Box M1 (G) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX4 M4.2	kan	pEArtX4M4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX4-M4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX4-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX4 M5.2	kan	pEArtX4M5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX4-M5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX4-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 A1.1	kan	pEArtX5A1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	box ArtX5 A2.2	kan	pEArtX5A2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 A3.2	kan	pEArtX5A3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 A4.2	kan	pEArtX5A4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 A5.2	kan	pEArtX5A5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 A6.2	kan	pEArtX5A6	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-A6 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 B1.2	kan	pEArtX5B1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX5-B1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 B2.1	kan	pEArtX5B2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-B2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box ArtX5 B3.1	kan	pEArtX5B3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box ArtX2-B3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	ArtX5-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 A1.1	kan	pEP12A1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 A2.3	kan	pEP12A2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 A3.2	kan	pEP12A3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	box P12 A4.1	kan	pEP12A4	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A4 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 A5.3	kan	pEP12A5	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A5 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 A6.2	kan	pEP12A6	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-A6 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 B1.1	kan	pEP12B1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-B1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 B2.2	kan	pEP12B2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-B2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	box P12 B3.1	kan	pEP12B3	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box P12F-B3 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	Hax2-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pENTR D	U20b_1.2	kan	pEU20b_1	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box Upa20b_1 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	UPA20-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry (mut zu original)	Diese Arbeit
pENTR D	U20b_2.3	kan	pEU20b_2	Klonierung des PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden box Upa20b_2 und Bs4PR/B01_R in pENTR-D	UPA20-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry (mut zu original=optimal)	Diese Arbeit
<b>Reporterkonstrukte bestehend aus Box, Promotor und <i>uidA</i>, Binärvektoren für <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i></b>						
pGWB3	P12F_2.1	kan hyg	pG3P12F1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12F.2	Hax2-Box TT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F_5.1	kan hyg	pG3P13F1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F.5	Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P14F_7.1	kan hyg	pG3P14F2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP14F.7	Hax4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	C18_1#4.1	kan hyg	pG3C18_1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEC18_1.4	ArtHD-Box p75 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	C18_2#10.1	kan hyg	pG3C18_2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEC18_2.10	ArtHD-Box p65 vor 65-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	P12GA #1.1	kan hyg	pG3P12GA	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GA.1	Hax2-Box GA vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GC #2.1	kan hyg	pG3P12GC	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GC.2	Hax2-Box GC vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GG#2.1	kan hyg	pG3P12GG	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GG.2	Hax2-Box GG vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT #4.1	kan hyg	pG3P12GT	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT.4	Hax2-Box GT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13FBs4p15 0.4.1	kan hyg	pG3p150	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp150.4	Hax3-Box vor 150-76 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13FBs4p22 5.5.1	kan hyg	pG3p225	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp225.5	Hax3-Box vor 225-151 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13FBs4p30 0-2.1N	kan hyg	pG3p300N (von pEp300N)	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp300.N	Hax3-Box vor 300-226 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13FBs4Exo n3/P5.1	kan hyg	pG3P13FEx3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13FEx3	Hax3-Box vor 2435-2362 Bp <i>Bs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13FBs4Exo n1/15.2	kan hyg	pG3P13FEx1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13FEx1	Hax3-Box vor 624-500 Bp <i>Bs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box2.2 NG_C	kan hyg	pG3Hax4 NG_C	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NG_C	Hax4-Box NG_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box1.2 NG_A	kan hyg	pG3Hax4 NG_A	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NG_A	Hax4-Box NG_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box3.1 NG_G	kan hyg	pG3Hax4 NG_G	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NG_G	Hax4-Box NG_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box4.3 HD_A	kan hyg	pG3Hax4 HD_A	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 HD_A	Hax4-Box HD_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Entry	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box5.5 HD_G	kan hyg	pG3Hax4 HD_G	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 HD_G	Hax4-Box HD_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	Hax4box6.6 HD_T	kan hyg	pG3Hax4 HD_T	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 HD_T	Hax4-Box HD_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box7.1 NI_C	kan hyg	pG3Hax4 NI_C	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NI_C	Hax4-Box NI_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box8.1 NI_G	kan hyg	pG3Hax4 NI_G	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NI_G	Hax4-Box NI_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box9.5 NI_T	kan hyg	pG3Hax4 NI_T	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NI_T	Hax4-Box NI_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box10.6 NS_C	kan hyg	pG3Hax4 NS_C	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NS_C	Hax4-Box NS_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box11.2 NS_G	kan hyg	pG3Hax4 NS_G	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NS_G	Hax4-Box NS_G vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	Hax4box12.2 NS_T	kan hyg	pG3Hax4 NS_T	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEHax4 NS_T	Hax4-Box NS_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	AR5box14 NN_C	kan hyg	pG3AR5box NN_C	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEAR5box NN_C	ArtX1-Box NN_C vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	AR5box15.2 NN_T	kan hyg	pG3AR5box NN_T	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEAR5box NN_T	ArtX1-Box NN_T vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	AR5box13.3 NN_A	kan hyg	pG3AR5box NN_A	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEAR5box NN_A	ArtX1-Box NN_A vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	pBoxX3.2_1	kan hyg	pG3AR3 box, neu rekom. v. Klon 3.2 von AR	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEBoxX3.2	ArtX4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	pBox_4,5_1 (80)	kan hyg	pG3Box4,5 zu Art AR 80	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pE4,5Box.1	ArtX4,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	pBox_5,5_1 (78)	kan hyg	pG3Box5,5 zu Art AR 78	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pE5,5Box.2	ArtX5,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	pBox_6,5_7 (102)	kan hyg	pG3Box6,5 zu Art AR 102	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pE6,5Box.4	ArtX6,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	pBox_7,5_1 (67)	kan hyg	pG3Box7,5 zu Art AL 67	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pE7,5Box.2	ArtX7,5-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	pBoxpCX1_2 .1	kan hyg	pG3pCX1box (von pEpCX1box)	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pBoxX1 (A. Richter)	ArtX6-Box vor 75 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT.1.5 o.Xba	kan hyg	pG3P12GT o.Xba im 74bpBs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT o.Xba	Hax2-Box TT vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F.3.1 o.Xba	kan hyg	pG3P13F o.Xba im 74bpBs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F.3 o.Xba	Hax3-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P14F.6.2 o.Xba	kan hyg	pG3P14F o.Xba im 74bpBs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP14F.6 o.Xba	Hax4-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	U20box.1.8 o.Xba	kan hyg	pG3U20b o.Xba im 74bpBs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEU20b o.Xba	UPA20-Box vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap1a 5.1	kan hyg	pG3P13F 1a swap in Bs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F1a	Chimär- <i>pBs4A1-3:B4</i> mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap1b 54.3	kan hyg	pG3P13F 1b swap in Bs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F1b	Chimär- <i>pBs4B1-3:A4</i> mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13Fp225A/ T.1-1	kan hyg	pG3p225A/T	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp225A/T	Hax3-Box +T vor 224- 151 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap3a.1-2	kan hyg	pG3P13F 3a	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 3a	Chimär- <i>pBs4A1-2:B3-4</i> mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap3b.1-2	kan hyg	pG3P13F 3b	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 3b	Chimär- <i>pBs4B1-2:A3-4</i> mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap4a.1-1	kan hyg	pG3P13F 4a	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 4a	Chimär- <i>pBs4A1-:B2-4</i> mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	P13F swap4b.1-2	kan hyg	pG3P13F 4b	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 4b	Chimär- <i>pBs4B1</i> :-A2-4 mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13K (A) 1-2	kan hyg	pG3P13K	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13K	Hax3-Box +A vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13L (C) 1-1	kan hyg	pG3P13L	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13L	Hax3-Box +C vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13M (G) 1-1	kan hyg	pG3P13M	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13M	Hax3-Box +G vor 74-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap5a.1.1	kan hyg	pG3P13F 5a	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 5a	Chimär- <i>pBs4A1</i> :B2:A3-4 mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap5b.1.1	kan hyg	pG3P13F 5b	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13F 5b	Chimär- <i>pBs4B1</i> :A2:B3-4 mit Hax3-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT swap3a.2.1	kan hyg	pG3P12GT 3a	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT 3a	Chimär- <i>pBs4A1</i> -2:B3-4 mit Hax2-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT swap3b.1.1	kan hyg	pG3P12GT 3b	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT 3b	Chimär- <i>pBs4B1</i> -2:A3-4 mit Hax2-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT swap4a.1.2	kan hyg	pG3P12GT 4a	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT 4a	Chimär- <i>pBs4A1</i> :-B2-4 mit Hax2-Box, Entry	Diese Arbeit
pGWB3	P12GT swap4b.1.1	kan hyg	pG3P12GT 4b	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12GT 4b	Chimär- <i>pBs4B1</i> :-A2-4 mit Hax2-Box, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F p225 lang1.1	kan hyg	pG3P13Fp225L	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP13Fp225L	Hax3-Box vor 225-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 A1.2.1	kan hyg	pG3boxX2 A1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A1	ArtX2-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 A2.2.1	kan hyg	pG3boxX2 A2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A2	ArtX2-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 A3.2.1	kan hyg	pG3boxX2 A3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A3	ArtX2-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	boxArtX2 A4.1.2	kan hyg	pG3boxX2 A4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A4	ArtX2-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 A5.3.1	kan hyg	pG3boxX2 A5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A5	ArtX2-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 A6.1.2	kan hyg	pG3boxX2 A6	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 A6	ArtX2-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 M1.1.2	kan hyg	pG3boxX2 M1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 M1	ArtX2-Box M1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 M2.22	kan hyg	pG3boxX2 M2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 M2	ArtX2-Box M2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 M3.2.1	kan hyg	pG3boxX2 M3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 M3	ArtX2-Box M3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 B1.2.1	kan hyg	pG3boxX2 B1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 B1	ArtX2-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 B2.1.1	kan hyg	pG3boxX2 B2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 B2	ArtX2-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	boxArtX2 B3.5.2	kan hyg	pG3boxX2 B3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEboxX2 B3	ArtX2-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap 6a.8.1	kan hyg	pG3p13F 6a swap im Bs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp13F 6a	Chimär- <i>pBs4</i> A1:B2-3:A4 mit Hax3-Box,Entry	Diese Arbeit
pGWB3	P13F swap 6b.9.1	kan hyg	pG3p13F 6b swap im Bs4p	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEp13F 6b	Chimär- <i>pBs4</i> B1:A2-3:B4 mit Hax3-Box,Entry	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX1 M1.3	kan hyg	pG3ArtX1M1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX1M1	ArtX1-Box M1 (G) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX1 M4.5	kan hyg	pG3ArtX1M4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX1M4	ArtX1-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX1 M5.1	kan hyg	pG3ArtX1M5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX1M5	ArtX1-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit



Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	box ArtX2 M4.1	kan hyg	pG3ArtX2M4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX2M4	ArtX2-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX2 M5.1	kan hyg	pG3ArtX2M5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX2M5	ArtX2-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX4 M1.1	kan hyg	pG3ArtX4M1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX4M1	ArtX4-Box M1 (G) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX4 M4.2	kan hyg	pG3ArtX4M4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX4M4	ArtX4-Box M4 (A) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX4 M5.2	kan hyg	pG3ArtX4M5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX4M5	ArtX4-Box M5 (T) vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A1.1	kan hyg	pG3ArtX5A1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A1	ArtX5-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A2.2	kan hyg	pG3ArtX5A2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A2	ArtX5-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A3.2	kan hyg	pG3ArtX5A3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A3	ArtX5-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A4.2	kan hyg	pG3ArtX5A4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A4	ArtX5-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A5.2	kan hyg	pG3ArtX5A5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A5	ArtX5-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 A6.2	kan hyg	pG3ArtX5A6	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5A6	ArtX5-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 B1.2	kan hyg	pG3ArtX5B1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5B1	ArtX5-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 B2.1	kan hyg	pG3ArtX5B2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5B2	ArtX5-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box ArtX5 B3.1	kan hyg	pG3ArtX5B3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEArtX5B3	ArtX5-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 A1.1	kan hyg	pG3P12A1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A1	Hax2-Box A1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resis- tenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB3	box P12 A2.3	kan hyg	pG3P12A2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A2	Hax2-Box A2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 A3.2	kan hyg	pG3P12A3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A3	Hax2-Box A3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 A4.1	kan hyg	pG3P12A4	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A4	Hax2-Box A4 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 A5.3	kan hyg	pG3P12A5	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A5	Hax2-Box A5 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 A6.2	kan hyg	pG3P12A6	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12A6	Hax2-Box A6 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 B1.1	kan hyg	pG3P12B1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12B1	Hax2-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 B2.2	kan hyg	pG3P12B2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12B2	Hax2-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	box P12 B3.1	kan hyg	pG3P12B3	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEP12B3	Hax2-Box B3 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	U20b_1.2	kan hyg	pG3U20b_1	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEU20b_1	UPA20-Box B1 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB3	U20b_2.3	kan hyg	pG3U20b_2	LR-Rekombination von pGWB3 (promotorlos: <i>uidA</i> ) mit pEU20b_2	UPA20-Box B2 vor 75-1 Bp <i>pBs4</i> , Binärvektor	Diese Arbeit
<b>Effektorexpressionskonstrukte, Binärvektoren für <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i></b>						
pBGWFS7-Derivat	35S:Hax3 X1.7	spec	pJBA_X1.7	<i>golden gate</i> -klonierter Effektor: 35S:GFP:ArtBs4 NG NN NG NI NG NI NG NI NI HD NG NG NG, mit Box im 75 Bp <i>pBs4</i>	Künstlicher Effektor ArtBs4, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	0xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S: <i>Gen</i> ) mit pC3NIHD.2, in den keine HD- <i>repeats</i> inseriert wurden: <b>NI HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD1,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	1xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S: <i>Gen</i> ) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 1 HD- <i>repeats</i> inseriert wurden: <b>NI HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD2,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	2xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S: <i>Gen</i> ) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 2 HD- <i>repeats</i> inseriert wurden: <b>NI HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD3,5, Binärvektor	A. Landgraf

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB2	3xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 3 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD4,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	4xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 4 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD5,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	5xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 5 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD6,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	6xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 6 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD7,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	7xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 7 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD8,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	8xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 8 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD9,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	9xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 9 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD10,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	10xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 10 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD11,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	11xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 11 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD12,5, Binärvektor	A. Landgraf

Vektor	Insert	Resis- tenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB2	12xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 12 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD13,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	13xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 13 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD14,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	14xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 14 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD15,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB2	15xR3NIHD	kan hyg		LR-Rekombination von pGWB2 (35S:Gen) mit pC3NIHD.2, in den per <i>Cut-ligation</i> 15 HD-repeats inseriert wurden: <b>NI HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD HD</b>	Künstlicher Effektor ArtHD16,5, Binärvektor	A. Landgraf
pGWB6	X1 #AR42.1	kan hyg	pG6Art1 aus pCX1	LR-Rekombination mit pCX1, NI NN HD NN NI NI HD NG NN HD NG	Künstlicher Effektor ArtX6, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X2 #AR58.1.1	kan hyg	pG6Art2 aus pCX2 SA	LR-Rekombination mit pCX2 Stul-Agel umkloniert, von AR58, NI NN HD NI NI NG NG NN NG HD NG	Künstlicher Effektor ArtX7, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X3 #AR59.1	kan hyg	pG6Art3 aus pCX3	LR-Rekombination mit pCX3, NI HD NI NN NN HD NI NG NN NI NG NG NG	Künstlicher Effektor ArtX4, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X4 #AR83	kan hyg		LR-Rekombination mit pCX4, NI NG NN NG NN NI NI NG NN NI NG	Künstlicher Effektor ArtX8, Binärvektor	FGP A. Richter
pGWB6	X5 #AL88	kan hyg		LR-Rekombination mit pCX5, NI NG NG HD NG NN NN NN NI HD NN NG NG	Künstlicher Effektor ArtX1, Binärvektor	FGP A. Richter
pGWB6	X6 (AL96)	kan hyg		LR-Rekombination mit pCX6, NI NG NN HD NN NN NG HD HD HD NG HD NG	Künstlicher Effektor ArtX2, Binärvektor	FGP A. Richter

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGWB6	X7 (AL136).1.1	kan hyg	pG6ARt7 aus pCX7 SA	LR-Rekombination mit pCX7, Stul-Agel umklontiert, von AR136, NI NI NG HD NN NG NN HD NG NN NG	Künstlicher Effektor ArtX9, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X8 (AL138).1.1	kan hyg	pG6ARt8 aus pCX8 SA	LR-Rekombination mit pCX8, Stul-Agel umklontiert, von AR138, NI NI NG NN HD HD HD NN NN HD NG NG	Künstlicher Effektor ArtX5, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X9 (AL161)	kan hyg		LR-Rekombination mit pCX9, NI NG NN NN NI HD HD NN NG NN NG	Künstlicher Effektor ArtX10, Binärvektor	FGP A. Richter
pGWB6	X10 (AL195)	kan hyg		LR-Rekombination mit pCX10, NI NG NN NN NN NG NN HD HD HD NG NI NG	Künstlicher Effektor ArtX3, Binärvektor	FGP A. Richter
pGWB6	X4,5 (AR80).1	kan hyg	pG6ARt4,5_80	LR-Rekombination mit pCX4,5, von AR80 NI NN NI NI NG	Künstlicher Effektor ArtX4,5, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X5,5 (AR78).1	kan hyg	pG6ARt5,5_78	LR-Rekombination mit pCX5,5, von AR78 NI HD NG NN NI NG	Künstlicher Effektor ArtX5,5, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X6,5 (AR102).1.1	kan hyg	pG6ARt6,5 aus pCX6,5 SA	LR-Rekombination mit pCX6,5, Stul-Agel umklontiert, von AR102 NI NG NN NN NN NG NG	Künstlicher Effektor ArtX6,5, Binärvektor	Diese Arbeit
pGWB6	X7,5 (AL67).1	kan hyg	pG6ARt7,5_67	LR-Rekombination mit pCX7,5, von AL67 NI NG NN HD NN NG NN NG	Künstlicher Effektor ArtX7,5, Binärvektor	Diese Arbeit
pVSF	Hax2	kan		<i>35S:hax2</i>	TAL-Effektor aus <i>Xca</i>	S. Thieme
pVSF	Hax3	kan		<i>35S:hax3</i>	TAL-Effektor aus <i>Xca</i>	S. Thieme
pVSF	Hax4	kan		<i>35S:hax4</i>	TAL-Effektor aus <i>Xca</i>	S. Thieme
pVSF	AvrBs3	kan		<i>35S:avrBs3</i>	TAL-Effektor aus <i>Xcv</i>	P. Römer
pVSF	AvrBs4	kan		<i>35S:avrBs4</i>	TAL-Effektor aus <i>Xcv</i>	S. Schornack
pVSF	GUS	kan		<i>35S:uidA</i>	<i>35S:uidA</i> für die konstitutive Expression v. GUS in der Pflanze	S. Schornack
pVSF	-	kan		<i>35S:MCS (multi cloning site)</i>	Leervektor für transiente Expression in der Pflanze	G. Van den Ackerwegen
pAG35P	MCS	kan		Klon von S. Hahn, LR-Rekombination von pAG35P mit pENTR-T, enthält MCS	Leervektor für transiente Expression in der Pflanze	S. Hahn

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pVSF	GFP:AvrBs3. 1	amp	pPP:300	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:300Stop (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3 für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:AvrBs3 ΔAD.1	amp	pPP:300ΔAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:300ΔAD Stop (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:AvrBs3 ΔADV16AD .1	amp	pPP:300ΔAD VP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP: 300ΔADV16AD (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:VP16-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:AvrBs3 ΔADGAL4AD .1	amp	pPP:300ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP: 300ΔADGAL4AD (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:Hax3.1	amp	pPP:H3	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:H3Stop (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes Hax3 für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:Hax3ΔA D.1	amp	pPP:H3ΔAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:H3ΔAD Stop (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:Hax3ΔA DVP16AD.1	amp	pPP:H3ΔAD VP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:H3ΔADV16AD (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:VP16-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:Hax3ΔA DGAL4AD.1	amp	pPP:H3ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:H3ΔAD GAL4AD (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pVSF	GFP:LexA:G AL4AD.1	amp	pPP:LexA	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFPlexADBDSV40NLSGAL4AD (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes LexA-DBD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resis- tenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pVSF	GFP.1	amp	pPP:GFP	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pJet1.2: <i>EcoRI</i> GFP <i>XhoI</i> (S. Hahn) in pVSF300 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP für <i>multi copy</i> Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
<b>Effektorexpressionskonstrukte, Binärvektoren für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i></b>						
pGadT7Re c2ΔAD	GFP:AvrBs3 _3	amp / leu	pGd300	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300 (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3 für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2ΔAD	GFP:AvrBs3 ΔAD.2	amp / leu	pGd300ΔAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:AvrBs3 ΔAD GAL4AD.3	amp / leu	pGd300ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD:GAL4-AD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:Gal4-AD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:AvrBs3 ΔAD VP16AD.3	amp / leu	pGd300ΔAD VP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD:VP16-AD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:VP16-AD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:Hax3_1	amp / leu	pGdH3	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes Hax3 für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:Hax3 ΔAD.1	amp / leu	pGdH3ΔAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:Hax3 ΔAD GAL4AD.3	amp / leu	pGdH3ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD:GAL4-AD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:Gal4-AD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Re c2 ΔAD	GFP:Hax3 ΔAD VP16AD.4	amp / leu	pGdH3ΔAD VP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD:VP16-AD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:VP16-AD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pGadT7Rec2 ΔAD	GFP:LexA:GAL4AD_1	amp / leu	pGdlexA	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:lexA-DBD:SV40NLS:Gal4-AD (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes LexA-DBD:Gal4-AD für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pGadT7Rec2 ΔAD	GFP.7	amp / leu	pGdGFP	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP (S. Hahn) in pGadT7Rec2ΔAD (S. Hahn) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP für <i>single copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:AvrBs3_1	amp / trp	pJO300	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300 (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3 für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:AvrBs3dAD.3	amp / trp	pJO300dAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:AvrBs3dADVP16AD.4	amp / trp	pJO300dADVP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD:VP16-AD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:VP16-AD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:AvrBs3dADGAL4AD.2	amp / trp	pJO300dADGAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:300ΔAD:GAL4-AD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:Gal4-AD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:Hax3_1	amp / trp	pJOH3	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3 (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes Hax3 für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:Hax3dAD.4	amp / trp	pJOH3dAD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:Hax3dADVP16AD.2	amp / trp	pJOH3dADVP16AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD:VP16-AD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> -geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:VP16-AD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit



Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pJOAD	GFP:Hax3dADGAL4AD.2	amp / trp	pJOH3dADGAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:Hax3ΔAD:Gal4-AD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:Gal4-AD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP:LexA:Gal4AD_1	amp / trp	pJOLexA	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP:lexA-DBD:SV40NLS:Gal4-AD (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP-markiertes LexA-DBD:Gal4-AD für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJOAD	GFP.1	amp / trp	pJO GFP	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGEX:GFP (S. Hahn) in pJOAD (J. Boch) ( <i>EcoRI/XhoI</i> - geschnitten)	GFP für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
<b>Reporterkonstrukte für Binärvektoren für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> und deren Vorstufen</b>						
pHIS2	-	kan / trp	pHIS2 Clontech von SH E.coli#24	Plasmid für die Expression des <i>HIS3</i> -Gens unter Kontrolle des minimalen <i>HIS3</i> -Promotors	Originalvektor von Clontech für Klonierungen	Clontech
pJet1.2	U20b-157 in mGal1p.6 +LacZ	Amp	pJU20b-157	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit U20b+LacZ mit den Oligonukleotiden MfeI_YR-F und KpnI_YR-R in pJet1.2	Insertion der U20b an -157 Bp im min <p><i>GAL1</i>, eines <i>LexA-pGAL1-LacZ</i>-Fragments für pHIS2</p>	Diese Arbeit
pJet1.2	H3b-157 in mGal1p.15 +LacZ	Amp	pJH3b-157	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit H3b+LacZ mit den Oligonukleotiden MfeI_YR-F und KpnI_YR-R in pJet1.2	Insertion der H3b an -157 Bp im min <p><i>GAL1</i>, eines <i>LexA-pGAL1-LacZ</i>-Fragments für pHIS2</p>	Diese Arbeit
pHIS2	U20b inGal1p:LacZ_6.2	kan / trp	pH U20b	Klonierung <i>MfeI/KpnI</i> -Fragment aus pJU20b-157 in pHIS2 ( <i>EcoRI/ KpnI</i> geschnitten)	<i>UPA20</i> -Box vor min <p><i>GAL1:LacZ</i> für <i>single copy</i> Expression in Hefe</p>	Diese Arbeit
pHIS2	H3b inGal1p:LacZ_15.1	kan / trp	pH H3b	Klonierung <i>MfeI/KpnI</i> -Fragment aus pJH3b-157 in pHIS2 ( <i>EcoRI/ KpnI</i> geschnitten)	H3b-Box vor min <p><i>GAL1:LacZ</i> für <i>single copy</i> Expression in Hefe</p>	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pSH18-34	U20b in Gal1p_1	amp /ura	pSU20b	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pJU20b-157 in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	<i>UPA20</i> -Box in <i>minpGAL1:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pSH18-34	H3b in Gal1p_2	amp /ura	pSH3b	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pJ3b-157 in pHIS2 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	H3b-Box in <i>minpGAL1:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pJet1.2	mGal1p.1 (Age-Pst)	Amp	pJmGal1p	Klonierung des <i>minpGAL1</i> zwischen <i>AgeI-PstI</i> -Schnittstellen in pJet1.2	<i>minpGal1</i> -Fragment für pJnoPU20b bzw. pJnoPH3b	Diese Arbeit
pJet1.2	mHis3p.3 (Age-Pst)	Amp	pJmHisp	Klonierung des <i>minpHIS3</i> zwischen <i>AgeI-PstI</i> -Schnittstellen in pJet1.2	<i>minpHIS3</i> -Fragment für pJnoPU20b bzw. pJnoPH3b	Diese Arbeit
pJet1.2	U20b Bs4p.1 (Xho-Pst)	Amp	pJU20bBs4p	Klonierung der U20b mit 75 Bp <i>pBs4</i> zwischen <i>XhoI-PstI</i> -Schnittstellen in pJet1.2	75 Bp <i>pBs4</i> -Fragment für pELeU20bLa bzw. pEleH3bLa	Diese Arbeit
pJet1.2	H3b Bs4p (Xho-Pst)	Amp	pJH3bBs4p	Klonierung der H3b mit 75 Bp <i>pBs4</i> zwischen <i>XhoI-PstI</i> -Schnittstellen in pJet1.2	75 Bp <i>pBs4</i> -Fragment für pELeU20bLa bzw. pEleH3bLa	Diese Arbeit
pJet1.2	lexA-Xho-U20b-Age-Pst.4	Amp	pJnoPU20b	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit U20b mit den Oligonukleotiden pSH18-34_237-F+ pSH-18-34_879-R in pJet1.2	Promotordeletionskonstrukt bestehend aus LexA:Box:LacZ-Fragment	Diese Arbeit
pJet1.2	lexA-Xho-H3b-Age-Pst.1	Amp	pJnoPH3b	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit H3b mit den Oligonukleotiden pSH18-34_237-F+ pSH-18-34_879-R in pjet1.2	Promotordeletionskonstrukt bestehend aus LexA:Box:LacZ-Fragment	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-Xho-U20b-Age-Pst.4	Kan	pELeU20bLa aus pJnoPu20b	Klonierung <i>NotI/XbaI</i> -Fragment aus pJnoPU20b in pENTR-D ( <i>NotI/XbaI</i> geschnitten)	Promotordeletionskonstrukt bestehend aus LexA:Box:LacZ-Fragment	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-Xho-H3b-Age-Pst.1	Kan	pELeH3bLa aus pJnoPu20b	Klonierung <i>NotI/XbaI</i> -Fragment aus pJnoPH3b in pENTR-D ( <i>NotI/XbaI</i> geschnitten)	Promotordeletionskonstrukt bestehend aus LexA:Box:LacZ-Fragment	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	lexA-U20b-Galp-lacZ.1	Kan	pELeU20bGalpLa NX	Klonierung <i>Agel/PstI</i> -Fragment aus pJmGal1p in pELeU20bLa ( <i>Agel/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmide	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-U20b-Hisp-lacZ.3	Kan	pELeU20bHispLa NX	Klonierung <i>Agel/PstI</i> -Fragment aus pJmHisp in pELeU20bLa ( <i>Agel/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmide	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-H3b-Galp-lacZ.1	Kan	pELeH3bGalpLa NX	Klonierung <i>Agel/PstI</i> -Fragment aus pJmGal1p in pELeH3bLa ( <i>Agel/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmide	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-H3b-Hisp-lacZ.3	Kan	pELeH3bHispLa NX	Klonierung <i>Agel/PstI</i> -Fragment aus pJmHisp in pELeH3bLa ( <i>Agel/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmide	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-U20b-Galp-lacZ.1	amp / ura	pSH U20bGal1p ( <i>Agel-PstI</i> )	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeU20bGalpL in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	<i>UPA20</i> -Box vor <i>minpGAL1:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-U20b-Hisp-lacZ.2	amp / ura	pSH U20bHis3p AP	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeU20bHis3pLa in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	<i>UPA20</i> -Box vor <i>minpHIS3:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-H3b-Galp-lacZ.1	amp / ura	pSH H3bGal1p AP	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeH3bGalpL in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	H3b-Box vor <i>minpGAL1:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-H3b-Hisp-lacZ.1	amp / ura	pSH H3bHis3p AP	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeH3bHis3pLa in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	H3b-Box vor <i>minpHIS3:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pENTR D	lexAU20bLacZ#19	Kan	pELeU20bLa	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit U20b mit den Oligonukleotiden pSH18-34_237-F+ pSH-18-34_879-R in pENTR-D	LexA-U20b-LacZ-Fragment mit Schnittstellen für div. Promotorinsertionen	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pENTR D	lexAH3bLacZ #25	Kan	pELeH3bLa	Klonierung des 2. SOE-PCR-Produkts mit H3b mit den Oligonukleotiden pSH18-34_237-F+ pSH-18-34_879-R in pENTR-D	LexA-H3b-LacZ-Fragment mit Schnittstellen für div. Promotorinsertionen	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-U20b-Bs4p-lacZ	kan	pELeU20bBs4pLa	Klonierung <i>XhoI/PstI</i> -Fragment aus pJU20bBs4p in pELeU20bLa (PCR) ( <i>XhoI/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmid	Diese Arbeit
pENTR D	lexA-H3b-Bs4p-lacZ	kan	pELeH3bBs4pLa	Klonierung <i>XhoI/PstI</i> -Fragment aus pJH3bBs4p in pELeH3bLa (PCR) ( <i>XhoI/PstI</i> geschnitten)	Zwischenklonierung des Promotorfragments in Promotordeletionsplasmid	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-U20b-Bs4p-lacZ.2	amp / ura	pSH U20bBs4	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeU20bBs4pLa (PCR) in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	<i>U20b</i> -Box vor 75 Bp <i>pBs4:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
pSH18-34	lexA-H3b-Bs4p-lacZ.1	amp / ura	pSH H3bBs4p	Klonierung <i>SalI/KasI</i> -Fragment aus pELeH3bBs4pLa (PCR) in pSH18-34 ( <i>SalI/KasI</i> geschnitten)	H3b-Box vor 75 Bp <i>pBs4:LacZ</i> für <i>multi copy</i> Expression in Hefe	Diese Arbeit
<b>Reporterkonstrukte für humane Zellen</b>						
pF12A RM Flexi	Luc	amp	pFA:Luc	Klonierung <i>HindIII/MssI</i> -Fragment aus pSp-luc in pF12A RM Flexi ( <i>HindIII/MssI</i> geschnitten)	Umklonierung des <i>Barnase</i> - zum <i>Luciferase</i> -Gen für Reporterkonstrukt humanes System	Diese Arbeit
pJet 1.2	P13F:Luc.16	amp	pJ+P13F:Luc	Klonierung des PCR-Fragments mit den Oligonukleotiden P13F_minP_321_F und pF12A RM seq rev/HS an pFA:Luc in pJet 1.2	Zwischenklonierung der Amplifikation: Hax3-Box vor <i>minpCMV:Luc</i>	Diese Arbeit
pJet 1.2	U20b:Luc.19	amp	pJ+U20b:Luc	Klonierung des PCR-Fragments mit den Oligonukleotiden U20b_minP_321_F und pF12A RM seq rev/HS an pFA:Luc in pJet 1.2	Zwischenklonierung der Amplifikation: <i>UPA20</i> -Box vor <i>minpCMV:Luc</i>	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pF12A RM Flexi	P13F:luc	amp	pFA:P13FL	Klonierung <i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pJ+P13F:Luc in pJ+P13F:Luc ( <i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I geschnitten)	Hax3-Box vor <i>minpCMV:Luc</i> , Reporterkonstrukt für humanes System	Diese Arbeit
pF12A RM Flexi	U20b:luc	amp	pFA:U20bL	Klonierung <i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pJ+U20b:Luc in pJ+P13F:Luc ( <i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I geschnitten)	<i>UPA20</i> -Box vor <i>minpCMV:Luc</i> , Reporterkonstrukt für humanes System	Diese Arbeit
<b>Effektorexpressionskonstrukte für humane Zellen</b>						
pcDNA3	GFP:AvrBs3.1	amp	pMP:300	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP:300Stop (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3 für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:AvrBs3 dAD.1	amp	pMP:300ΔAD	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP:300ΔAD Stop (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:AvrBs3 dADVP16AD.1	amp	pMP:300ΔAD VP16AD	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP: 300ΔADVP16AD (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:VP16-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:AvrBs3 dADGAL4AD.1	amp	pMP:300ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP: 300ΔADGAL4AD (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes AvrBs3ΔAD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:Hax3.1	amp	pMP:H3	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP:H3Stop (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes Hax3 für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:Hax3dAD.1	amp	pMP:H3ΔAD	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP:H3ΔAD Stop (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:Hax3dAD VVP16AD.1	amp	pMP:H3ΔAD VP16AD	Klonierung <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pGex:GFP:H3ΔADVVP16AD (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:VP16-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit

Vektor	Insert	Resistenz	Name	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pcDNA3	GFP:Hax3dA DGAL4AD.1	amp	pMP:H3ΔAD GAL4AD	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFP:H3ΔAD GAL4AD (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes Hax3ΔAD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP:LexA:Gal4AD.1	amp	pMP:LexA	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGex:GFPlexADBDSV40NLSGAL4AD (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP-markiertes LexA-DBD:Gal4-AD für Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit
pcDNA3	GFP.1	amp	pMP:GFP	Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pJet1.2:EcoRI:GFPXhoI (S. Hahn) in pcDNA3 ( <i>EcoRI/XhoI</i> geschnitten)	GFP für <i>multi copy</i> Expression in humanen Zellen	Diese Arbeit

## Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas bedanken, dass sie mir die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe und damit an diesem vielseitigen und interessanten Thema ermöglicht hat. Ich bedanke mich insbesondere für die Betreuung, die verschiedenen nützlichen Anregungen und ihren fachmännischen Rat.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Jens Boch für die Möglichkeit dieses einmalig spannende Dissertationsthema zu bearbeiten. Auch danke ich dir für die kompetente Betreuung, die von dir vermittelten Kenntnisse, sowie dass du mir immer mit hilfreichen Tipps, Ratschlägen und vor allem neuen Ideen und nie endender Motivation zur Seite standest.

Vorab möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gatz, Herrn Prof. Dr. Behrens und PD Dr. Boch für die Erstellung der Gutachten bedanken.

Angelika, Sabine, Simone, Eva und Robert W. bedanke ich mich für die Aufnahme in „ihr“ Labor. Ich danke euch sowie den neueren Gesichtern des Lab 223 Anika, Anja K., Annekatrin, Ariane, Carola, Christian B., Christina B., Jana, Katja, Maik, Robert S. und Tom für eure stetige Ansprechbereitschaft, spontane Diskussionsrunden und die praktische Unterstützung im Laboralltag sowie für die gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre, auch wenn es manchmal eng war.

„Meinen“ Praktikanten und HiWis Jana, Annekatrin und Ariane möchte ich für die Unterstützung im Laboralltag und die hervorragende Hilfe bei den Klonierungen für die vielen umfangreichen Experimente danken.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Carola für die tollen Sequenzen, bei Marina für die stetige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und bei Bianca für die fachmännische Aufzucht und Pflege der vielen von mir benötigten Pflanzen. Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Unterstützung, die kreative Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Bei Prof. Dr. Behrens und René Geißler möchte ich mich für die schnelle und zielorientierte Zusammenarbeit bedanken und ihnen sowie allen weiteren Ko-Autoren bedanke ich mich für ihre Beiträge zu den bisherigen und hoffentlich folgenden Publikationen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und den notwendigen Rückhalt bei der Umsetzung meiner Ziele danken. Abschließend möchte ich mich bei all meinen Freunden, die mich unterstützt, motiviert, aber auch ab und zu auf andere Gedanken gebracht haben, bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Verlobten Andreas für seine Geduld, Motivation und Liebe.

Dankeschön.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Heidi Scholze  
Adresse: Luisenstr. 6, 06618 Naumburg (Saale)  
Geburtsdatum: 27.01.1982  
Geburtsort: Dresden  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

---

09/1988-07/1992 Hans-Beimler-Oberschule Oberhermsdorf  
08/1992-07/1993 Mittelschule Freital-Wurgwitz  
08/1993-07/2000 Manfred-von-Ardenne-Gymnasium Freital-Zauckerode  
Abschluss: Abitur  
10/2000-03/2002 Technische Universität Dresden  
Studium der Lebensmittelchemie  
10/2002-06/2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Studium der Biologie  
07/2007-06/2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie,  
Institut für Genetik, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bonas, unter  
Betreuung von Dr. Lahaye  
Diplomarbeit mit dem Thema: „Vergleichende funktionelle Analyse der  
*Xanthomonas* Effektorproteine AvrBs3 und AvrHah1“  
Abschluss: Diplom Biologin  
07/2008-06/2011 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie,  
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bonas, PD Dr. Boch  
Promotion mit dem Thema: „DNA-Bindenspezifität von TAL-Effektoren  
aus *Xanthomonaden*“

Naumburg (Saale), 18. Oktober 2011



## **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 (Saale), 18. Oktober 2011