

Funktionelle Analysen zur DNA-Bindung des TAL Effektors

AvrBs3 aus Xanthomonas

Dissertation

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

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt
von Herrn Tom Schreiber
geb. am 16.10.1981 in Cottbus

Gutachter / in:

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Dierk Scheel
3. Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

Verteidigungsdatum: 09.10.2015

Zusammenfassung

AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), dem Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate, ist der zuerst identifizierte und zugleich am besten untersuchte Vertreter der *transcription activator-like effector* (TALE) Proteinfamilie. AvrBs3 wird über das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert und über die pflanzliche Kernimportmaschinerie in den Zellkern transportiert. Im Kern bindet AvrBs3 spezifisch an Promotorelemente (UPA-Boxen) und induziert die Transkription von UPA-Genen (*upregulated by AvrBs3*). In Paprika induziert AvrBs3 über 20 UPA-Gene, z.B. der Zellgrößenregulator *UPA20* und das Resistenzgen *Bs3*, deren Expression zu einer Hypertrophie (in suszeptiblen Pflanzen) bzw. zur Ausbildung einer lokalen Zelltodreaktion (hypersensitive Reaktion (HR), in resistenten Pflanzen) führt. Die DNA-Bindedomäne von AvrBs3 besteht aus 17,5 34 Aminosäure-Wiederholungen (*repeats*), die sich hauptsächlich an den Positionen 12 und 13 (*repeat-variable diresidue* - RVD) unterscheiden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die detaillierte Analyse der Dimerisierung von AvrBs3 sowie dessen Spezifität für die Bindung an Thymin am 5' Beginn der UPA-Box (T_0). AvrBs3 bildet Homo-Oligomere durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der *repeat*-Region aus. Der Austausch der Cysteinreste zu Serin bzw. Alanin führte zum Aktivitätsverlust von AvrBs3 und dem Verlust der AvrBs3-DNA-Bindesepezifität *in planta*. Zusätzlich stellte sich heraus, dass nahezu die gesamte N-terminale Region (NTR) zur vollständigen DNA-Bindeaffinität von AvrBs3 erforderlich ist. Die NTR, insbesondere ein Tryptophan im degenerierten *repeat* -1 (W232), ist verantwortlich für die Koordinierung von T_0 in der UPA-Box. Sowohl W232 als auch T_0 sind besonders wichtig, wenn die AvrBs3-*repeat*-Region mit einem HD-*repeat* beginnt („Rep1-Effekt“). Weiterhin stellte sich heraus, dass die Aktivität eines TALEs verstärkt von T_0 abhängig ist, wenn dieser eine geringe Anzahl von *repeats* und eine unausgeglichene RVD-Komposition besitzt. Zusammen führten die Daten zu einem Modell, welches die DNA-Bindung des TALEs AvrBs3 in zwei Schritten beschreibt: (i) „Suchvorgang“ durch das Gleiten von AvrBs3 mit einer lockeren Konformation der *repeat*-Region entlang der DNA und (ii) Bindung der spezifischen DNA-Zielsequenz unter Komprimierung der *repeats*. Dabei verhilft die Interaktion zwischen W232 und T_0 der *repeat*-Region bei dem Übergang zur komprimierten DNA-gebundenen Form.

Summary

AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), the causal agent of bacterial spot disease on pepper and tomato plants, is the first identified and best studied member of the transcription activator-like effector (TALE) protein family. AvrBs3 is translocated into the cytoplasm of the plant cell via the bacterial type-III-secretion system and then imported into the nucleus. In the nucleus AvrBs3 binds specific promoter elements (*UPA*-boxes) and induces the transcription of *UPA*-genes (upregulated by AvrBs3). In pepper AvrBs3 induces more than 20 *UPA*-genes, e.g. the cell size regulator *UPA20* and the resistance gene *Bs3*, whose induction triggers a hypertrophy (in susceptible plants) and a rapid local cell death (hypersensitive reaction (HR), in resistant plants), respectively. The DNA-binding domain of AvrBs3 consists of 17.5 repeats of a 34 amino acid motif, which are highly conserved except for position 12 and 13 (repeat-variable diresidue - RVD). This work was focused on the detailed characterization of the AvrBs3-dimerisation and its specificity for thymine at the 5' end of the *UPA*-box (T_0). The data revealed that AvrBs3 forms homo-oligomers via disulfide bridges between cysteines residues of the repeat-region. The substitution of the cysteines to serine or alanine led to a loss of AvrBs3-activity and a loss of DNA-binding specificity of AvrBs3 *in planta*. In addition, the results showed that almost the complete N-terminal region (NTR) is needed for full DNA-binding affinity of AvrBs3. Furthermore, the NTR, especially the tryptophan in the degenerated repeat -1 (W232), is responsible for the coordination of T_0 in the *UPA*-box. Notably, the W232 and T_0 seem to be particularly important if the repeat-region starts with a HD-repeat ("rep1-effect"). It turned out, that the activity of a TALE is more dependent on T_0 if it contains a reduced number of repeats and an unbalanced RVD-composition. Taken together, this study suggests a two-state model of the AvrBs3-DNA-binding mode: (i) a sliding scan-process of AvrBs3 along the DNA-strand with a loose conformation of the repeat-region and (ii) a binding-event which leads to a compressed conformation of the repeats. The transition from the loose conformation to the compressed conformation of the repeat-region is facilitated by the interaction between W232 and T_0 .

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:

Schreiber, T. and Bonas U. (2014). "Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero." *Nucleic Acids Res.* **42**(11): 7160-7169.

Schreiber, T., Sorgatz, A., List, F., Blüher, D., Thieme, S., Wilmanns, M. and Bonas, U. (2015). "Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3." *PLoS One* **10**(3): e0120214

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen	1
1.2. TAL Effektoren	3
1.2.1. AvrBs3-basierte Interaktion zwischen <i>Xcv</i> und <i>C. annuum</i>	3
1.2.2. Aufbau von AvrBs3.....	5
1.2.3. Dimerisierung von AvrBs3.....	6
1.2.4. Die Entdeckung des TALE-Code	7
1.2.5. TALE-basierte Interaktion zwischen <i>Xanthomonas</i> und Pflanzen	8
1.2.6. Erstellung artifizierlicher TALEs	9
1.2.7. TALE-DNA-Bindedomäne	10
1.2.8. TALE-DNA-Bindedomäne (Koordinierung von T ₀).....	14
1.2.9. Anwendung von TALEs.....	15
1.3. Zielstellung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Materialien.....	17
2.1.1. Medien.....	17
2.1.2. Lösungen und Puffer	17
2.1.3. Verwendete Antibiotika.....	19
2.1.4. Verwendete Antikörper	19
2.1.5. Oligonukleotide und Plasmide.....	20
2.1.6. Pflanzenmaterial.....	26
2.1.7. Verwendete Bakterienstämme	26
2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Kultivierung von Bakterien.....	27
2.2.2. Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	27
2.2.3. Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.2.4. Dauerhafte Lagerung von Bakterien	28
2.2.5. Plasmid-Präparation.....	28
2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
2.2.7. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme.....	30
2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 DNA-Ligase	31
2.2.9. Klonierung von GG-Modulen mittels <i>cut-ligation</i>	31
2.2.10. Gerichtete Ligation von PCR-Produkten in pENTR/D-TOPO	32
2.2.11. Rekombinationsbasierte Klonierung mittels <i>GATEWAY</i> -System.....	33
2.2.12. Klonierung von GG-Modulen mittels GG-Klonierung	34
2.2.13. Erstellung von avrBs3-Konstrukten mittels GG-Klonierung	35
2.2.14. <i>Agrobacterium</i> -vermittelte transiente Expression <i>in planta</i>	37
2.2.15. HR-Assay	38
2.2.16. GUS-Reporterassay	38
2.2.17. Proteinreinigung aus <i>E. coli</i>	40
2.2.18. Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Blattgewebe	41
2.2.19. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	41
2.2.20. Immunblot-Analyse (Western Blot)	42
2.2.21. EMSA	43
2.2.22. GST pull-down.....	44
2.2.23. qRT-PCR	45
2.2.24. Konfokale laser-scanning Mikroskopie (LSM).....	47
3. Ergebnisse	48
3.1. Funktionelle Charakterisierung der Homo-Oligomerisierung von AvrBs3	48

3.1.1.	AvrBs3 oligomerisiert über Disulfidbrücken und bindet DNA als Monomer.....	48
3.1.2.	Die Cysteine der <i>repeats</i> sind notwendig für die AvrBs3-Oligomerisierung, jedoch nicht für die spezifische DNA-Bindung <i>in vitro</i>	50
3.1.3.	Cysteine der <i>repeats</i> sind essentiell für die <i>in planta</i> -Aktivität von AvrBs3.....	52
3.1.4.	Die Cysteine der <i>repeat</i> -Region sind essentiell für die biologische Aktivität von AvrBs3.....	55
3.1.5.	Cystein-substituierte AvrBs3-Derivate lokalisieren im pflanzlichen Zellkern.....	58
3.1.6.	Cystein-substituierte AvrBs3-Derivate haben spezifische DNA-Bindung <i>in planta</i> verloren.....	60
3.1.7.	AvrBs3 interagiert nicht mit dem <i>tetratricopeptide domain-containing</i> Thioredoxin aus <i>C. annuum</i> (CaTDX).....	62
3.1.8.	AvrBs3 wird nicht als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert.....	63
3.1.9.	Notwendigkeit der N-terminalen und C-terminalen Regionen für die <i>in planta</i> AvrBs3-Aktivität.....	66
3.1.10.	Einfluss der NTR und CTR von AvrBs3 auf die DNA-Bindung.....	68
3.2.	Analyse der AvrBs3 DNA-Bindesepezifität für Thymin an Position 0.....	70
3.2.1.	RVD-Base-Fehlpaarungen in der AvrBs3 DNA-Zielsequenz erhöhen die T ₀ -Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität.....	70
3.2.2.	W232 und T ₀ sind essentiell für die vollständige AvrBs3-Aktivität.....	72
3.2.3.	Arginin an Position 266 der AvrBs3-NTR koordiniert nicht T ₀ in der DNA-Zielsequenz.....	75
3.2.4.	Die NTR von TalC ist nicht kompatibel mit der AvrBs3 <i>repeat</i> -Region.....	76
3.2.5.	Die NTR und die <i>repeat</i> -Region von TAL-Effektoren kooperieren miteinander..	78
3.2.6.	Der RVD in <i>repeat</i> 1 von AvrBs3 beeinflusst die T ₀ -Spezifität.....	81
3.2.7.	Spezifitätsanalyse des RVD HD1 innerhalb der AvrBs3- <i>repeats</i>	83
3.2.8.	Die T ₀ -Abhängigkeit und der „Rep1-Effekt“ werden von der RVD-Komposition beeinflusst.....	85
3.2.9.	Verringerung der <i>repeat</i> -Anzahl erhöht die T ₀ -Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität.....	87
4.	Diskussion	90
4.1.	Oligomerisierung von AvrBs3.....	90
4.1.1.	AvrBs3 bildet Proteinkomplexe über Disulfidbrücken.....	90
4.1.2.	Aktivitätsverlust der Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate.....	91
4.1.3.	Funktionale Relevanz der AvrBs3-Oligomerisation.....	93
4.2.	Funktionale Bereiche der NTR und CTR von AvrBs3.....	94
4.2.1.	Die N-terminale Region von AvrBs3 fördert die DNA-Bindeaffinität.....	94
4.2.2.	Die C-terminale Region von AvrBs3 ist notwendig für die transkriptionelle Induktion.....	96
4.3.	T ₀ -Koordinierung in DNA-Zielsequenzen von TALEs.....	97
4.3.1.	T ₀ -Abhängigkeit und „Rep1-Effekt“ von TALEs.....	98
4.3.2.	Die Bedeutung von T ₀ für natürlichen DNA-Zielsequenzen und für die biotechnologische Anwendung von TALEs.....	99
4.3.3.	W232 und T ₀ unterstützen die Interaktion zwischen der <i>repeat</i> -Region und der DNA-Zielsequenz.....	100
4.3.4.	Generierung T ₀ -unabhängiger TALE-NTRs.....	103
4.3.5.	Koordinierung von T ₀ (W232 vs. R266).....	104
4.4.	Perspektiven.....	105
5.	Referenzen	106
6.	Publikationen	116
7.	Anhang	117

7.1.	HR-Phänotypen der Cystein-Substituierten AvrBs3-Derivate.....	117
7.2.	HR-Phänotypen der N- und C-terminalen AvrBs3-Deletionsderivate	118
7.3.	Alignment CsTDX und CaTDX.....	118
7.4.	Alignment NTR AvrBs3 und TalC.....	119
7.5.	Aminosäuresequenz von AvrBs3	120
7.6.	AvrBs3 GG-Module	121
7.6.1.	Komplette kodierende Sequenz von <i>avrBs3</i>	121
7.6.2.	Module der verkürzten NTR	122
7.6.3.	Module der verkürzten CTR	123
7.6.4.	GG-Module für die <i>avrBs3 repeat</i> -Region.....	125
7.7.	Reporterkonstrukte.....	126

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Modell pflanzlicher Abwehrmechanismen am Beispiel von phytopathogenen Bakterien.	3
Abbildung 1.2.1: Modell der AvrBs3-Aktivität in <i>C. annuum</i>	4
Abbildung 1.2.2: Genereller Aufbau von AvrBs3.	6
Abbildung 1.2.3: Der TALE-Code.....	7
Abbildung 1.2.4: TALE-DNA-Interaktion.	11
Abbildung 1.2.5: Charakteristik der RVD-Base-Interaktionen.....	12
Abbildung 1.2.6: Interaktion zwischen TALE-NTR und DNA.	14
Abbildung 2.2.1: Modell der GUS-Reportergenanalyse.....	39
Abbildung 3.1.1: Die AvrBs3-Homo-Oligomerisierung hemmt die DNA-Bindung.....	49
Abbildung 3.1.2: AvrBs3-Derivate mit Cystein-Substitutionen zeigen keine Oligomerisierung und eine reduzierte spezifische DNA-Bindung.	51
Abbildung 3.1.3: Die Cysteine in den <i>repeats</i> sind essentiell für die AvrBs3-vermittelte Transkriptionsaktivierung und die HR-Induktion <i>in planta</i>	53
Abbildung 3.1.4: Die Cysteine in den <i>repeats</i> sind essentiell für die AvrBs3-vermittelte Transkriptionsaktivierung <i>in planta</i>	54
Abbildung 3.1.5: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3-Derivate in <i>Xcv</i> 85-10.	56
Abbildung 3.1.6: Die Cysteine in den AvrBs3- <i>repeats</i> sind essentiell für die HR-Induktion nach Inokulation von <i>Xcv</i> 85-10 in <i>C. annuum</i> ECW-30R.....	57
Abbildung 3.1.7: Bestimmung der relativen Transkriptmengen von <i>Bs3</i> und <i>UPA20</i> in <i>C. annuum</i> ECW-30R nach <i>Xcv</i> -vermittelter Translokation von AvrBs3 bzw. AvrBs3-Derivaten.	58
Abbildung 3.1.8: Cystein-substituierte AvrBs3-Derivate lokalisieren im pflanzlichen Zellkern.	59
Abbildung 3.1.9: AvrBs3(C30S) _{Rep} und AvrBs3(C30A) _{Rep} konkurrieren nicht mit AvrBs3 um dessen DNA-Zielsequenz <i>in planta</i>	61
Abbildung 3.1.10: AvrBs3 interagiert nicht mit <i>tetratricopeptide repeat-containing</i> Thioredoxin aus <i>C. annuum</i> (CaTDX).	62
Abbildung 3.1.11: AvrBs3 wird nicht als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert.	64
Abbildung 3.1.12: Aktivität von AvrBs3-Deletionsderivaten.....	66
Abbildung 3.1.13: C-terminale Deletionen von AvrBs3 beeinflussen die Proteinstabilität.	67
Abbildung 3.1.14: Die NTR ist essentiell für die volle DNA-Bindeaffinität von AvrBs3.....	69
Abbildung 3.2.1: RVD-Base-Fehlpaarungen in der DNA-Zielsequenz verstärken die T ₀ -Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität.....	71
Abbildung 3.2.2: W232 und T ₀ sind essentiell für die vollständige AvrBs3-Aktivität.....	73
Abbildung 3.2.3: Proteinsynthesenachweis der W232-Substitutionsderivate von AvrBs3.	74
Abbildung 3.2.4: Effekt von R236- und R266-Substitutionen auf die AvrBs3-Aktivität.	75

Abbildung 3.2.5: Die NTR von TalC ist inkompatibel mit der AvrBs3 <i>repeat</i> -Region.	77
Abbildung 3.2.6: Die NTR und die <i>repeat</i> -Region von TALEs kooperieren miteinander.	79
Abbildung 3.2.7: Die Aktivität von AvrBs3 mit NS- <i>repeat</i> an Position 1 ist unabhängig von W232 und R236.	80
Abbildung 3.2.8: Der RVD im ersten <i>repeat</i> von AvrBs3 beeinflusst die Spezifität für T ₀ innerhalb der DNA-Zielsequenz von AvrBs3.	82
Abbildung 3.2.9: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3 RVD1-Substitutionsderivate.	83
Abbildung 3.2.10: Der HD- <i>repeat</i> an Position 1 der AvrBs3- <i>repeat</i> -Region ist spezifisch für C ₁ und toleriert A ₁	84
Abbildung 3.2.11: Die T ₀ -Abhängigkeit der Aktivität von TAL-Effektoren wird von der RVD-Komposition beeinflusst.	86
Abbildung 3.2.12: Die T ₀ -Abhängigkeit von AvrBs3 nimmt mit geringerer <i>repeat</i> -Anzahl zu. ...	88
Abbildung 3.2.13: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3 <i>repeat</i> -Deletionsderivate.	89
Abbildung 4.1.1: Strukturmodell der AvrBs3- <i>repeats</i>	92
Abbildung 4.3.1: Modell der T ₀ -Koordinierung von TAL-Effektoren.	101
Abbildung 4.3.2: Klassifizierung, Mechanismus und Kontaktpunkte der RVD-Base-Interaktion.	102
Abbildung 7.1.1: Die Cysteine in den <i>repeats</i> sind essentiell für die AvrBs3-vermittelte Induktion der hypersensitiven Reaktion (HR).	117
Abbildung 7.2.1: HR-Phänotypen der AvrBs3-Deletionsderivate	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung	17
Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.....	18
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.....	19
Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper.....	19
Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide	20
Tabelle 2.6: Verwendete Plasmide.....	24
Tabelle 2.7: Verwendete Bakterienstämme	26
Tabelle 2.8: Standardbedingungen der Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	27
Tabelle 2.9: PCR-Reaktionsansatz (<i>Taq</i> -Polymerase)	29
Tabelle 2.10: PCR-Reaktionsansatz (Phusion-Polymerase)	30
Tabelle 2.11: Restriktions-Reaktionsansatz	30
Tabelle 2.12: Ligations-Reaktionsansatz	31
Tabelle 2.13: <i>cut-ligation</i> -Reaktionsansatz (am Beispiel von <i>SmaI</i>)	32
Tabelle 2.14: ENTRY-Klonierungs-Reaktionsansatz	32
Tabelle 2.15: LR-Rekombinations-Reaktionsansatz	33
Tabelle 2.16: Reaktionsansatz der GG-Klonierung.....	34
Tabelle 2.17: Reaktionsansatz der GG-Klonierung (<i>avrBs3-repeat</i> -Module; <i>repeat</i> 1-6).....	36
Tabelle 2.18: Reaktionsansatz der GG-Klonierung (<i>avrBs3</i>).....	36
Tabelle 2.19: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	42
Tabelle 2.20: qRT-PCR-Reaktionsansatz	45

Abkürzungsverzeichnis

AAD	<i>acidic activation domain</i>
AIM	<i>Agrobacterium</i> Infiltrationsmedium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>att</i>	<i>attenuation</i>
avr	avirulenz
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bp	Basenpaare
<i>Bs3</i>	<i>bacterial spot resistance gene 3</i>
<i>Bs4</i>	<i>bacterial spot resistance gene 4</i>
BSA	bovine serum albumin
BSR	<i>base-specific residue</i>
C-	Carboxy-
CaMV	cauliflower mosaic virus
<i>C. annuum</i>	<i>Capsicum annuum</i>
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
CTR	C-terminale Region
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphate</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECW	<i>Early California Wonder</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
<i>fwd</i>	<i>forward</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GG	<i>golden gate</i>
GST	Gluthation-S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
GW	GATEWAY
Hax	<i>homologue of AvrBs3 from Xanthomonas</i>
His	Histidin
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	<i>lysogenic broth</i>
LRR	<i>leucine-rich-repeats</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
<i>MCS</i>	<i>multiple cloning site</i>
MD	<i>molecular dynamics simulation</i>
N-	Amino-
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NB-LRR	<i>nucleotide-binding-leucine-rich-repeat</i>

NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NTR	N-terminale Region
NYG	<i>nutrient yeast glyceroyl</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PTGS	<i>post-transcriptional gene-silencing</i>
pv.	Pathovar
R-	Resistenz
RBS	<i>ribosome binding site</i>
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RVD	<i>repeat-variable diresidue</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
T3S	T3-Sekretions- und Translokationssignal
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALE	<i>transcription activator-like effector</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> + Tween20
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
U	<i>unit</i>
UPA	<i>upregulated by AvrBs3</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
WT	Wildtyp
WU	weiss unit
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
Y2H	<i>yeast two hybrid</i> , Hefe-Dihybrid

1. Einleitung

1.1. Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen

Pflanzen sind ständig einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt. Dazu zählen unter anderem auch Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze. Um sich dieser permanenten Gefahr zu widersetzen, besitzen Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen. Zunächst verwehren mechanische Barrieren Mikroorganismen den Zugang in das Pflanzeninnere. Dazu zählen zum einen eine Wachsschicht (Cutikula) auf der Epidermis und zum anderen Haare auf der Blattoberseite sowie im Bereich von Spaltöffnungen, die als natürlicher Eintrittsort für Mikroorganismen dienen. Darüber hinaus können Verwundungen die mechanischen Barrieren zerstören und so das Pflanzeninnere für Mikroorganismen zugänglich machen. Wenn Pathogene die mechanische Barriere überwinden und in den Zellzwischenraum (Apoplast) gelangen, tritt die nächste Stufe der pflanzlichen Abwehr in Kraft (Abbildung 1.1.1). Diese beruht auf der Erkennung extrazellulärer Komponenten von Mikroorganismen (*microbe-associated molecular patterns* - MAMPs) oder der Erkennung von Molekülen die durch die Aktivität von Mikroorganismen von Pflanzenzellen freigesetzt werden (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs; (Zipfel 2014)). Zu MAMPs gehören neben Peptidketten wie des bakteriellen Flagellins (z.B. flg22) oder PEP13 aus *Phytophthora*, auch andere Substanzen wie Chitin oder Lipopolysaccharide, Bestandteil von Zellwänden in Pilzen bzw. gram negativen Bakterien (Newman *et al.* 2013). Pflanzen erkennen MAMPs über membranständige Rezeptoren (*pattern recognition receptors* - PRRs; (Dodds and Rathjen 2010; Zipfel 2014); Abbildung 1.1.1). PRRs bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen *repeat*-Domäne (*leucine-rich-repeat-domain* - LRR), einer Transmembran-Domäne und häufig aus einer intrazellulären Kinase-Domäne (Zipfel 2008). Die LRR-Domäne vermittelt die Erkennung von MAMPs bzw. DAMPs durch eine direkte Bindung und die Kinase-Domäne die Initiierung der Signalweiterleitung über Phosphorylierungsschritte (Zipfel 2014). Die dadurch ausgelöste Abwehrreaktion wird als *pattern-triggered immunity* (PTI) oder Basalabwehr bezeichnet und geht mit der Aktivierung von *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen, einer veränderten Genexpression, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) und Zellwandverdickung unter Einlagerung verdichtender Substanzen, wie Callose, einher (Zipfel 2014). Die PTI besteht aus mehreren

Mechanismen, die über verschiedene Wege erfolgen und unter der Beteiligung einer Vielzahl von Genen reguliert werden. Dies verhindert, dass pathogene Mikroorganismen durch Modifikation einzelner eigener Gene die Basalabwehr umgehen können. Diese grundlegende Situation der Pflanzen-Pathogen-Interaktion ermöglicht es ausschließlich Spezialisten Pflanzen zu infizieren. Dies gelingt entweder durch eine Vermeidung der Erkennung oder durch die Suppression der PTI.

Um Abläufe im Apoplasten oder im Inneren der Pflanzenzelle zum eigenen Vorteil zu manipulieren, haben phytopathogene Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, eigene Substanzen und Proteine in das apoplastische Milieu zu sekretieren oder in die Pflanzenzelle zu translozieren (Büttner and Bonas 2010). Speziell für phytopathogene Bakterien sind Sekretionssysteme essentiell, über die die Sekretion von Toxinen, extrazellulären Enzymen in den Apoplast (z.B. Typ-I-Sekretionssystem) oder die Translokation von DNA und Proteinen (Effektoren) in die Pflanzenzelle erfolgt (z.B.: Typ-IV- und Typ-III-Sekretionssystem) (Büttner and Bonas 2010). Effektoren können die PTI unterdrücken und so zur Virulenz eines Pathogens beitragen (*effector-triggered susceptibility* - ETS, (Jones and Dangl 2006); Abbildung 1.1.1). Pflanzen haben ihrerseits Resistenzgene (resultierende R-Proteine sind meist *nucleotide-binding-leucine-rich-repeat* - NB-LRR) entwickelt, um Effektoren im Inneren der Pflanzenzelle zu erkennen (Cui *et al.* 2014). Die Erkennung erfolgt entweder durch direkte Bindung des Effektors oder indirekt durch die Bindung Effektor-modifizierter pflanzlicher Proteine (Abbildung 1.1.1). Die R-Protein-vermittelte Erkennung von Effektoren führt zu einer Resistenzreaktion, die in ihrer Intensität die PTI übersteigt (*effector-triggered immunity* - ETI; (Jones and Dangl 2006; Cui *et al.* 2014); Abbildung 1.1.1). Die ETI geht in der Regel mit einem rapiden lokalen Zelltod einher, der als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird. Eine besondere Klasse von Typ-III-sekretierten Effektorproteinen stellen TAL Effektoren dar (*transcription activator-like effectors* - TALEs), die in der Pflanzenzelle als Transkriptionsaktivatoren wirken. Diese Proteinklasse ist begrenzt auf phytopathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas* mit entfernten Homologen in *Ralstonia solanacearum* und *Burkholderia rhizoxinica* (Boch *et al.* 2014). Der erste identifizierte und zugleich am besten untersuchte TALE ist AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) dem Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*; (Bonas *et al.* 1989)).

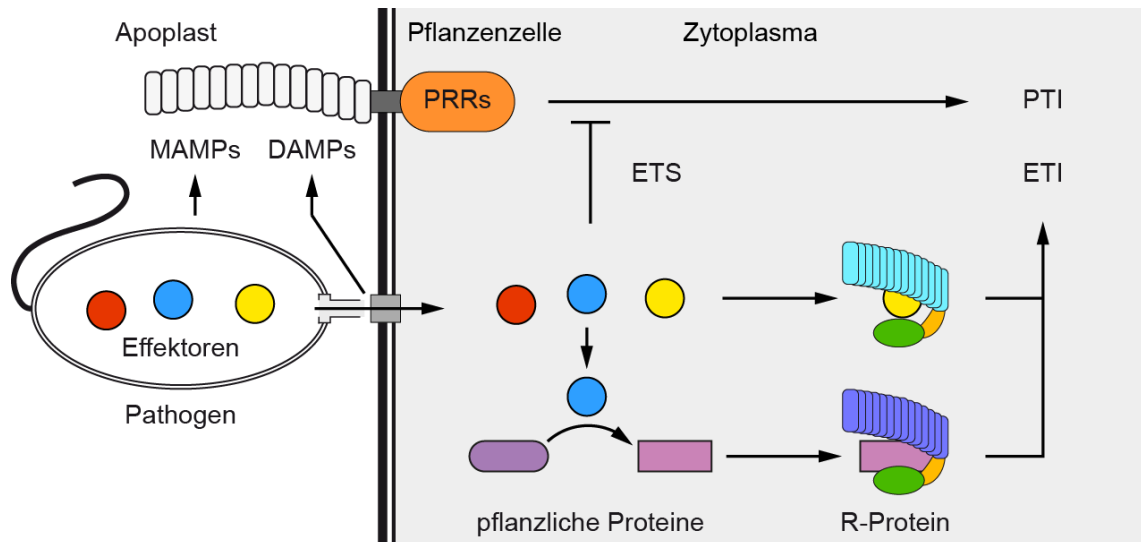


Abbildung 1.1.1: Modell pflanzlicher Abwehrmechanismen am Beispiel von phytopathogenen Bakterien.

Phytopathogene Bakterien dringen in den Zellzwischenraum (Apoplast) des Pflanzengewebes ein. Pflanzen erkennen mikrobielle Moleküle (*microbe-associated molecular patterns* - MAMPs) bzw. pflanzliche Moleküle (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs), die durch die Aktivität des Pathogens freigesetzt werden, mittels membranständigen Rezeptoren (*pattern recognition receptors* - PRRs). Die Erkennung von PAMPs und DAMPs führt zur ersten Stufe der Pflanzenabwehr (*pattern triggered immunity* - PTI; Basalabwehr). Pathogene schleusen Proteine (Effektoren) in die Pflanzenzelle, die zu einer Unterdrückung der PTI und damit zur Anfälligkeit der Pflanze gegenüber dem Pathogen führen (*effector-triggered susceptibility* - ETS). In resistenten Pflanzen können die Effektoren oder Effektor-modifizierte pflanzliche Proteine durch die spezifische Bindung von Resistenzproteinen (R-Protein, meist *nucleotide-binding-leucine-rich-repeat* - NB-LRR) erkannt werden, wodurch eine verstärkte Abwehrreaktion ausgelöst wird (*effector-triggered immunity* - ETI).

1.2. TAL Effektoren

1.2.1. AvrBs3-basierte Interaktion zwischen *Xcv* und *C. annuum*

AvrBs3 aus *Xcv* ist namensgebender Vertreter der TALE- bzw. AvrBs3-Proteinfamilie (Bonas *et al.* 1989). Dieses Effektorprotein ist konstitutiv in *Xcv* synthetisiert und wird über das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle transloziert (Knoop *et al.* 1991; Szurek *et al.* 2002). Im pflanzlichen Zytoplasma dimerisiert AvrBs3 und wird von Importin α (Imp α) gebunden, das zusammen mit Importin β den Proteinimport in den Zellkern vermittelt ((Szurek *et al.* 2001; Gürlebeck *et al.* 2005); Abbildung 1.2.1). Im pflanzlichen Zellkern bindet AvrBs3 an spezifische DNA-Sequenzen (UPA-Boxen) und induziert mehr als 20 UPA-Gene in *C. annuum* (*upregulated by AvrBs3* - UPA;

(Marois *et al.* 2002; Kay *et al.* 2007; Römer *et al.* 2007; Kay *et al.* 2009); Abbildung 1.2.1). Die Behandlung des Translationshemmers Cycloheximid zeigte, dass es sich bei den *UPA*-Genen sowohl um indirekte (*UPA1-9*) als auch direkte (*UPA10-11*, *UPA14-25*) Zielgene von AvrBs3 handelt (Marois *et al.* 2002; Kay *et al.* 2007; Kay *et al.* 2009). Direkte Zielgene von AvrBs3, weisen eine *UPA*-Box in ihren Promotoren auf (Kay *et al.* 2009). Unter den *UPA*-Genen befinden sich unter anderem Gene für die Auxin-Biosynthese (*UPA1-5*), α -Expansine (*UPA6-7*), ein Nodulin der MtN3-Familie (*UPA16*) und Transkriptionsfaktoren (*UPA17* und *UPA20*). Ein gut charakterisiertes *UPA*-Gen ist *UPA20*, welches für einen *basic-helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktor kodiert. In suszeptiblen *C. annuum* Pflanzen (*Early California Wonder* - ECW) ist die AvrBs3-vermittelte transkriptionelle Induktion von *UPA20* hinreichend für die Ausbildung einer Hypertrophie ((Kay *et al.* 2007); Abbildung 1.2.1). Bei der AvrBs3-vermittelten Hypertrophie handelt es sich um eine Vergrößerung der Mesophyllzellen, wodurch ein Aufplatzen der Blattunterseite verursacht wird ((Kay *et al.* 2007); Abbildung 1.2.1). Es wird angenommen, dass diese Reaktion zur Verbreitung von *Xcv* beiträgt (Kay *et al.* 2007). In resistenten *C. annuum* Pflanzen (ECW-30R)

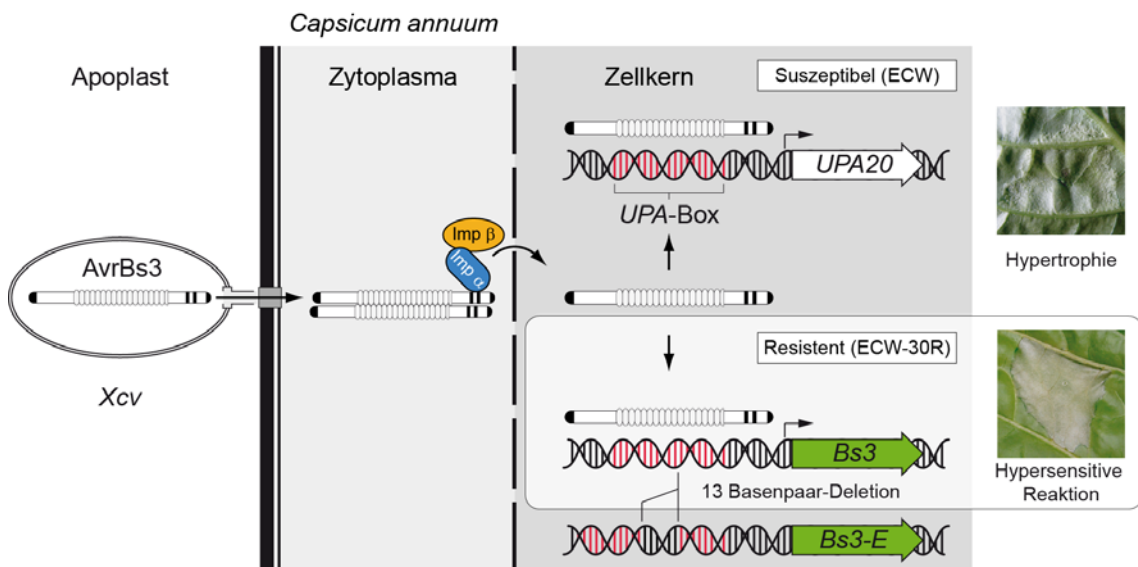


Abbildung 1.2.1: Modell der AvrBs3-Aktivität in *C. annuum*.

AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) wird über das Typ-III-Sekretionssystem in das Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert. AvrBs3 dimerisiert im pflanzlichen Zytoplasma und wird über die spezifische Interaktion mit Importin α (Imp α) mit Hilfe der Kernimportmaschinerie in den Zellkern transportiert. AvrBs3 bindet spezifische DNA-Sequenzen (*UPA*-Box, *upregulated by AvrBs3*) und induziert die Transkription *downstream*-gelegener Gene (*UPA*-Gene). In suszeptiblen Pflanzen (*Early California Wonder* - ECW) führt die Induktion von *UPA20* zu einer Vergrößerung der Mesophyllzellen (Hypertrophie). In resistenten Pflanzen (ECW-30R) wird zusätzlich das Resistenzgen *Bs3* durch AvrBs3 induziert, wodurch ein schneller lokaler Zelltod verursacht wird (hypersensitive Reaktion, HR).

induziert AvrBs3 zusätzlich das Resistenzgen *Bs3* (*bacterial spot resistance gene 3*), wodurch eine rasche lokale Zelltodreaktion ausgelöst wird (hypersensitive Reaktion, HR; (Römer *et al.* 2007)). Suszeptible Paprikapflanzen (ECW) enthalten ebenfalls den *Bs3-locus* (*Bs3-E*), jedoch liegt im Promotor dieses Gens eine 13 Basenpaar-Insertion vor, wodurch die *UPA*-Box unterbrochen wird und *Bs3-E* nicht durch AvrBs3 induzierbar ist ((Römer *et al.* 2007); Abbildung 1.2.1). Aufgrund der Sensibilität dieser pflanzlichen Reaktion stellt die AvrBs3-vermittelte *Bs3*-HR einen geeigneten qualitativen Reporterassay zur Funktionsanalyse artifizieller AvrBs3-Derivate und DNA-Zielsequenzen dar (HR-Assay; (Römer *et al.* 2009)).

1.2.2. Aufbau von AvrBs3

AvrBs3 besitzt mehrere funktionsrelevante Elemente. In den Aminosäuren (AS) 1-50 der N-terminalen Region (NTR) befindet sich ein Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal (T3S), welches essentiell für die Translokation von AvrBs3 in die Pflanzenzelle ist ((Szurek *et al.* 2002); Abbildung 1.2.2). Zentral erstreckt sich die, aus 17,5 Wiederholungen eines fast identischen 34 AS-Sequenzmotivs (*repeat*) bestehende, DNA-Bindedomäne (*repeat*-Region; (Boch and Bonas 2010)). Der letzte *repeat* besitzt nur die ersten 20 AS des 34 AS-Sequenzmotivs und wurde daher als „halber“ *repeat* definiert. Die *repeats* sind hoch konserviert und unterscheiden sich hauptsächlich an den AS-Positionen 12 und 13 (*repeat-variable diresidue* - RVD; Abbildung 1.2.2). In der C-terminalen Region (CTR) befinden sich zwei Kernlokalisierungssignale (nuclear localization signal - NLS) und eine saure Aktivierungsdomäne (activation domain - AD; AS 1134-1164; (Van den Ackerveken *et al.* 1996; Szurek *et al.* 2001; Marois *et al.* 2002)). Die beiden NLS vermitteln die Interaktion mit Imp α und sind essentiell für die Kernlokalisierung von AvrBs3 (Szurek *et al.* 2001). Die Aktivierungsdomäne ist notwendig für die transkriptionelle Induktion von Zielgenen, wobei sowohl die zugrunde liegenden Mechanismen als auch die daran beteiligten Proteine derzeit nicht vollständig aufgedeckt sind. TALEs aus *Xanthomonas* sind hoch konserviert (80 % bis 97 % identisch auf AS-Ebene; (Schornack *et al.* 2006)) und weisen stets diese für die Funktion notwendigen Elemente auf.

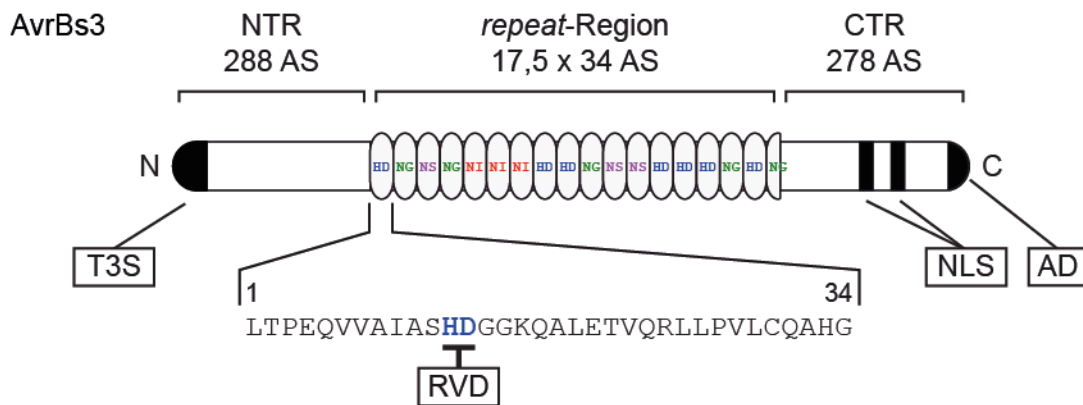


Abbildung 1.2.2: Genereller Aufbau von AvrBs3.

AvrBs3 ist aus drei Domänen zusammengesetzt: N-terminale Region (NTR), repeat-Region und C-terminale Region (CTR). Die Aminosäuren (AS) 1-50 der NTR beinhalten ein Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal (T3S). Die repeat-Region besteht aus 17,5 Wiederholungen eines 34 AS-Motivs (repeat). Die AS-Sequenz der repeats unterscheidet sich hauptsächlich an den Positionen 12 und 13 (repeat-variable diresidue - RVD). Die CTR enthält zwei funktionale Kernlokalisationssignale (nuclear localization signal - NLS) und eine saure Aktivierungsdomäne (activation domain - AD).

1.2.3. Dimerisierung von AvrBs3

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass AvrBs3 Homodimere ausbildet. Die Dimerisierung wurde *in vitro* (GST pull-down, *blue-native* PAGE), in Hefe (Hefediybrid-Studien) und *in planta* bestätigt (Gürlebeck *et al.* 2005). Auch für die AvrBs3-Homologen PthA1-4 aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* wurde eine Dimerisation mittels Hefediybrid-Studien nachgewiesen (Domingues *et al.* 2010). Die Analyse von AvrBs3-Deletionsderivaten führte weiterhin zu der Erkenntnis, dass die repeat-Region für eine Dimerisierung notwendig ist (Gürlebeck *et al.* 2005). Bei Lokalisationsstudien in *N. benthamiana* wurde zudem ein Kernimport von AvrBs3-Dimeren beobachtet (Gürlebeck *et al.* 2005). Die *Xanthomonas*-vermittelte Translokation der AvrBs3-Deletionsderivate AvrBs3- Δ AD und AvrBs3- Δ rep16 führte zu einer HR-Induktion in *C. annuum* ECW-30R (Gürlebeck *et al.* 2005). Da die separate Translokation dieser Deletionsderivate zu keiner HR-führte, wurde weiterhin eine Dimerisierung von AvrBs3 an der DNA-Zielsequenz vermutet (Gürlebeck *et al.* 2005). Obwohl die Dimerisierung von TALEs an Hand mehrerer Experimente belegt werden konnte, sind die dafür grundlegenden Mechanismen sowie deren biologische Funktion bisher nicht bekannt.

1.2.4. Die Entdeckung des TALE-Code

Die an Hand von AvrBs3 gesammelten Erkenntnisse lieferten die Grundlage für die Entschlüsselung des TALE-Code. AvrBs3 bindet direkt an die *UPA*-Box in Promotoren direkter AvrBs3-Zielgene. Die *UPA*-Box besteht aus 19 Basen und die AvrBs3 *repeat*-Region aus 17,5 *repeats*. Es wurde vermutet, dass ein *repeat* die Bindung eines Basenpaares vermittelt. Da die RVDs der Hauptsächliche Unterschied zwischen den *repeats* sind, wurde die Abfolge der RVDs mit der Konsensussequenz der *UPA*-Box verglichen und eine RVD-vermittelte Basenspezifität der *repeats* identifiziert ((Boch *et al.* 2009); Abbildung 1.2.3). Dies konnte sowohl experimentell als auch bioinformatisch an Hand weiterer natürlicher TALEs und deren Zielgene bestätigt werden (Boch *et al.* 2009; Moscou and Bogdanove 2009). Bei der DNA-Bindung eines TALEs übernimmt ein *repeat* die Bindung eines Basenpaares in der DNA-Zielsequenz, wobei die Bindspezifität eines *repeats* durch den RVD bestimmt wird (Abbildung 1.2.3). Die in der Natur am häufigsten vorkommenden RVDs vermitteln entweder die Spezifität für eine Base (HD = Cytosin, NI = Adenin, NG = Thymin), für zwei Basen (NN = Guanin/Adenin, N* = Thymin/Cytosin) oder tolerieren alle Basen (NS = Guanin/Adenin/Cytosin/Thymin) (N* kennzeichnet *repeats* mit einer Deletion der 13. AS; (Boch *et al.* 2009; Streubel *et al.* 2012); Abbildung 1.2.3 B). Demzufolge definiert die RVD-Abfolge eines TALEs dessen DNA-Zielsequenz. Zusätzlich wurde

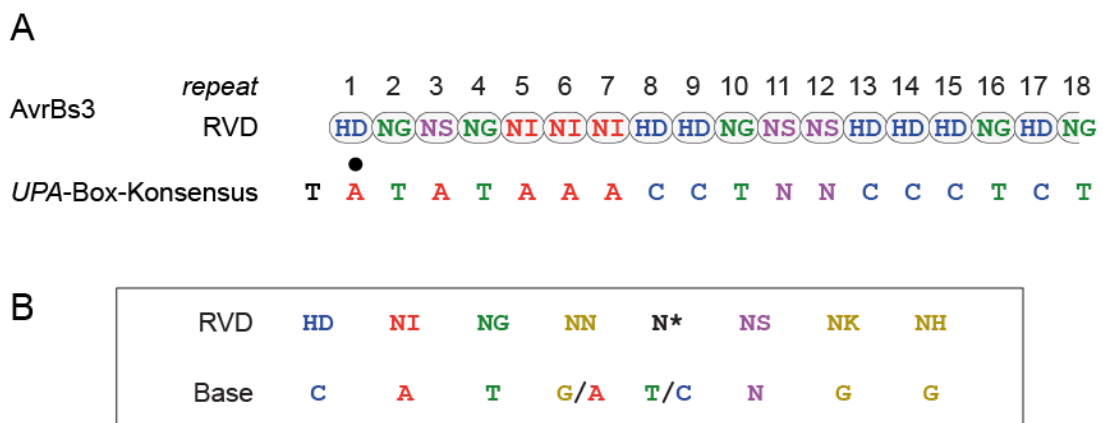


Abbildung 1.2.3: Der TALE-Code.

(A) Gezeigt ist der Vergleich der RVD-Abfolge von AvrBs3 mit der *UPA*-Box Konsensussequenz. Die Bindspezifitäten der *repeats* sind farblich illustriert. Punkte kennzeichnen RVD-Base-Fehlpaarungen (*mismatches*). (B) In der Natur am häufigsten vorkommende RVDs und deren korrespondierende Basenspezifität. RVDs: H - Histidin; D - Asparaginsäure; N - Asparagin; I - Isoleucin; G - Glycin; S - Serin; K - Lysin; * - Deletion der 13. AS. Basen: A - Adenin; C - Cytosin; G - Guanin; T - Thymin; N - alle Basen.

entdeckt, dass RVD-definierte DNA-Zielsequenzen von TALEs am 5` Ende fast ausschließlich von einem Thymin (T₀, Position „null“) angeführt werden (Abbildung 1.2.3 A). DNA-Zielsequenzen von TALEs werden auch als *effector binding element* (*EBE*) bezeichnet.

1.2.5. TALE-basierte Interaktion zwischen *Xanthomonas* und Pflanzen

Die Entdeckung des TALE-Code ermöglicht die Vorhersage von DNA-Zielsequenzen natürlicher TALEs und vereinfachte die Identifizierung von TALE-Zielgenen. Dies trug wesentlich zum Verständnis der TALE-basierten Interaktion zwischen *Xanthomonas* und deren Wirtspflanzen bei. Während in *Xcv* nur zwei TALEs identifiziert wurden (*AvrBs3* und *AvrBs4*), besitzen beispielsweise Reis-Pathogene der Gattung *Xanthomonas* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*)) eine Vielzahl an TALEs. Durch die TALE-vermittelte transkriptionelle Aktivierung pflanzlicher Gene, manipulieren Phytopathogene der Gattung *Xanthomonas* ihre Wirtspflanzen auf verschiedene Weise. Gene, deren Induktion essentiell für die Virulenz des Pathogens ist, werden als Suszeptibilitätsgene bezeichnet. Zum einen können die apoplastischen Bedingungen oder Bedingungen im Xylem durch das Anschalten Transporter-kodierender Gene verändert werden. So führt die TALE-induzierte Synthese von Zuckertransportern (OsSWEETs) zu einer erhöhten Zuckerkonzentration des Apoplast bzw. Xylems, was essentiell für die Virulenz von *Xoo* in Reispflanzen ist (Yang *et al.* 2006; Antony *et al.* 2010; Yu *et al.* 2011; Streubel *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2015). Andererseits werden vermutlich für *Xoo*-wachstumshemmende Substanzen wie Kupfer und Sulfat durch TALE-induzierte Transporter aus dem Apoplasten bzw. Xylem in das Innere von Pflanzenzellen aufgenommen (Yuan *et al.* 2010; Cernadas *et al.* 2014). Eine weitere Möglichkeit ist die transkriptionelle Umprogrammierung der Pflanzenzelle durch die TALE-vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Kay *et al.* 2007; Sugio *et al.* 2007; Hu *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2014). Meist geht damit eine vermehrte Zellteilung (Hyperplasie, *citrus canker* z.B. *CsLOB*; (Hu *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2014)) oder eine Vergrößerung von Pflanzenzellen (Hypertrophie; z.B. *UPA20*; (Kay *et al.* 2007); Abbildung 1.2.1) einher.

Im Laufe der Zeit haben Pflanzen verschiedene Resistenzmechanismen gegen TALEs entwickelt. Zum einen können die TALE-DNA-Zielsequenzen in Promotoren von

Suszeptibilitätsgenen durch Mutationen verändert werden. Dies führt zum Ausbleiben der TALE-vermittelten Induktion und damit zu einer verminderten Virulenz des Pathogens (rezessives Resistenzgen, z.B. allelische Variante von *OsSWEET11* (*xa13*); (Yang *et al.* 2006; Yuan *et al.* 2009)). In manchen Fällen sind die Pflanzen auf den sequenziellen Erhalt der Suszeptibilitätsgene angewiesen, da diese an Entwicklungsprozessen beteiligt sind (z.B. *OsSWEET14*, Suszeptibilitätsgen der TALEs AvrXa7, PthXo3, TalC, Tal5; (Liu *et al.* 2014)). Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung der TALE-Aktivität ist die Mutation in Genen, welche für Komponenten der Polymerase-II-abhängigen Transkriptionsmaschinerie kodieren. Beispielsweise führt ein AS-Austausch in der γ -Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIIA (*OsTFIIA γ 5*(V39E), *xa5*) in homozygoten *xa5*-Reispflanzen zu einer deutlichen Reduktion der TALE-Aktivität und damit zu einer verminderten Virulenz von *Xoo* (Iyer and McCouch 2004; Sugio *et al.* 2007; Iyer-Pascuzzi *et al.* 2008; Gu *et al.* 2009a). Interessanterweise bewirkt die Induktion des *Xa5*-Homologs *OsTFIIA γ 1* durch den TALE PthXo7 eine zumindest teilweise Wiederherstellung der Virulenz von *Xoo* (Sugio *et al.* 2007). Dies führte zu der Hypothese, dass der generelle Transkriptionsfaktor TFIIA γ an der TALE-vermittelten transkriptionellen Induktion beteiligt sein könnte. TALEs können zudem durch R-Proteine erkannt werden. Bisher ist lediglich das Protein Bs4 (ein NB-LRR) aus Tomate bekannt, welches den TALE AvrBs4 aus *Xcv* im Zytoplasma der Pflanzenzelle erkennt und eine HR auslöst (Schornack *et al.* 2004). Neben der direkten Bindung von TALEs auf Proteinebene, haben Pflanzen TALE-induzierbare Resistenzgene (*executer R-genes*) entwickelt, deren Induktion zu einer HR führt und somit die weitere Verbreitung des Pathogens verhindert (z.B.: *Bs3*, Abbildung 1.2.1; (Gu *et al.* 2005; Römer *et al.* 2007; Strauss *et al.* 2012; Tian *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). Diese Resistenzgene sind dominant und eignen sich zur Generierung resistenter Pflanzenlinien durch Kreuzungen oder biotechnologische Modifikation (Hummel *et al.* 2012).

1.2.6. Erstellung artifizierlicher TALEs

Die Modularität der TALE-DNA-Bindedomäne ermöglicht die Erstellung artifizierlicher TALEs (*designer* TALEs, dTALEs) mit programmierbarer DNA-Bindenspezifität durch die gerichtete Klonierung einer beliebigen *repeat*-Abfolge (*golden gate cloning*, *automated high throughput cloning*; (Cermak *et al.* 2011; Geißler *et al.* 2011; Morbitzer *et al.* 2011; Weber *et al.* 2011; Briggs *et al.* 2012; Reyon *et al.* 2012; Kim *et al.* 2013;

Schmid-Burgk *et al.* 2013). Obwohl die Spezifität von einzelnen *repeats* unabhängig vom Kontext benachbarter *repeats* ist, gibt es dennoch zu beachtende Regeln bei der Generierung aktiver dTALEs. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine minimale Anzahl von *repeats* (ca. 10,5) notwendig ist um die Aktivität eines dTALEs *in planta* zu gewährleisten (Boch *et al.* 2009). Des Weiteren, erwiesen sich Wiederholungen gleicher *repeat*-Typen (z.B.: poly-NG-*repeats*) als unvorteilhaft und bewirkten eine schwache Aktivität bzw. den Funktionsverlust von TALEs (Boch *et al.* 2009). Darüber hinaus beeinflusst die RVD-Komposition direkt die DNA-Bindeaffinität eines TALEs auch in Abwesenheit von RVD-Base-Fehlpaarungen (Streubel *et al.* 2012; Meckler *et al.* 2013). Diese Erkenntnisse führten zur Klassifizierung von *repeats* (RVDs) in stark (HD; NN(Guanin)), intermediär (NN(Adenin); NS; NH) und schwach (NG; NI; NK) (Streubel *et al.* 2012). Starke *repeats* tragen positiv zur DNA-Bindeaffinität eines dTALEs bei. Im Gegensatz dazu kann eine RVD-Komposition mit ausschließlich schwachen *repeats* zu einer reduzierten DNA-Bindeaffinität sowie zum Aktivitätsverlust eines dTALEs führen (Streubel *et al.* 2012; Meckler *et al.* 2013). Als Richtlinie für die Erstellung von dTALEs mit hoher Aktivität sollten innerhalb der RVD-Komposition mindestens zwei bis drei starke *repeats* vorhanden und gleichmäßig verteilt sein sowie die Aneinanderreihung gleicher *repeat*-Typen verwieden werden (Streubel *et al.* 2012).

1.2.7. TALE-DNA-Bindedomäne

Röntgenkristallstrukturanalysen gaben Aufschluss über die molekularen Grundlagen der spezifischen TALE-DNA-Bindung sowie über die Eigenschaften einzelner *repeat*-Typen. Die Sekundärstruktur der TALE-DNA-Bindedomäne besteht aus α -Helices, die in der Tertiärstruktur eine flexible superhelikale Konformation hintereinander gereihter *hairpin*-Domänen (*repeats*) einnehmen ((Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012); Abbildung 1.2.4 A). Eine komplette Windung (360°) umfasst 11 *repeats*, deren Länge bei der DNA-Bindung komprimiert, ohne jedoch den Durchmesser zu verändern (Murakami *et al.* 2010; Deng *et al.* 2012). In der DNA-gebundenen Form des TALEs umgibt die DNA-Bindedomäne das doppelsträngige DNA-Fragment mit einer Stöchiometrie von 1:1 (ein Molekül TALE bindet ein Molekül doppelsträngige DNA). Der TALE bildet dabei ausschließlich Kontakte zu den Basen und Phosphat-Gruppen des kodierenden Strangs aus ((Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012); Abbildung 1.2.4). Computer-basierte Analysen (*molecular dynamics simulation* - MD-Simulation) zeigen, dass die DNA-

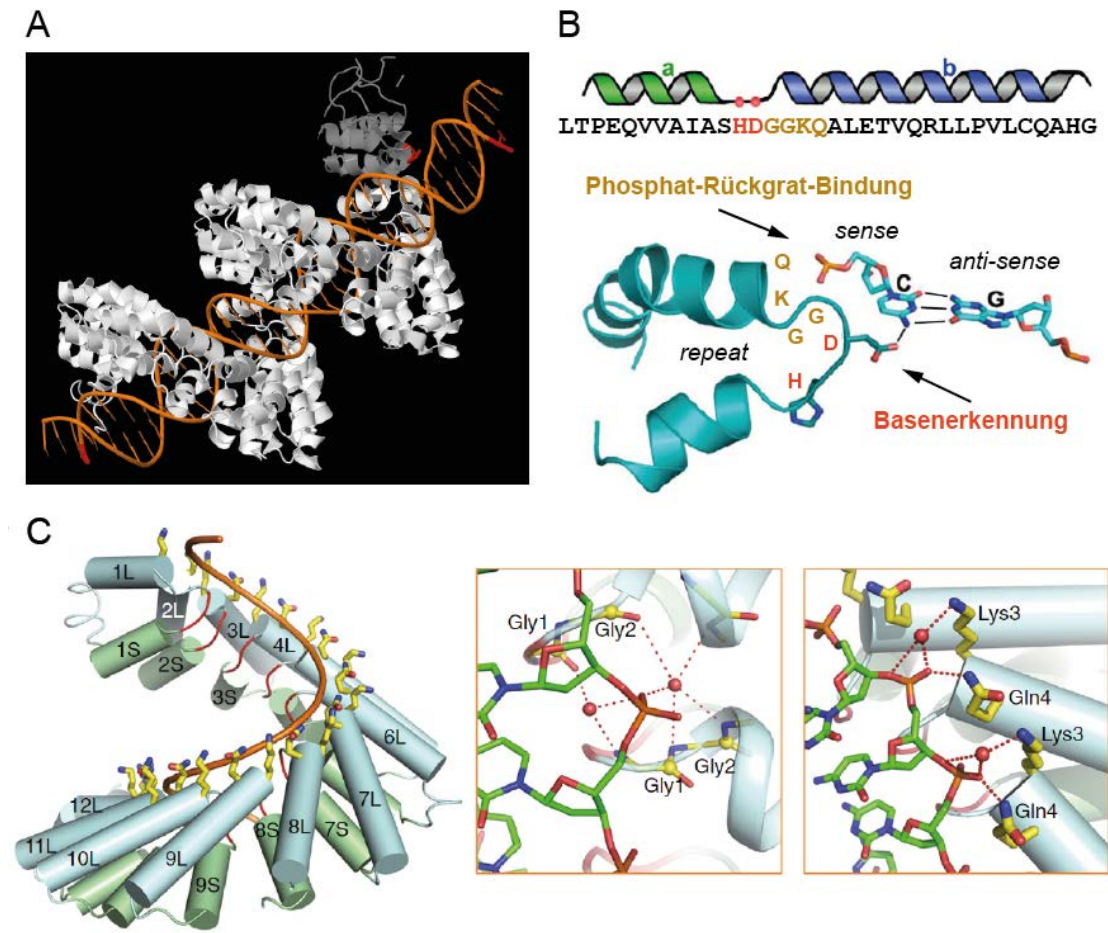


Abbildung 1.2.4: TALE-DNA-Interaktion.

(A) Röntgenkristallstruktur von DNA-gebundenem AvrBs3-Homolog Pthxo1 (Grau - NTR, Weiß - *repeat*-Region, Orange - doppelsträngige DNA; Abb. modifiziert nach (Mak *et al.* 2012)). (B) Interaktionen zwischen einzelnen *repeats* und der DNA. Die Aminosäure an Position 13 (*base-specific residue* - BSR) bildet spezifische Interaktionen zur korrespondierenden Base aus. Die Aminosäuren an Position 14-17 (*oxyanion-clip*) koordinieren die Phosphatgruppe des Zucker-Phosphat-Rückgrats des kodierenden Strangs (Abb. modifiziert nach (Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012)). (C) Detaillierte Ansicht der Interaktionen zwischen dem *oxyanion-clip* und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat des kodierenden Strangs. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte, rote Linien und Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt (Abb.: (Deng *et al.* 2012)).

gebundene Form der TALE-DNA-Bindedomäne weniger flexibel ist und durch das doppelsträngige DNA-Fragment stabilisiert wird (Wan *et al.* 2013). Jeder *repeat* besteht aus 2 α -Helices und einem *loop* in dem sich die RVDs befinden (RVD-*loop*, Abbildung 1.2.4 B). Während ausschließlich die Aminosäure an Position 13 spezifische Kontakte zu der korrespondierenden Base ausbildet (*base-specific residue*; BSR; (de Lange *et al.* 2014)), interagiert die Aminosäure an Position 12 mit den Aminosäuren Alanin (Ala8) bzw. Isoleucin (Iso9) desselben *repeats* ((Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012; Wicky *et al.* 2013); Abbildung 1.2.4 B). Die Aminosäure an Position 12 (hauptsächlich Histidin (H) und Asparagin (N)) besitzt eine strukturgebende Funktion und nimmt keinen entscheidenden Einfluss auf die DNA-Bindenspezifität eines *repeats* (Yang *et al.*

2014; Juillerat *et al.* 2015; Miller *et al.* 2015). Neben der spezifischen Interaktion zwischen dem BSR und der korrespondierenden Base, koordiniert jeder *repeat* über die Aminosäuren an Position 14-17 (GGKQ) die Phosphat-Gruppe des Nukleotids eine Position *upstream* des DNA-Ziel-Nukleotids (*oxyanion-clip*, (Deng *et al.* 2012; Wicky *et al.* 2013); Abbildung 1.2.4 B und C). Dabei bilden die AS an den Positionen 14-16 (GGK) indirekte, Wasser-vermittelte und die AS an Position 17 (Q) direkte

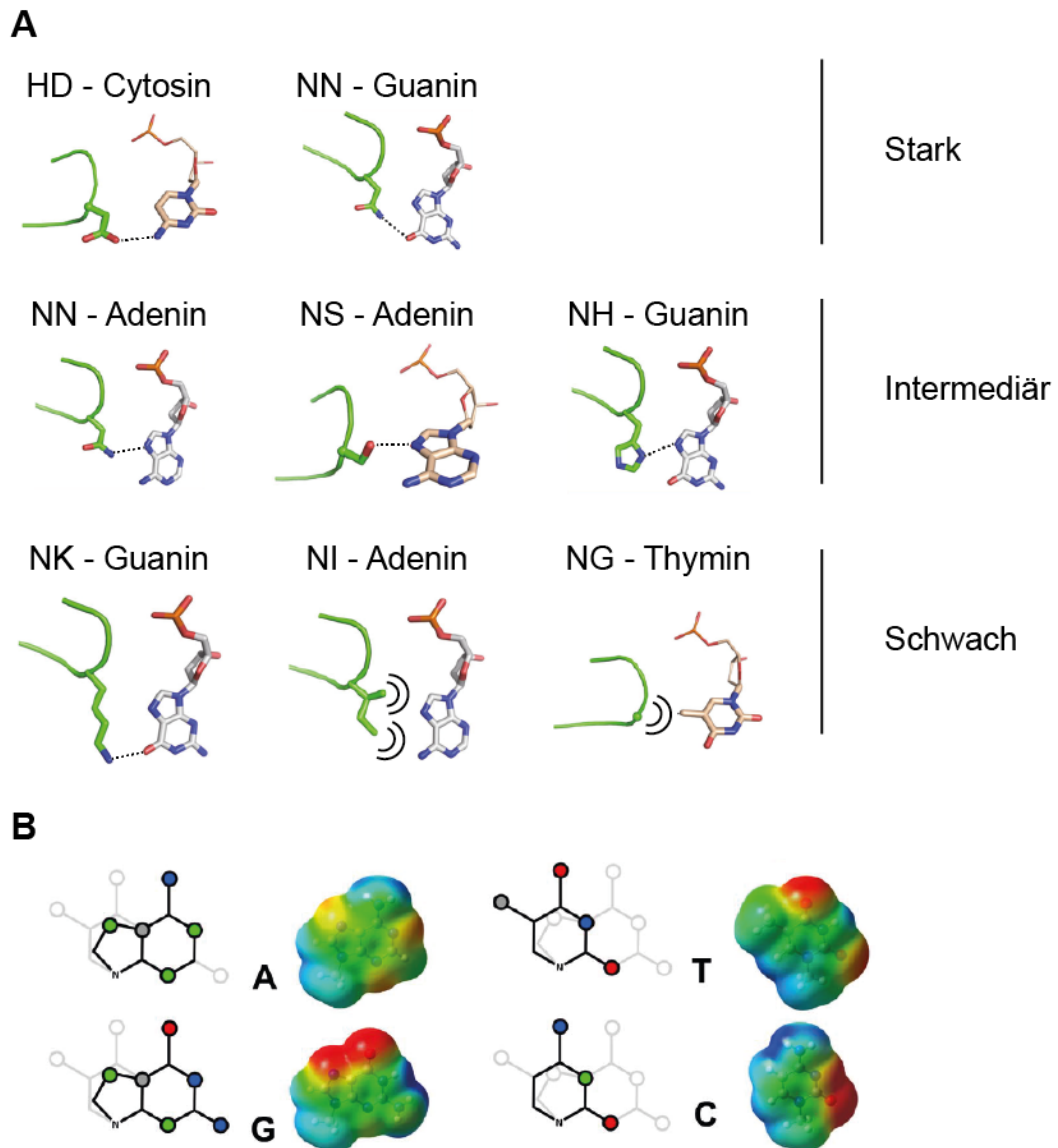


Abbildung 1.2.5: Charakteristik der RVD-Base-Interaktionen.

(A) Übersicht, Klassifizierung und struktureller Hintergrund der RVD-Base-Interaktion. RVD-Base-Interaktionen sind in stark, intermediär und schwach eingeteilt (Streubel *et al.* 2012). RVDs interagieren entweder mittels Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linie) oder mittels Van-der-Waals-Interaktionen (Bogen) mit der korrespondierenden Base (Abb. verändert nach (Deng *et al.* 2014)). **(B)** Schematischer Aufbau und elektrostatisches Potential an der Oberfläche von Basen (Abb. (Wicky *et al.* 2013)). Roter Punkt - Sauerstoff (O); Grau - Kohlenstoff (C); Grün - Stickstoff (N); Blau - Aminogruppe (NH bzw. NH₂); Rot - negative Ladung; Blau - positive Ladung.

Wasserstoffbrücken zur Phosphat-Gruppe aus (Abbildung 1.2.4 C). MD-Simulationen eines TALE-DNA-Komplexes deuten an, dass die Interaktion zwischen dem *oxyanion-clip* und der Phosphatgruppe eines Nukleotids den größten energetischen Anteil an der DNA-Bindeaffinität eines TALEs besitzt. Die Interaktion zwischen dem BSR und der korrespondierenden Base leisten demzufolge einen untergeordneten Beitrag zur Affinität des TALEs (Wicky *et al.* 2013). Der postulierte starke Einfluss des *oxyanion-clip* zur TALE-DNA-Bindeaffinität basiert auf MD-Simulationen eines DNA-gebundenen TALEs. Grundvoraussetzung für die DNA-gebundene Konformation ist die BSR-vermittelte Sequenzspezifität, welche durch die Kombination von spezifischer Basen-Bindung und sterischer Basen-Diskriminierung erfolgt.

Röntgenkristallstrukturanalysen von TALE-DNA-Komplexen lieferten zugleich Erklärungen für die experimentell bestätigten unterschiedlichen Stärken einzelner RVDs. Die RVD-Base-Interaktionen beruhen entweder auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken oder von Van-der-Waals-Interaktionen zwischen dem BSR und der korrespondierenden Base ((Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012; Deng *et al.* 2014); Abbildung 1.2.5 A). Schwache *repeats* bilden ausschließlich Van-der-Waals-Interaktionen zwischen dem BSR und der korrespondierenden Base aus (z.B.: NG - Thymin, NI - Adenin, N* - Thymin/Cytosin; Abbildung 1.2.5 A). *repeats* deren BSR Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen ausbilden sind sowohl als schwach (NK - Guanin), intermediär (NN - Adenin, NH - Guanin, NS - Guanin/Adenin/Cytosin/Thymin) als auch stark (HD - Cytosin; NN - Guanin) klassifiziert worden (Abbildung 1.2.5 A). Die Positionierung des BSR relativ zur Base ist durch die *oxyanion-clip*-vermittelte Koordinierung der Phosphatgruppe fixiert. Bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung beeinflusst die Länge der BSR-Seitenkette und der Kontaktpunkt der Base die Stärke der RVD-Base-Interaktion. Aminosäuren mit langen Seitenketten, wie Lysin, scheinen sterisch unvorteilhaft und resultieren trotz Wasserstoffbrückenbindung in einer verringerten DNA-Bindeaffinität (Vergleich NN - Guanin mit NK - Guanin; (Streubel *et al.* 2012; Meckler *et al.* 2013); Abbildung 1.2.5 A). Der RVD NN vermittelt die spezifische Bindung zu Adenin (intermediär) und Guanin (stark). Dabei kann der BSR Asparagin (N) bei der Interaktion mit Guanin eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom an Position 7 (N₇) oder zu dem Sauerstoffatom an Position 6 (O₆) des Purinrings ausbilden (Abbildung 1.2.5 A). Das Sauerstoffatom (O₆) in der Base Guanin besitzt eine stärkere Elektronegativität als N₇ und führt vermutlich zu einer stärkeren Bindung zwischen NN - Guanin als NN - Adenin ((Deng *et al.* 2014); Abbildung 1.2.5 B).

1.2.8. TALE-DNA-Bindedomäne (Koordinierung von T₀)

Natürliche TALE-DNA-Zielsequenzen werden von einem Thymin am 5`-Ende angeführt (T₀). Für T₀ wurde gezeigt, dass es essentiell für die TALE-Aktivität ist (Römer *et al.* 2009). Röntgenkristallstrukturanalysen von TALEs deckten auf, dass sich die *repeat*-Region innerhalb der NTR um mindestens vier degenerierte *repeats* fortsetzt (*repeat* -3 bis 0; (Gao *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012; Stella *et al.* 2013); Abbildung 1.2.6). Diese

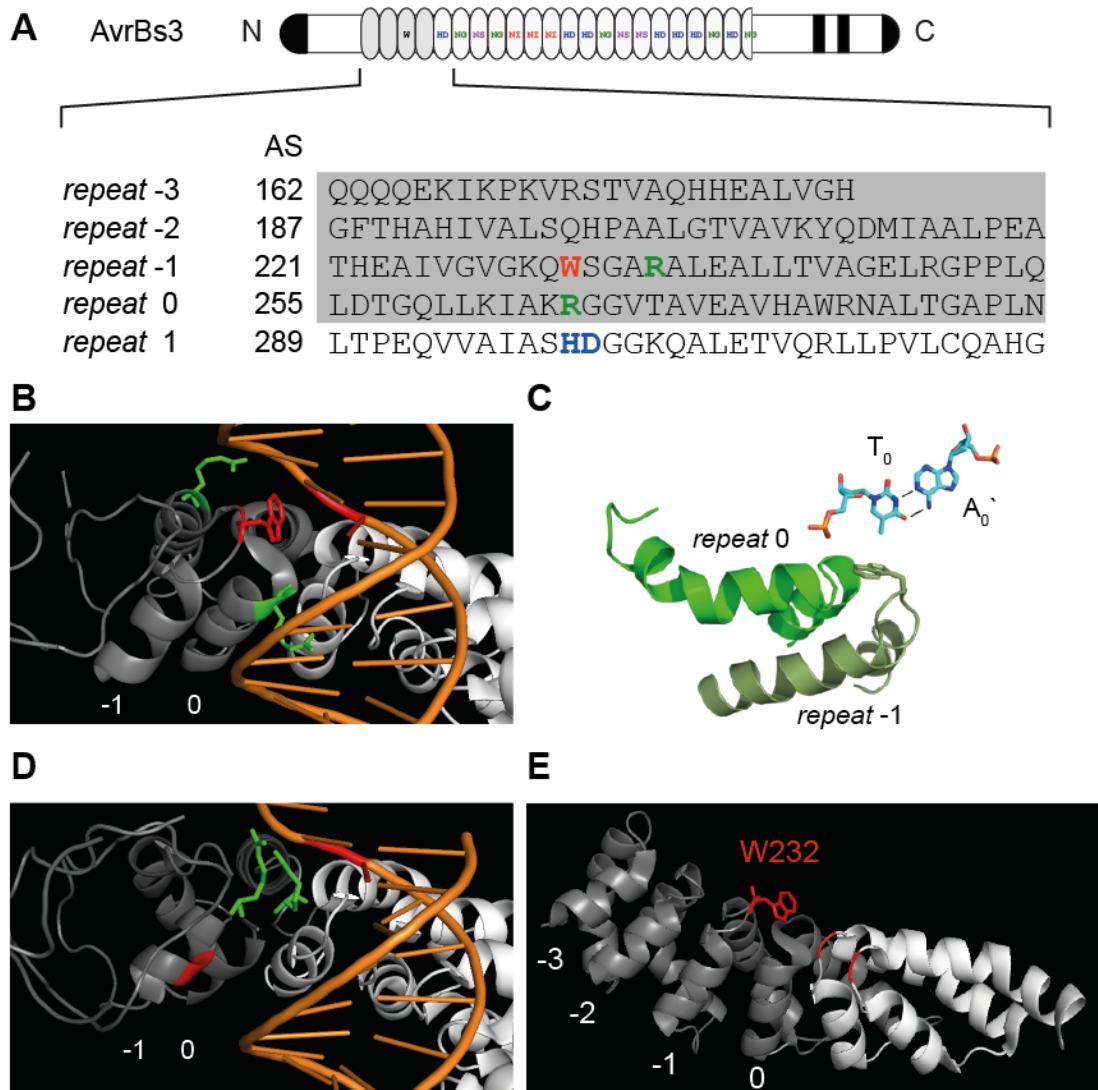


Abbildung 1.2.6: Interaktion zwischen TALE-NTR und DNA.

(A) Die AS-Sequenzen der vier degenerierten *repeats* sind nicht konserviert und unterscheiden sich von den regulären *repeats* (Gao *et al.* 2012). (B) Struktur der NTR des DNA-gebundenen TALEs PthXo1 (Mak *et al.* 2012). Grau - NTR, Weiß - *repeat*-Region, Orange - doppelsträngiges DNA-Fragment, Grün - Arginin-Seitenkette, Rot - Tryptophan-Seitenkette und Thymin an Position 0 des EBEs im kodierenden Strang (T₀). (C) Ausschnitt des TALE-DNA-Komplex mit den degenerierten *repeats* -1 und 0, sowie des T₀-A₀-Basenpaares an Position 0 des EBEs (Abb. (Mak *et al.* 2012)). (D) Struktur der NTR des DNA-gebundenen TALEs AvrBs3 (Stella *et al.* 2013). Farbcode siehe Punkt (B). (E) Struktur der NTR des DNA-freien TALEs dHax3 (Gao *et al.* 2012).

besitzen dieselbe *hairpin*-Struktur, unterscheiden sich aber in der Aminosäuresequenz zu den *repeats* der *repeat*-Region (Abbildung 1.2.6 A). Dieser Bereich der NTR ist zudem notwendig für die TALE-DNA-Interaktion und besitzt auch ohne *repeat*-Region eine unspezifische DNA-Bindeaffinität (Kay *et al.* 2007; Gao *et al.* 2012). Obwohl bereits postuliert wurde, dass der degenerierte *repeat 0* für die Koordinierung des T_0 in TALE-EBEs verantwortlich ist, existieren derzeit widersprüchliche Röntgenkristallstrukturen. Zum einen wurde gezeigt, dass ein Tryptophan in der RVD-*loop* ähnlichen Struktur des *repeats -1* der Base T_0 räumlich am nächsten ist und wahrscheinlich dessen Koordinierung vollzieht (W232; (Gao *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012); Abbildung 1.2.6 B, C und E). Hingegen wies eine weitere Röntgen-Kristallstruktur von DNA-gebundenem AvrBs3 eine andere Konformation der NTR auf. Hierbei wurde postuliert, dass T_0 von einem Arginin in *repeat 0* koordiniert wird (R266; (Stella *et al.* 2013); Abbildung 1.2.6 D). Im Gegensatz zur DNA-freien Konformation sind die *repeats -3* und *-2* in der DNA-gebundenen Form eines TALEs unstrukturiert ((Gao *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012; Stella *et al.* 2013); Abbildung 1.2.6 B, D und E). Zum jetzigen Zeitpunkt konnte nicht geklärt werden welche Konformation die natürliche Situation der T_0 -Koordinierung widerspiegelt.

1.2.9. Anwendung von TALEs

Die Kombination der TALE-DNA-Bindedomäne mit funktionalen Domänen ermöglicht die Generierung biotechnologischer Werkzeuge die vielseitig einsetzbar sind (synthetische Kreisläufe, Genommodifikationen). So wurden unter Anderem dTALE-basierte Aktivatoren, Repressoren, DNA-Nukleasen, DNA-Nickasen, Rekombinasen sowie epigenetische Modifizierer generiert (de Lange *et al.* 2014). Für die robuste und spezifische Aktivität dieser *de novo*-funktionalen dTALE-Derivate sind experimentelle Optimierungen notwendig. Dies ist nach wie vor ein gegenwärtig anhaltender Prozess. Für alle dTALE-basierten Anwendungen wäre die Modifikation bzw. Aufhebung der T_0 -Spezifität ein bedeutender Fortschritt. Die Analyse der T_0 -Koordinierung ist demzufolge von wissenschaftlichen als auch biotechnologischen Interesse. Weiterhin könnte für einige dTALE-basierten Anwendungen die bisher kaum charakterisierte Dimerisierung von TALEs ein wichtiger Faktor sein. Beispielsweise wird bei TALE-Nukleasen (TALENs) die Nukleasedomäne des Restriktionsenzym *FokI* an die TALE-DNA-Bindedomäne fusioniert (Miller *et al.* 2011). Diese Domäne muss dimerisieren damit der Schnitt der DNA (Doppelstrangbruch) erfolgt. Dafür werden zwei TALENs genutzt

die einen *spacer*-flankierende DNA-Zielsequenzen binden und in einer *tail-to-tail* Orientierung die Positionierung und Dimerisierung der *FokI*-Nukleasedomänen gewährleisten (de Lange *et al.* 2014). Eine *repeat*-Region-vermittelte Dimerisierung von TALENs an der DNA, wie sie für AvrBs3 beschrieben wurde (Gürlebeck *et al.* 2005), könnte zu unerwünschten *off-targets* führen. Die Analyse der TALE-Dimerisierung ist demzufolge für die Anwendung von TALENs durchaus relevant. Besonders im Hinblick auf klinische Anwendungen von TALENs zur Behebung genetisch-bedingter Krankheiten am Menschen, sollten alle Eigenschaften der TALE-DNA-Bindedomäne im Detail untersucht und verstanden sein.

1.3. Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die molekularen Grundlagen und die biologische Funktion der für AvrBs3-beschriebenen Dimerisierung analysiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, welchen Einfluss T_0 in der AvrBs3-DNA-Zielsequenz auf die Aktivität von AvrBs3 hat und inwiefern die für TALEs bekannte T_0 -Spezifität durch Mutationen innerhalb der NTR verändert werden kann. Ein langfristiges Ziel sollte dabei sein weitere Einblicke in den Mechanismus der spezifischen DNA-Bindung von TALEs zu generieren.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Medien

Tabelle 2.1: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium (<i>lysogenic broth</i>)	1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; pH 7,0
YEB (<i>yeast extract broth</i>)	0,5 % (w/v) Fleischextrakt; 0,5 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 2 mM MgSO ₄ ; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; pH 7,2
NYG (<i>nutrient yeast glycerol</i>)	0,5 % (w/v) Pepton; 0,3 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (v/v) Glycerol; pH 7,2

Unter Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar wurden die Medien zur Herstellung von Nährplatten verwendet. Vor der Verwendung wurden die Medien mittels Autoklavieren (20 min, 121 °C und 1,1 x 10⁵ Pa) sterilisiert. Für die selektive Kultivierung von Bakterien wurden die Medien mit entsprechenden Mengen Antibiotika versetzt (Tabelle 2.1). Die Lagerung der Flüssigmedien und Nährplatten erfolgte bei 8 °C.

2.1.2. Lösungen und Puffer

Die aufgeführten Puffer wurden am Tag der Verwendung angefertigt oder wenn möglich bei 8 °C gelagert. Bei der Herstellung wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt und die Puffer mittels Autoklavieren (20 min; 121 °C und 1,1 x 10⁵ Pa) sterilisiert.

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x PCR-Puffer	0,5 M KCl; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5); 20 mM MgCl ₂ ; 1 % (v/v) TritonX 100; 0,1 % (w/v) Gelatine
6xLadepuffer	15 % (v/v) Ficoll 400; Orange G
4xLaemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 40 % (v/v) Glycerin; 8 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau
2x nicht-reduzierender SDS-Ladepuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 % (v/v) Glycerin; 3 % (w/v) SDS; 55 % (v/v) β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau
1xTAE-Puffer	1 mM EDTA; 40 mM Tris-HCl; pH 8,0
1xTE-Puffer	0,1 M EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH 8,0
1xTBST-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 0,05 % (v/v) Tween
1xTank-Puffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer	20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST-Puffer
ECL-Detektionslösung	100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 0,75 % (v/v) Luminol (44 mg/ml DMSO); 0,5 % (v/v) Cumarsäure (14 mg/ml DMSO); 0,1 % (v/v) H ₂ O ₂
1xPBS-Puffer	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ Dihydrat; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Lysepuffer	50 mM Tris; 10 mM NaCl, 10 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween20; pH 8,0
Waschpuffer	50 mM Tris; 10 mM NaCl, 40 mM Imidazol; 0,1% (v/v) Tween20; pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM Tris; 10 mM NaCl, 250 mM Imidazol; 0,1% (v/v) Tween20; pH 8,0
Protein-storage-Puffer	50 mM Tris; 10 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; pH 8,0
SDS-Ladepuffer (nicht red.)	100 mM Tris; 10 % (v/v) Glycerin; 3 % (w/v) SDS; Bromphenolblau; pH 8,0
EMSA-Puffer	100 mM KCl; 10 mM HEPES pH 7,5; 5 mM MgSO ₄ ; 5 % (v/v) Glycerin
EMSA-Laufpuffer	0,5x TBE; 1 % (v/v) Glycerin
<i>Agrobacterium</i> Infiltrationsmedium (AIM)	10 mM MgCl ₂ ; 5 mM MES pH 5,3; 150 μM Acetosyringon
Reduziertes Glutathion	50 mM Tris HCL, 40 mM reduziertes Glutathion
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,0); 10 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol; 0,1 % Triton-X100; 0,1 % SDS

2.1.3. Verwendete Antibiotika

Für das selektive Wachstum von Bakterien wurden Flüssigmedien bzw. Nährplatten mit Antibiotika in unter Tabelle 2.3 angegebener Konzentration versetzt.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml (Nährplatte) 50 µg/ml (Flüssigkultur)
Kanamycin (Kan)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cml)	5 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	150 µg/ml

2.1.4. Verwendete Antikörper

Für die Immundetektion Epitop-markierter Proteine wurden im Western Blot Verfahren spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden mit 1x TBST in den in Tabelle 2.4 angegebenen Konzentrationen verdünnt.

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Endkonzentration
Primäre Antikörper	
Anti-His (anti-penta-His; Quiagen)	1 µg/ml
Anti-c-Myc (A-14; Santa Cruz)	1 µg/ml
Anti-GFP (Life Technologies)	1 µg/ml
Anti-AvrBs3 (Knoop <i>et al.</i> 1991)	Nicht bestimmt (1:2000 verwendet)
Anti-GST (Amersham pharmarcia)	0,16 µg/ml
Sekundäre Antikörper	
Anti-Maus (GE Healthcare)	nicht angegeben (1:10000 verwendet)
Anti-Kaninchen (GE Healthcare)	nicht angegeben (1:10000 verwendet)
Anti-Ziege (Sigma Aldrich)	nicht angegeben (1:10000 verwendet)

2.1.5. Oligonukleotide und Plasmide

Für die PCR-basierte Amplifikation von GG-Modulen, die Mutagenese der kodierenden Sequenz von *avrBs3* sowie *AvrBs3* DNA-Zielsequenzen wurden in die Tabelle 2.5 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Weiterhin sind die für EMSA-Studien und qRT-PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide angegeben.

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide

Nummer Name	Sequenz	Verwendung
Hax-N-F	TTTGGTCTCATATGGATCCCATTCGTTTCGCGC	Amplifikation der <i>avrBs3</i> -NTR als GG-Modul
Hax-N-R	TTTGGTCTCAGTTCAGGGGGGCACCCGTCAG	
Hax34_C_F	TTTGGTCTCAAGCATTGTTGCCAGTTATCTC	Amplifikation der <i>avrBs3</i> - bzw. <i>hax2</i> -CTR als GG-Modul (AS 1-158)
Hax2_C_F	TTTGGTCTCAAGCATTTCACAGTTATCTC	
Hax_C_LZ_rev	TTTGGTCTCGGCGAATGCATGCAAAGAC	
Hax_C_C_fwd	TTTGGTCTCTTCGCCGATTCGCTGGAGCGTG	Amplifikation der <i>avrBs3</i> - bzw. <i>hax2</i> -CTR als GG-Modul (AS 157-278)
Hax34_C_R_OS	TTTGGTCTCACACCTGAGGCAATAGCTCCATCAAC	
Hax34_C_R_Stop	TTTGGTCTCAAAGCTTCACTGAGGCAATAGCTCCA TC	
hax2_C_R_Stop	TTTGGTCTCAAAGCTTCAATGAGGCAATAGCTCCA TC	
Hax_rep_fwd	CACTGACGGGTGGGTCTCTGAACCTGACC	Amplifikation der <i>avrBs3</i> - bzw. <i>hax2-repeat</i> -Region
Hax_rep_rev	GGCGAGATAACTGGGTCTCATGCTCTCCAG	
300ΔAD-CTM-R(W5)	TTTGGTCTCAAAGCTTACC GCATCACGGTG	Amplifikation der <i>avrBs3</i> -CTR ohne AD
300ΔAD-CTM-R(WOS)	TTTGGTCTCACACCCGCATCACGGTGCTG	
Rep-Mut_C30S-F	GTTGCCGGTGCTGTCCCAGGCC	Mutagenese der <i>repeat</i> -Module an Position C30S
Rep-Mut_C30S-R	GGCCCTGGGACAGCACCGGCAAC	
AR300_C26S_fwd	GCCTTGCCCTCCCTCGGCGGACGTCC	Mutagenese der Cystein-Codons innerhalb der <i>avrBs3</i> -CTR
AR300_C26S_rev	GGACGTCCGCCGAGGGAGGCCAAGGC	
Mut_C77S_fwd	GGGTTTTTCCAGTCCCACCTCCCACCC	
Mut_C77S_rev	GGGTGGGAGTGGGACTGGAAAAACCC	
delta-N63	TTTGGTCTCATATGGCGTTCTCGGCGGGCAGCTTC	Amplifikation der

Material und Methoden

delta-N92	TTTGGTCTCATATGTTTCGGCGCTCACCATACAGAG	der verkürzten <i>avrBs3</i> -NTR als GG-Module
delta-N120	TTTGGTCTCATATGACCATGCGCGTGGCTGTCAC	
Bsal-300aa153F	TTTGGTCTCATATGGTGGATCTACGCACGCTCG	
Bsal-300aa158F	TTTGGTCTCATATGCTCGGCTACAGCCAGCAGC	
Bsal-300aa163F	TTTGGTCTCATATGCAGCAACAGGAGAAGATCA	
Bsal-300aa168F	TTTGGTCTCATATGATCAAACCGAAGGTTTCGTT	
Bsal-300aa173F	TTTGGTCTCATATGCGTTCGACAGTGGCGCAGC	
Bsal-300aa178F	TTTGGTCTCATATGCAGCACCACGAGGCACTGG	
300ΔNLSII-AD-CTM-R(WOS)	TTTGGTCTCACACCTGCGGAGGGACCGGTG	Amplifikation der verkürzten <i>avrBs3</i> -CTR als GG-Module
AR-02-fwd-AvrBs3	TTTGGTCTCTTTGATCAAAAAGAACCAATC	
AR-130aa_R	TTTGGTCTCAGCGACCTGGAGGATACGGTCCCAAC GCTGC	
AR-104aa_R	TTTGGTCTCAGCGACGCGAAAGAGCTGTAACAACC CGTGC	
AR-91aa_R	TTTGGTCTCAGCGACCTGCGTCATGGCGTCATCAA ATG	
AR-76aa_R	TTTGGTCTCAGCGACCTGGAAAAAACCAGCACGC GAACC	
AR-01-rev-AvrBs3	TTTGGTCTCTTCAAGGCCGGCGCGTGCGG	
AR-02-fwd-AvrBs3	TTTGGTCTCTTTGATCAAAAAGAACCAATC	
SV40-NLS-AR46-F	TTTGGTCTCTTTGATTGCGGAATTAATTCCCAGAGC	Amplifikation der SV40 NLS als GG-Modul
SV40-NLS-AR158-F	TTTGGTCTCTTCGCGGAATTAATTCCCAGAGC	
SV40-NLS-R(WOS)	TTTGGTCTCTCACC GGCGGTACCCAATTTCGACC	
AvrBs3-AD-Modul_F	TTTGGTCTCAGGTGAACAAGATGAGGACCCCTTCG C	Amplifikation der <i>avrBs3</i> -AD als GG-Modul
AvrBs3-AD-Modul_R	AAAGGTCTCTAAGCTTCACTGAGGCAATAGCTC	
Mut-Pos232_R	Pho-CTGTTTGCCGACGCCAACG	Mutagenese des W232-Codons innerhalb des <i>avrBs3</i> -NTR GG-Moduls
Mut-W232R_F	CGTTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232N_F	AATTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232C_F	TGCTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232H_F	CATTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232F_F	TTCTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232P_F	CCGTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232Y_F	TACTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232S_F	TCCTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232G_F/	GGTTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232K_F	AAGTCCGGCGCACGCGCTC	
Mut-W232E_F	GAGTCCGGCGCACGCGCTC	

Material und Methoden

Mut-W232D_F	GACTCCGGCGCACGCGCTC		
Mut-W232Q_F	CAGTCCGGCGCACGCGCTC		
Mut-W232L_F	CTGTCCGGCGCACGCGCTC		
Mut-W232A_F	GCATCCGGCGCACGCGCTC		
Mut-W232V_F	GTGTCCGGCGCACGCGCTC		
Mut-W232I_F	ATCTCCGGCGCACGCGCTC		
R236G_F	CCGGCGCAGGCGCTCTGG	Mutagenese des <i>avrBs3</i> -NTR GG- Moduls an Position R236	
R236G_R/TS	CCAGAGCGCCTGCGCCGG		
R266G_F	GATTGCAAAAGGTGGCGGCGTG	Mutagenese des <i>avrBs3</i> -NTR GG- Moduls an Position R266	
R266G_R	CACGCCGCCACCTTTTGCAATC		
pENTR-CACC_R-pho	Pho-GGTGAAGGGGCGGCCGC	Mutagenese der <i>AvrBs3</i> -DNA- Zielsequenz	
U20-Bs4_iniG_F	GATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
U20-Bs4_iniC_F	CATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
U20-Bs4_iniA_F	AATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300-iniT-F	TCTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300-iniA-F	ACTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300-iniC-F	CCTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300-iniG-F	GCTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300A1-iniT-F	TATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300A1-iniA-F	AATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300A1-iniC-F	CATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300A1-iniG-F	GATATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300T1-iniT-F	TTTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300T1-iniA-F	ATTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300T1-iniC-F	CTTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300T1-iniG-F	GTTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300G1-iniT-F	TGTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300G1-iniA-F	AGTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300G1-iniC-F	CGTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-300G1-iniG-F	GGTATAAACCTGACCCTTTTTCTTTCTTG		
EBE-ArtTAL14-1-A0_F	ACACACACCATAAGGGCATTCTTTCTT		Mutagenese der ArtRep18-1 DNA- Zielsequenz
EBE-ArtTAL14-1-C0_F	CCACACACCATAAGGGCATTCTTTCTTG		
EBE-ArtTAL14-1-G0_F	GCACACACCATAAGGGCATTCTTTCTTG		
EBE-ArtTAL14-2-A0_F	ACATGTGTGCCTTTTCATTTCTTTCTTG		Mutagenese der ArtRep18-2 DNA- Zielsequenz
EBE-ArtTAL14-2-C0_F	CCATGTGTGCCTTTTCATTTCTTTCTTG		
EBE-ArtTAL14-2-G0_F	GCATGTGTGCCTTTTCATTTCTTTCTTG		

Material und Methoden

AvrBs3-TalC-N-2_F	TTTGGTCTCAGGCGGGAGAGTTGAGAGGTC	Amplifikation der <i>avrBs3</i> - bzw. <i>talC</i> -NTR als GG-Module für die Erstellung von AvrBs3-TalC-Chimären
AvrBs3-TalC-N-2_R	TTTGGTCTCACGCCACCGTGAGCAAGGC	
AvrBs3-TalC-N-1_F	TTTGGTCTCACCGTCGCTGTCAAGTATCAG	
AvrBs3-TalC-N-1_R	TTTGGTCTCAACGGTCCCTAACGCTGCC	
TalC-NTR-F	TTTGGTCTCATATGGATCCCATTCGTCCGCG	
RT-upa20-cons-F	GAAGGGTCTTCTTCTATGACTTCTG	Amplifikation von <i>UPA20</i> cDNA für qRT
RT-upa20-cons-R	TGACCATGAGTGCATCTAAGTCC	
qRT-Bs3-F	GTAACCTTCTTGGTTAATGGAGAGTGAATTG	Amplifikation von <i>Bs3</i> cDNA für qRT
qRT-Bs3-R	TGATTCTTGTGCTACATTTGTTCTTTCC	
TTP-R(C.a.)_F	TTTGGTCTCATATGATGGATGATGACAAGCTTGA	Amplifikation von <i>CaTDX</i> als GG-Modul
TTP-R(C.a.)_R	TTAGGTCTCAAAGCTTTAGCCTCCATACTGGGC	
EMSA-WT-F	TTCATCTTTATATAAACCTGACCCTTTGTGACATT C	Für EMSA-Studien verwendete Oligonukleotide
EMSA-WT-R	GAATGTCACAAAGGGTCAGGTTTATATAAAGATGA A	
EMSA-ubm2-F	TTCATCTTTTTTTTTTCTGACCCTTTGTGACATT C	
EMSA-ubm2-R	GAATGTCACAAAGGGTCAGGAAAAAAAAAAGATGA A	
Dummy1-6-GW-F	TGGTCTCAGAACAAGTCTTCTGCGGCCGCATTAGG CACCCC	
Dummy1-6-GW-R	AGGTCTCATCTCAAGTCTTCAGGTCGACCTGCAGA CTGGCTG	Amplifikation der Dummy-Module für die Klonierung von <i>avrBs3 repeat</i> -Blöcken
Dummy7-12-GW-F	TGGTCTCAGAGAAAGTCTTCTGCGGCCGCATTAGG CACCCC	
Dummy7-12-GW-R	AGGTCTCACTGTAAGTCTTCAGGTCGACCTGCAGA CTGGCTG	
Dummy13-17,5-GW-F	TGGTCTCAACAGAAGTCTTCTGCGGCCGCATTAGG CACCCC	
Dummy13-17,5-GW-R	AGGTCTCATGCTAAGTCTTCAGGTCGACCTGCAGA CTGGCTG	
pENTR-MG-F	CACCCATATGAGAGACCTGCGGCCGCATTAGGCAC CCC	Amplifikation der Dummy-Module für die Erstellung GG-kompatibler ENTRY-Vektoren
pENTR-MG(WOS)-R	ACCACCTGAGACCAAGGTCGACCTGCAGACTGGCT GTG	
pENTR-MG(WS)-R	TAAGCTGAGACCAAGGTCGACCTGCAGACTGGCTG	

	TG	
RS-Efirt-F1	AGTCAACTACCCTGGTCAC	Amplifikation von <i>EF1α</i> cDNA für qRT (Szczesny <i>et al.</i> 2010)
RS-Efirt-R1	GTGCAGTAGTACTTAGTGGTC	

Um kodierende Gen-Sequenzen zu klonieren und in *E. coli* bzw. *in planta* zu exprimieren wurden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Plasmide genutzt.

Tabelle 2.6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Zusammensetzung (Referenz)	Verwendung
pENTR	<i>Kan^R</i> , pUC <i>ori</i> , <i>attL1</i> , GTGG, <i>attL2</i> , (Life Technologies)	Klonierungsvektor, Donor für LR-Rekombination (GW)
pEGG(WS/WOS) (pENTR-Derivat)	<i>Kan^R</i> , pUC <i>ori</i> , <i>attL1</i> , <i>Bsal</i> , GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>Bsal</i> , <i>attL2</i> (diese Arbeit)	GG-kompatibler Klonierungsvektor, Donor für LR-Rekombination (GW)
pDEST15	<i>Amp^R</i> , pBR322 <i>ori</i> , T7 Promotor, <i>RBS</i> , <i>ATG</i> , <i>GST</i> , <i>attR1</i> , GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>attR2</i> , T7 Terminator, (Invitrogen)	Rezipient für LR-Rekombination (GW), Synthese GST-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
pDEST17	<i>Amp^R</i> , pBR322 <i>ori</i> , T7 Promotor, <i>RBS</i> , <i>ATG</i> , 6x <i>His</i> , <i>attR1</i> , GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>attR2</i> , T7 Terminator, (Invitrogen)	Rezipient für LR-Rekombination (GW), Synthese 6xHis-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
pGGA2	<i>Spec^R</i> , pBGWFS7 <i>backbone</i> , <i>LB</i> , 35S CaMV-Promotor, <i>gfp</i> , <i>Bsal</i> , <i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i> , <i>Bsal</i> , 35S CaMV-Terminator, <i>RB</i> (S. Thieme)	GG-kompatibler Binärvektor für die Synthese GFP-markierter Proteine <i>in planta</i>
pGGA8	<i>Spec^R</i> , pBGWFS7 <i>backbone</i> , <i>LB</i> , 35S CaMV-Promotor, 4xc- <i>myc</i> , <i>Bsal</i> , <i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i> , <i>Bsal</i> , 35S CaMV-Terminator, <i>RB</i> (S. Thieme)	GG-kompatibler Binärvektor für die Synthese 4xc-Myc-markierter Proteine <i>in planta</i>
pGGE2	<i>Kan^R</i> , pQE60 <i>backbone</i> , T7-	GG-kompatibler

Material und Methoden

	Promotor, <i>GST</i> , <i>Bsal</i> , <i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i> , <i>Bsal</i> (S. Thieme)	Expressionsvektor für die Synthese GST-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
pGGE6	<i>Kan^R</i> , pQE60 backbone, T7-Promotor, <i>6xHis</i> , <i>Bsal</i> , <i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i> , <i>Bsal</i> (S. Thieme)	GG-kompatibler Expressionsvektor für die Synthese 6xHis-markierter Proteine in <i>E. coli</i>
pGWB3	<i>Kan^R</i> , <i>Hyg^R</i> , <i>LB</i> , <i>attR1</i> , GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>attR2</i> , <i>uidA</i> , 35S CaMV-Terminator, <i>RB</i>	Rezipient für LR-Rekombination (GW), T-DNA mit promotorlosem <i>uidA</i>
pGGX1	pBGWFS7 backbone, <i>lac</i> Promotor, <i>Bsal</i> , <i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i> , <i>Bsal</i> , <i>FLAG</i> (S. Thieme)	GG-kompatibler Expressionsvektor für die Synthese FLAG-markierter Proteine in <i>Xcv</i>
pUC57 (<i>Bsal</i> ⁻)	<i>Amp^R</i> , pUC19 Derivat, <i>lacZ</i> mit interner <i>MCS</i> , <i>Bsal</i> in <i>Amp^R</i> wurde entfernt (R. Morbitzer)	Klonierungsvektor für GG-Module
pUC57-Dummy1-6	<i>Amp^R</i> , pUC19 Derivat, <i>lacZ</i> mit interner <i>Bsal</i> -flankierter, GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>Bsal</i> in <i>Amp^R</i> wurde entfernt (diese Arbeit)	Klonierungsvektor für GG- <i>avrBs3-repeat</i> -Module, <i>repeats</i> 1 bis 6
pUC57-Dummy7-12	<i>Amp^R</i> , pUC19 Derivat, <i>lacZ</i> mit interner <i>Bsal</i> -flankierter, GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>Bsal</i> in <i>Amp^R</i> wurde entfernt (diese Arbeit)	Klonierungsvektor für GG- <i>avrBs3-repeat</i> -Module, <i>repeats</i> 7 bis 12
pUC57-Dummy13-17,5	<i>Amp^R</i> , pUC19 Derivat, <i>lacZ</i> mit interner <i>Bsal</i> -flankierter, GW-Kassette (<i>Cm^R</i> , <i>ccdB</i>), <i>Bsal</i> in <i>Amp^R</i> wurde entfernt (diese Arbeit)	Klonierungsvektor für GG- <i>avrBs3-repeat</i> -Module, <i>repeats</i> 13 bis 17,5
pMK	<i>Kan^R</i> , <i>MCS</i> (GeneART)	Klonierungsvektor

2.1.6. Pflanzenmaterial

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen handelt es sich um *C. annuum* (ECW-30R) und *N. benthamiana*. Diese wurden unter Gewächshausbedingungen angezogen (26-28 °C; 60-70 % relative Luftfeuchte; Langtag-Lichtperiode 6 bis 22 Uhr).

2.1.7. Verwendete Bakterienstämme

Plasmide wurden mittels *E. coli* Top10 bzw. *E. coli* Top10 ccdB-survival vervielfältigt. Für die Proteinexpression wurden *E. coli* BL21(DE3) RIL-Zellen verwendet. Die transiente Expression von Gene *in planta* erfolgte *Agrobacterium*-vermittelt. Die T3-vermittelte Translokation von AvrBs3-Derivaten erfolgte mittels *Xcv* (85-10). Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterien sind der Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tabelle 2.7: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)		
One shot (TOP10)	F ⁻ , mcrA, Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>laxX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
TOP10 ccdB-survival	F ⁻ , mcrA, Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>laxX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>tonA::Ptrc-ccdA</i>	Invitrogen
BL21(DE3) RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^R <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> (<i>argZ ileY leuW cm</i> ^R)	Agilent Technologies
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>)		
GV3101	Ti-Plasmid:pMP90 (pTiC58ΔT-DNA), <i>Rif</i> ^R , <i>Gm</i> ^R	(Van Larebeke <i>et al.</i> 1974; Koncz and Schell 1986)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>)		
85-10	<i>C. annuum</i> race 2, <i>Rif</i> ^R	(Bonas <i>et al.</i> 1989)

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Bakterien

In dieser Arbeit wurden die Bakterien der Gattung *E. coli*, *A. tumefaciens* und *Xcv* verwendet. *E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium (Flüssigmedium oder Nährplatten) bei 37 °C unter Zugabe entsprechender Antibiotika angezogen. Für die Anzucht von *A. tumefaciens* und *Xcv* wurde YEB- bzw. NYG-Medium mit entsprechenden Antibiotika und eine Temperatur von 30 °C verwendet.

2.2.2. Elektroporation von *E. coli* und *A. tumefaciens*

50 µl Aliquots elektrokompetenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* wurden mit Plasmid-DNA gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Bakterien-DNA-Gemisch in Küvetten (1 mm) überführt und mittels eines Stromimpulses transformiert. Zur Regeneration der Transformanten wurde 250 µl LB- (*E. coli*) bzw. YEB- (*A. tumefaciens*) Flüssigmedium hinzugefügt und bei entsprechenden Anzuchttemperaturen für eine Stunde inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin auf Nährplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und positive Transformanten ein (*E. coli*) bzw. zwei (*A. tumefaciens*) Tage bei entsprechenden Anzuchttemperaturen selektiert.

Tabelle 2.8: Standardbedingungen der Elektroporation von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Anforderungen	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Spannung	2500 V	2500 V
Kapazität	25 mF	25 mF
Widerstand	200 Ω	200 Ω
Dauer	5 ms	5 ms
Wachstumsbedingungen	1 h / 37 °C	1 h / 30 °C
Nährmedium	LB + Antibiotikum	YEB + Rif + Antibiotikum
Inkubation	1 Tag / 37 °C	2 Tage / 30 °C

2.2.3. Chemische Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot von 50 µl chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurde mit Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock (45 Sekunden, 42 °C) transformiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für zwei Minuten auf Eis inkubiert und mit 250 µl LB-Flüssigmedium versetzt. Zur Regeneration der Transformanten wurde der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion positiver Transformanten wurde der Ansatz auf LB-Nährplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 12-24 Stunden bei 37 °C gelagert.

2.2.4. Dauerhafte Lagerung von Bakterien

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Stocks generiert. Dafür wurden Flüssigkulturen mit den entsprechenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei entsprechenden Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden 930 µl Bakterien-Flüssigkultur mit 70 µl DMSO versetzt, gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.5. Plasmid-Präparation

Die Plasmidpräparation aus 5 ml *E. coli* Flüssigkultur erfolgte mittels alkalischer Lyse und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, Life Technologies; (Sambrook *et al.* 1989)).

2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction* - PCR) diente zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (*template*). Oligonukleotide, die komplementär zur DNA-Sequenz des *templates* sind, definierten den Amplifizierten Bereich. Weiterhin

wurde die PCR zur ortsspezifischen Mutagenese von DNA-Sequenzen verwendet. Dazu wurden Mutationen über die verwendeten Oligonukleotide in die amplifizierten DNA-Abschnitte eingebracht. Für Analysezwecke (z.B.: Kolonie-PCR) wurde die *Taq*-Polymerase verwendet, welche mit einer Leistung von 1 Kb pro Minute polymerisiert. Aufgrund der fehlenden *proof-reading*-Funktion der *Taq*-Polymerase besteht die Möglichkeit auf den Einbau falscher Basen und damit verbundenen Mutationen bei der Amplifikation.

Tabelle 2.9: PCR-Reaktionsansatz (*Taq*-Polymerase)

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	2 μ l	1x
2 mM dNTPs	2 μ l	0,2 mM
Oligonukleotid <i>fwd</i> (1 μ M)	3 μ l	150 nM
Oligonukleotid <i>rev</i> (1 μ M)	3 μ l	150 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l	Unbekannt (Eigenproduktion)
<i>template</i>	X μ l	2-50 ng; Pipettenspitze <i>E. coli</i> Zellmaterial von einer Einzelkolonie (Kolonie-PCR)
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 μ l	

PCR-Programm (*Taq*-Polymerase)

- | | | | |
|-----|---------------|----------|---|
| 1. | Denaturierung | 95 °C | 1-5 Minuten (5 Minuten bei Kolonie-PCR) |
| 2a. | Denaturierung | 95 °C | 30 Sekunden |
| 2b. | Anlagerung | 50-70 °C | 30 Sekunden |
| 2c. | Amplifikation | 72 °C | 1 Minute (pro 1 Kb) (32x Zyklus zu 2a) |
| 3. | Amplifikation | 72 °C | 2 Minuten |
| 4. | Kühlen | 12 °C | |

Für die Amplifikation von kodierenden Sequenzen sowie bei der ortsspezifischen Mutagenese sind Mutationen unerwünscht. Aus diesem Grund wurde hierbei eine Polymerase mit *proof-reading*-Funktion verwendet (Phusion Polymerase, Thermo Scientific). Diese Polymerase polymerisiert mit einer Leistung von 2 Kb pro Minute und eignet sich zudem zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit hohem GC-Gehalt. Phusion-generierte Amplifikate besitzen „glatte Enden“ (*blunt end*) und ermöglichen die ungerichtete Ligation in *blunt end*-Klonierungsvektoren.

Tabelle 2.10: PCR-Reaktionsansatz (Phusion-Polymerase)

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
5x HF-Puffer (5x GC-Puffer)	4 µl	1x
2 mM dNTPs	2 µl	0,2 mM
Oligonukleotid <i> fwd</i> (1 µM)	3 µl	150 nM
Oligonukleotid <i> rev</i> (1 µM)	3 µl	150 nM
Phusion-Polymerase	0,2 µl	0,4 U
<i>template</i>	X µl	2-50 ng
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl	

PCR-Programm (Phusion-Polymerase)

- | | | | |
|-----|---------------|----------|--|
| 1. | Denaturierung | 95 °C | 1:30 Minuten |
| 2a. | Denaturierung | 95 °C | 30 Sekunden |
| 2b. | Anlagerung | 50-70 °C | 30 Sekunden |
| 2c. | Amplifikation | 72 °C | 1 Minute (pro 1 Kb) (32x Zyklus zu 2a) |
| 3. | Amplifikation | 72 °C | 2 Minuten |
| 4. | Kühlen | 12 °C | |

2.2.7. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Für die Analyse von Plasmiden und für Klonierungszwecke wurden Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) verwendet. Diese spalten DNA durch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung im Zucker-Phosphat-Rückgrat beider DNA-Stränge. Die Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers entsprechend verwendet.

Tabelle 2.11: Restriktions-Reaktionsansatz

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2 µl	1x
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,5 µl	0,25 U/µl
Plasmid-DNA	x µl	
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl	

2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 DNA-Ligase

Die mittels ortsspezifischer Mutagenese amplifizierten DNA-Fragmente mussten mitunter für den Ringschluss der Plasmide ligiert werden. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit *blunt ends*, wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) verwendet. Diese bewirkt die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe eines bzw. zweier DNA-Fragmente unter der Hydrolyse von ATP. Die Ligation erfolgte entweder für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 16 °C.

Tabelle 2.12: Ligations-Reaktionsansatz

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
10x T4 DNA-Ligasepuffer	1 µl	1x
T4 DNA-Ligase (30 WU/µl)	1 µl	3 WU/µl
PCR-Reaktionsansatz	8 µl	

2.2.9. Klonierung von GG-Modulen mittels *cut-ligation*

GG-Module wurden zunächst durch Phusion-PCR generiert und flankierende *BsaI*-Schnittstellen sowie entsprechende Überhänge durch die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide eingebracht. Durch die Klonierung der Amplifikate (GG-Module) in pUC57 können diese entweder als Stock oder als Plasmidpräparation dauerhaft gelagert und zur GG-Klonierung verwendet werden. Die Klonierung in pUC57 erfolgte mithilfe von *blunt end* Restriktionsenzymen und einer T4 DNA-Ligase (30 WU, Thermo Scientific). Voraussetzung dafür ist, dass keine Schnittstellen des Restriktionsenzym innerhalb der DNA-Sequenz des GG-Moduls vorhanden sind. Die MCS von pUC57 enthält zwei Schnittstellen von *blunt end* Restriktionsenzymen (*SmaI* und *StuI*, Thermo Scientific) und erlaubt ein gewisses Maß an Flexibilität. Die MCS befindet sich in der kodierenden Sequenz der β -Galaktosidase (*lacZ*) und ermöglicht eine blau-weiß-Selektion der positiven Transformanten.

Tabelle 2.13: *cut-ligation*-Reaktionsansatz (am Beispiel von *Sma*I)

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
PCR-Produkt	10 µl	-
pUC57(BsaI ⁻ ; 50 ng/µl)	2 µl	ca. 5 ng/µl
10x Reaktionspuffer (Y)	2 µl	1x
<i>Sma</i> I (10 U/µl)	0,5 µl	0,25 U/µl
T4 Ligase (30 WU/µl)	1 µl	1,5 WU/µl
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl	

Programm für *cut-ligation*

1a.	Restriktion	30 °C	10 Minuten
1b.	Ligation	16 °C	10 Minuten (6x - 10x Zyklus zu 1a)
2	Restriktion	30 °C	20 Minuten
3	Inaktivierung	65 °C	20 Minuten
4.	Kühlen	12 °C	

2.2.10. Gerichtete Ligation von PCR-Produkten in pENTR/D-TOPO

Die an den linearisierten Vektor (pENTR/D-TOPO) gekoppelte Topoisomerase ermöglicht die gerichtete Ligation von *blunt end* PCR-Produkten, welche 5' mit einer CACC-Sequenz beginnen. Die Reaktion wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (*pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning Kit*, Life Technologies).

Tabelle 2.14: ENTRY-Klonierungs-Reaktionsansatz

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
PCR-Reaktionsansatz	1 – 4,5 µl	
pENTR/D-TOPO (20 ng/µl)	0,5 µl	1,66 ng/µl
Salzlösung (1,2 M NaCl; 60 mM MgCl ₂)	1 µl	0,2 M NaCl; 10 mM MgCl ₂
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 6 µl	

Für die Erstellung eines GG-kompatiblen pENTR (pEGG, Tabelle 2.6) wurde eine GW-Kassette (*CmI^R* und *ccdB*) mit flankierenden *BsaI*-Schnittstellen sowie einer 5' CACC-Sequenz amplifiziert und anschließend gerichtet in den pENTR kloniert.

2.2.11. Rekombinationsbasierte Klonierung mittels GATEWAY-System

DNA-Fragmente die in pENTR/D-TOPO kloniert wurden, können über LR-Rekombination gerichtet in Zielvektoren Kloniert werden (GATEWAY-System; Life Technologies). Diese Technik beruht auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Dafür befinden sich zwei *attL*-sites (*attachement sites*; je 100 Bp) in pENTR/D-TOPO die das zu rekombinierende DNA-Fragment flankieren. In den Zielvektoren befindet sich wiederum eine *attR*-Selektionskassette (*CmI^R*, *ccdB*), die von *attR*-sites (je 125 Bp) flankiert ist. Die LR-Rekombination zwischen *attL*- und *attR*-sites, bewirkt den Austausch der *attR*-Selektionskassette durch das zu rekombinierende DNA-Fragment. Dafür wurde der Gateway® LR Clonase® Enzyme mix (Life Technologies) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Tabelle 2.15: LR-Rekombinations-Reaktionsansatz

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
pENTR-Insert	x μ l	ca. 10 ng/ μ l
Zielvektor	x μ l	ca. 30 ng/ μ l
Gateway® LR Clonase® Enzyme mix	0,5 μ l	
TE-Puffer	Auffüllen auf 10 μ l	

Der Ansatz wurde 30 Minuten bis 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert.

2.2.12. Klonierung von GG-Modulen mittels GG-Klonierung

Die GG-Klonierung (*golden-gate-cloning*) ermöglicht die gerichtete, lückenlose Ligation von bis zu 10 DNA-Fragmenten im Rahmen einer simultanen *cut-ligation* Reaktion (Engler *et al.* 2008; Engler *et al.* 2009). Diese Klonierungsmethode basiert auf Typ-II-S Restriktionsendonukleasen (z.B.: *Bsal* oder *BpI*), welche nicht in ihrer Erkennungssequenz schneiden. Diese Restriktionsenzyme generieren Überhänge, („klebrige Enden“, *sticky ends*) die aus bis zu 4 Basen bestehen und deren Sequenz kein Einfluss auf die Enzymaktivität nimmt. Diese Überhänge gewährleisten die gerichtete Ligation von bis zu 10 DNA-Fragmenten durch die Hybridisierung komplementärer Überhänge in einem Reaktionsschritt. Somit können DNA-Fragmente (z.B.: mehrere Fragmente eines Gens) die durch *Bsal*-Schnittstellen flankiert sind, herausgeschnitten und in einem Zielvektor wieder zusammengefügt werden. Im Klonierungsprodukt (z.B.: das vollständige Gen) sind keine *Bsal*-Schnittstellen enthalten. Die GG-Klonierung umfasst mehrere Zyklen von Restriktion und Ligation, wobei sich die Menge an gewünschtem Klonierungsprodukt akkumuliert. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von NEB (*Bsal*) und Thermo Scientific (*BpI*, T4 DNA-Ligase) bezogen.

Tabelle 2.16: Reaktionsansatz der GG-Klonierung

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
1-9 GG-Module (pUC57-Derivate, 50 ng/μl)	Jeweils 1 μl	2,5 ng/μl
Destination Vektor (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
ATP (10 mM)	2 μl	1 mM
10x NEBuffer 4	2 μl	1x
T4 DNA-Ligase (30 WU/μl)	1 μl	1,5 WU/μl
<i>Bsal</i> (10 U/μl)	1 μl	0,5 U/μl
Milipore H2O	Auffüllen auf 20 μl	

Programm für GG-Klonierung

1a.	Restriktion	37 °C	10 Minuten
1b.	Ligation	16 °C	10 Minuten (6x - 10x Zyklus zu 1a)
2	Restriktion	37 °C	20 Minuten
3	Inaktivierung	65 °C	20 Minuten
4.	Kühlen	12 °C	

2.2.13. Erstellung von *avrBs3*-Konstrukten mittels GG-Klonierung

Für die PCR-basierte Mutagenese von *avrBs3* musste die kodierende Sequenz in GG-Module unterteilt werden. Die DNA-Fragmente einzelner *avrBs3*-Module wurden mittels PCR amplifiziert und in mittels *cut-ligation* in pUC57 bzw. mittels *CloneJET PCR Cloning Kit* (Life Technologies) in pJET1.2 kloniert. Die flankierenden *Bsal*-Schnittstellen und spezifischen Überhänge wurden durch die verwendeten Oligonukleotide eingebracht. Die kodierende Sequenz von *avrBs3* wurde zunächst in vier GG-Module unterteilt (NTR - 864 Bp; *repeat*-Region - 1794 Bp; CTR1 - 467 Bp und CTR2 - 370 Bp; siehe 7.6.1). Zur PCR-basierten Mutagenese innerhalb der *repeat*-Region wurde diese in 18 *BpiI*-flankierte *repeat*-Submodule unterteilt (Synthese der *repeat*-Module und Klonierung in pMK durch GeneART AG, Regensburg; siehe 7.6.4). Zur Klonierung der *repeat*-Region wurden die einzelnen *repeat*-Module zunächst mittels GG-Klonierung (*BpiI*; Life Technologies) in dafür generierte pUC57-Vektoren zwischenkloniert (pUC57-Dummy1-6; pUC57-Dummy7-12; pUC57-Dummy13-17,5). Dies resultierte in *Bsal*-flankierte *repeat*-Block-Module aus jeweils sechs *repeats* (Rep1-6; Rep7-12 und Rep13-17,5). Die drei *repeat*-Block-Module konnten anschließend mit dem NTR- und den beiden CTR-Modulen zur gerichteten GG-Klonierung (*Bsal*; NEB) der kompletten kodierenden Sequenz von *avrBs3* verwendet werden.

Tabelle 2.17: Reaktionsansatz der GG-Klonierung (*avrBs3-repeat*-Module; *repeat 1-6*)

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
pMK- <i>repeat 1</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pMK- <i>repeat 2</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pMK- <i>repeat 3</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pMK- <i>repeat 4</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pMK- <i>repeat 5</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pMK- <i>repeat 6</i> (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pUC57-Dummy1-6 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
<i>Bpi</i> I (10 U/μl)	1 μl	0,5 U/μl
T4 DNA-Ligase (30 WU/μl)	1 μl	1,5 WU/μl
ATP (10 mM)	2 μl	1 mM
10xPuffer (G)	2 μl	1x
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 μl	

Programm für GG-Klonierung für *avrBs3-repeat*-Blöcke

1a.	Restriktion	37 °C	10 Minuten
1b.	Ligation	16 °C	10 Minuten (6x - 10x Zyklus zu 1a)
2	Restriktion	37 °C	20 Minuten
3	Inaktivierung	65 °C	20 Minuten
4.	Kühlen	12 °C	

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz der GG-Klonierung (*avrBs3*)

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
pJET1.2-NTR (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pUC57-Rep1-6 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pUC57-Rep7-12 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pUC57-Rep13-17 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pJET1.2-CTR1 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
pJET1.2-CTR2 (50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
Zielvektor (z.B.: pGGA2; 50 ng/μl)	1 μl	2,5 ng/μl
<i>Bsa</i> I (10 U/μl)	1 μl	0,5 U/μl
T4 DNA-Ligase (30 WU/μl)	1 μl	1,5 WU/μl
ATP (10 mM)	2 μl	1 mM
10x NEBuffer 4	2 μl	1x
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 μl	

Programm für GG-Klonierung von *avrBs3*

1a.	Restriktion	37 °C	10 Minuten
1b.	Ligation	16 °C	10 Minuten (6x - 10x Zyklus zu 1a)
2	Restriktion	37 °C	20 Minuten
3	Inaktivierung	65 °C	20 Minuten
4.	Kühlen	12 °C	

2.2.14. *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression *in planta*

Für die Übertragung und Integration von Genen in das Pflanzengenom mittels *A. tumefaciens*, wurde das System binärer Vektoren verwendet. Dafür befinden sich zwei Plasmide in *A. tumefaciens*. Zum einen das „entwaffnete“ *tumor-inducing* Plasmid (Ti-Plasmid), auf dem sich die zum Transfer und Integration notwendigen *vir*-Gene befinden, die Transfer-DNA (T-DNA) jedoch entfernt wurde (Ti-Plasmid- Δ T-DNA). Zum anderen ein Binärvektor, auf dem sich die (T-DNA) befindet. die T-DNA enthält die zu transferierenden Gene, welche von 25 Bp-Wiederholungen (*left border* (LB) und *right border* (RB)) flankiert sind. Die Expression der *vir*-Gene wird durch phenolische Substanzen (z.B.: Acetosyringon) induziert und deren Genprodukte vermitteln die Synthese, Stabilisierung, den Transfer und die Integration der T-DNA. Die Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom erfolgt unspezifisch. Die jeweiligen *Agrobacterium*-Stämme (GV3101 mit Ti-Plasmid- Δ T-DNA und Binärvektor) wurden auf selektiven YEB-Nährplatten angezogen und Zellmaterial in *Agrobacterium*-Infiltrationsmedium (AIM: 10 mM MgCl₂; 5 mM MES pH 5,3; 150 μ M Acetosyringon) eingequirlt. Die *Agrobacterien* wurden auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,8 (ca. 8 x 10⁸ Zellen/ml) mit AIM verdünnt. Zur Unterdrückung pflanzlicher *silencing*-Prozesse, wurde zusätzlich ein *Agrobacterium*-Stamm verwendet, der die transiente Expression des viralen *silencing*-Inhibitors *p19* vermittelt und ebenfalls mit AIM auf eine OD₆₀₀ = 0,8 eingestellt (Voinnet *et al.* 2003). Beide *Agrobacterium*-Lösungen wurden 1:1 gemischt und mit kanülenlosen Spritzen über die an der Blattunterseite befindlichen Spaltöffnungen in das Blattgewebe von *N. benthamiana* Pflanzen inokuliert. Die transiente Expression der auf der T-DNA befindlichen Gene erfolgte mittels 35S-Promotor (Blumenkohlmosaikvirus) und ist bereits ein Tag nach Inokulation detektierbar.

2.2.15. HR-Assay

Der HR-Assay basiert auf der Agrobacterium-vermittelten transienten Expression bzw. der Xcv-vermittelten Translokation von AvrBs3-Derivaten in Pflanzen die das Bs3-Gen enthalten. Dieser Assay wurde in *C. annuum* (ECW-30R) oder in Bs3-transgenen *N. benthamiana* durchgeführt. Dafür wurden entsprechende *Agrobacterien* auf eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,8$ mit AIM, die entsprechenden Xcv-Stämme auf eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,4$ mit 10 mM $MgCl_2$ verdünnt und mit kanülenlosen Spritzen in das Blattgewebe inokuliert. Die induzierte HR wurde über fünf Tage Dokumentiert. Zur Visualisierung der HR wurden die Blätter geerntet und in Ethanol gebleicht.

2.2.16. GUS-Reporterassay

Für die Aktivitätsbestimmung von AvrBs3-Derivaten *in planta* wurde die etablierte quantitative GUS-Reporteranalyse verwendet (GUS = β -Glucuronidase; Abbildung 2.2.1). Diese beruht auf dem *Agrobacterium*-vermittelten Transfer von T-DNA in Blattzellen von *N. benthamiana*. Für die GUS-Reporteranalyse wurden zwei bis drei *Agrobacterium*-Stämme mit unterschiedlichen T-DNAs verwendet. Die erste T-DNA enthält die kodierende Sequenz von Epitop-markierten AvrBs3 (bzw. AvrBs3-Derivaten) unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors (Effektorkonstrukt). Die zweite T-DNA enthält die kodierende Sequenz des GUS-Reportergens (*uidA*, GUS) unter der Kontrolle des transkriptionell inaktiven Bs4 minimal-Promotors (*pBs4min*, 75 Bp des Bs4-Promotors, (Schornack *et al.* 2006)), welcher an die AvrBs3-DNA-Zielsequenz (EBE_{AvrBs3} ; *effector binding element*) fusioniert wurde. Auf der dritten T-DNA befindet sich kodierende Sequenz des *silencing suppressors* P19 aus dem tomato bushy stunt virus (TBSV), was zur Unterdrückung des *post-transcriptional gene-silencing* (PTGS) und zu höheren Expressionsraten von 35S-exprimierten Proteinen in *N. benthamiana* führt (Voinnet *et al.* 2003). Letztere T-DNA wurde nicht in allen Experimenten verwendet. Die *Agrobacterium*-Stämme mit den jeweiligen T-DNAs wurden in selektiven Medien kultiviert und in AIM mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8$ resuspendiert. Anschließend wurden die *Agrobacterium*-Resuspensionen zu gleichen Teilen gemischt (1:1 bzw. 1:1:1) und in *N. benthamiana* inokuliert. Der Transfer der drei T-DNAs in eine Zelle führt zur Synthese des AvrBs3-Derivates. Dieses Derivat lokalisiert im pflanzlichen Zellkern,

bindet die AvrBs3-DNA-Zielsequenz und induziert die Transkription des *GUS*-Reportergens. Zwei Blattscheiben (Durchmesser 0,9 cm) wurden zwei-drei Tage nach Inokulation (*days post inoculation*; dpi) geerntet, mittels Kugelmühle aufgeschlossen (30 Hz, 1 Minute) und mit 300 µl GUS-Extraktionspuffer (50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0); 10 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol; 0,1 % Triton-X100; 0,1 % SDS) resuspendiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (14000 rpm; 4 °C; 5 Minuten). 10 µl des Überstandes wurden mit 90 µl GUS-Extraktionspuffer + 10 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) versetzt und für 60-90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt indem 10 µl des Reaktionsansatzes mit 90 µl 0,2 M Na₂CO₃ gemischt wurden. Die GUS-Aktivität wurde mittels Fluoreszenzanalyse eines Reaktionsproduktes (4-Methylumbelliferon; MU;

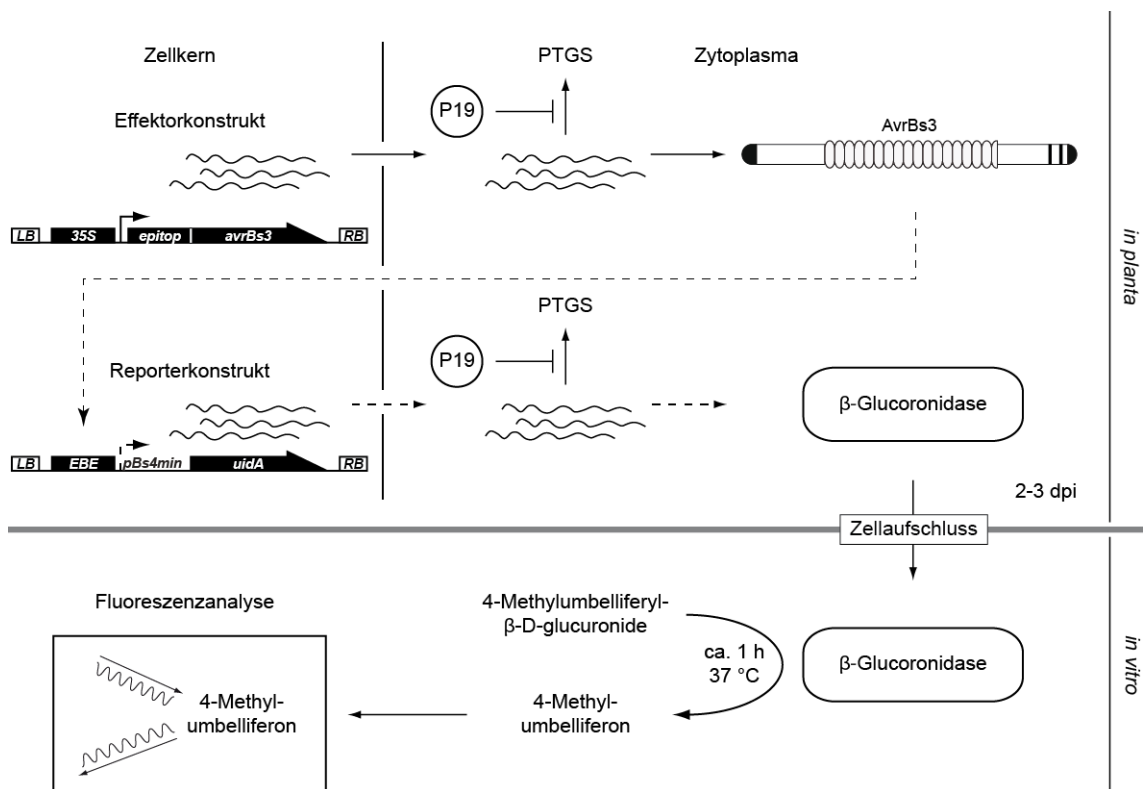


Abbildung 2.2.1: Modell der GUS-Reportergenanalyse

Die Effektor- und Reporterkonstrukte werden Agrobacterium-vermittelt in das Genom von *N. benthamiana* integriert. Das Effektor-konstrukt befindet sich unter der Kontrolle des 35S-Promotors und führt zur konstitutiven Synthese des Effektors (AvrBs3-Derivate) in planta. Unter Verwendung der Agrobacterium-vermittelten Synthese von P19, unterdrückt P19 das post-transcriptional gene-silencing (PTGS). Die AvrBs3-Derivate gelangen in den Zellkern, binden die DNA-Zielsequenz (effector binding element (EBE)) und induzieren die Transkription des Reporter-gens uidA (β-Glucuronidase). Zwei bis drei Tage nach Inokulation (2-3 dpi, days post inoculation), wird das Pflanzenmaterial aufgeschlossen und die Enzymaktivität der β-Glucuronidase ermittelt. Die Menge des Spaltproduktes (4-Methylumbelliferon) ist ein Maß für die Aktivität des AvrBs3-Derivates.

Anregung - 360 nm; Emission - 465 nm) analysiert (Abbildung 2.2.1). Als Standards wurden vorgefertigte Lösungen mit definierten Mengen an MU (1 μM ; 10 μM ; 100 μM und 1000 μM) verwendet. Die Menge an Reaktionsprodukt korreliert mit der Aktivität des AvrBs3-Derivates. Die Gesamt-Proteinmengen der Proben wurden parallel mittels Bradford den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (Roti[®]-Quant, Carl Roth). Die Berechnung der GUS-Aktivität ergab sich aus folgender Rechnung:

$$\text{GUS-Aktivität} = \frac{\Delta F * 10 \text{ pmol MU}}{t [\text{min}] * \text{Protein} [\text{mg}] * F_{10 \text{ pmol MU}}}$$

ΔF	-	Fluoreszenzwert der Probe abzüglich der Hintergrundfluoreszenz
t	-	Reaktionszeit in Minuten
$F_{10 \text{ pmol MU}}$	-	Fluoreszenzwert des Standards (10 μM MU)

Die GUS-Aktivität wird in [$\text{pmol 4-Methylumbilliferon (MU) x min}^{-1} \text{ x } \mu\text{g Protein}^{-1}$] angegeben. Dieser Experimentelle Ablauf wird im Folgenden als GUS-Reporteranalyse bezeichnet.

2.2.17. Proteinreinigung aus *E. coli*

Für die Synthese und Reinigung von His₆-markierten Proteinen wurden die jeweiligen Expressionsplasmide in *E. coli* BL21(DE3) RIL-Zellen (Agilent Technologies) transformiert. Positive Transformanten wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 37 °C unter Schütteln und Zugabe entsprechender Antibiotika selektiert (Vorkultur, 20 ml). Am Folgetag wurden die Hauptkulturen (LB-Flüssigmedium, Antibiotika, 200 ml) mit einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,05 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,9 angezogen. Die Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; 2 mM Endkonzentration) für 20 Stunden bei 16 °C. Die *E. coli* Zellen wurden durch Zentrifugation in 50 ml Falcons (4x 4000 rpm; 10 Minuten; 4 °C) pelletiert und in 10 ml Lysepuffer (50 mM Tris; 10 mM NaCl, 10 mM Imidazol; 0,1% (v/v) Tween20; pH 8,0; 8 °C) mit Proteinase-Inhibitor (*complete*, EDTA-free; Roche) resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis mit Lysozym (Spatelspitze, Sigma Aldrich) inkubiert und durch drei Frost-Tau-Zyklen lysiert. Im Zelllysate befindliche His₆-markierte Proteine wurden über eine Ni-NTA-Matrix (QIAGEN) immobilisiert. Nach dem Waschen der Ni-NTA-Matrix mit Lysepuffer und Waschpuffer (50 mM Tris; 10 mM NaCl, 40 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween20; pH 8,0;

8 °C) wurden die immobilisierten Proteine mit 2 ml Elutionspuffer (50 mM Tris; 10 mM NaCl, 250 mM Imidazol; 0,1 % (v/v) Tween20; pH 8,0; 8 °C) eluiert. Zur Lagerung und weiteren Verwendung der gereinigten Proteine wurden die Eluate mittels Dialyse (Dialysekassetten, 3 ml, 20 kDa Ausschluss, Life Technologies) in 2x 500 ml Protein-storage-Puffer (50 mM Tris; 10 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; pH 8,0) umgepuffert, aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Absorption bei 280 nm unter Verwendung des vorhergesagten Extinktionskoeffizienten (Pace *et al.* 1995) mittels Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt.

2.2.18. Proteinextraktion aus *N. benthamiana* Blattgewebe

Zwei bis drei Tage nach der Inokulation von *Agrobacterium* in *N. benthamiana*-Blätter, wurden drei Blattscheiben mittels Korkbohrer (Durchmesser 1 cm) ausgestanzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Blattmaterial mit einer Kugelmühle (30 Hz, 1 Minute) mechanisch aufgeschlossen. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde mit 100 µl 4xLaemmli (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 40 % (v/v) Glycerol; 8 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau) versetzt und für 5-10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (14.000 rpm, 5 Minuten) pelletiert. Der Überstand wurde zur Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE verwendet.

2.2.19. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das anorganische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine, indem es sich mit den hydrophoben Bereichen an hydrophobe Proteinebereiche anlagert. Die polare Kopfgruppe des SDS besitzt eine negative Ladung. Nach der Denaturierung von Proteinen in 4xLaemmli (5-10 Minuten, 95 °C) sind diese an der Oberfläche mit SDS überzogen und besitzen eine negative Gesamtladung. Aufgrund dieser Ladung können Proteine ihrer Größe nach mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die pH-abhängige Proteineigenladung ist dabei vernachlässigbar. Für die Auftrennung von Proteinen

mittels SDS-PAGE wurden 8 %- oder 10 %-ige SDS-Gele verwendet. Dabei handelt es sich stets um diskontinuierliche Gele (Trenn- und Sammelgel). Die Trenngellösung wurde vor der Polymerisierung zwischen zwei Glasplatten gegossen und die Geloberfläche durch die Überschichtung mit Isopropanol geebnet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde der Isopropanol dekantiert. Im Anschluss wurde die Sammelgellösung gegossen und ein Kamm für die Formung von Taschen zur Probenladung luftblasenfrei eingefügt. Der Gellauf erfolgte abhängig von der Gelgröße mit unterschiedlichen Laufapparaturen und Einstellungen (Spannung, Stromstärke, Zeit) bei RT und mit 1xTANK (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) Laufpuffer.

Bei der nicht-reduzierenden SDS-PAGE wurden die Proben nicht denaturiert (kein Kochen der Probe bei 95 °C) und der Ladepuffer enthielt kein β -Mercaptoethanol (100 mM Tris; 10 % (v/v) Glycerin; 3 % (w/v) SDS; Bromphenolblau; pH 8,0). Die gereinigten Proteine wurden mit dem nicht-reduzierenden Ladepuffer für 10 Minuten bei RT inkubiert und der Gellauf erfolgte bei 8 °C.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponente	Trenngel (40 ml)	Sammelgel (10 ml)
30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	X ml (je nach Prozentigkeit)	X ml (je nach Prozentigkeit)
1 M Tris-HCL	10 ml pH 8,8	1,25 ml pH 6,8
10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 ml	0,1 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	0,4 ml	0,1 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	0,016 ml	0,01 ml
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 40 ml	Auffüllen auf 10 ml

2.2.20. Immunblot-Analyse (Western Blot)

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels *wet*-Blot-Verfahren in Transferpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (95 V, max. A, 2 Stunden, 8 °C). Aufgrund der generellen Affinität der Nitrocellulose-Membran zu Proteinen mussten Proteinfreie-

Bereiche zunächst durch Inkubation in Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1xTBST, 1 Stunde bei RT) bedeckt werden. Die blockierte Membran wurde 4x für 5 Minuten bei RT mit 1xTBST gewaschen und anschließend über Nacht bei 8 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran erneut 4x mit 1xTBST bei RT gewaschen und für mindestens 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurden unspezifische Antikörper nochmals durch 4-maliges Waschen mit 1xTBST bei RT entfernt.

Die Detektion der Proteine bzw. der gebundenen Antikörper erfolgte mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Diesbezüglich wurde die Membran für 1 Minute in ECL-Detektionslösung (100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 0,75 % (v/v) Luminol (44 mg/ml in DMSO); 0,5 % (v/v) Cumarsäure (14 mg/ml in DMSO); 0,1 % (v/v) H₂O₂) inkubiert und anschließend entwickelt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase bildet aus H₂O₂ reaktive Sauerstoffradikale, die wiederum Chromogene oxidieren. Bei dieser Reaktion führen die freiwerdenden Photonen zur Schwärzung von Röntgenfilmen (Kodak). Nach einer kurzen Belichtung können die Röntgenfilme mit gebrauchsfertiger Entwickler- und Fixierlösung (Kodak) entwickelt werden.

2.2.21. EMSA

Für den *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) mit TALEs und DNA-Fragmenten wurden die gereinigten His₆-markierten TALE-Proteine zunächst mit 10 mM DTT über Nacht bei 8 °C reduziert (+). Um doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die Biotin-markierten bzw. unmarkierten, einzelsträngigen Oligonukleotide (*fwd* und *rev*) 1:1 gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Anschließend kühlte der Heizblock langsam und kontinuierlich über Nacht auf RT herunter. Am Folgetag wurden die Verdünnungsstufen der reduzierten Proteine sowie der unmarkierten doppelsträngigen DNA-Fragmente (Für Wettbewerbsanalysen) mittels Protein-storage-Puffer (+DTT) bzw. Millipore H₂O erstellt. Zunächst wurden (in dem Fall das Wettbewerbsanalysen durchgeführt wurden) die TALE-Proteine (266 fmol) mit einem Überschuss an unmarkierter DNA (1,66 nmol (50x) und 3,33 nmol (100x)) im EMSA-Puffer (100 mM KCl; 10 mM HEPES pH 7,5; 5 mM MgSO₄; 5 % (v/v) Glycerin) für 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Biotin-markierten DNA-Fragmente (33 fmol) hinzugefügt und der Reaktionsansatz für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Die gebildeten DNA-Protein-Komplexe wurden weiterhin mittels 5 %-igen

Polyacrylamidgel im EMSA Laufpuffer (0,5xTBE; 1 % (v/v) Glycerin) bei 8 °C aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels *wet*-Blot (0,5xTBE, 100 V, max. Ampere, 30 Minuten, 8 °C) auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet und die Membran daraufhin für eine Stunde bei 99 °C behandelt. Die Detektion der biotinylierten DNA-Fragmente erfolgte mittels *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit* (Life Technologies) den Herstellerangaben entsprechend.

2.2.22. GST pull-down

GST- und His₆-markierte Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) RIL-Zellen (Agilent Technologies) synthetisiert. Dafür wurden 50 ml Hauptkultur (OD₆₀₀ = 0,6 - 0,9) für 2 Stunden bei 37 °C mit IPTG (2 mM Endkonzentration) induziert und die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml 1xPBST resuspendiert, mit Lysozym versetzt und die Zellen durch drei Frost-Tau-Zyklen lysiert. Anschließend erfolgte ein DNase/RNase Verdau für 30 Minuten auf Eis. Die lösliche Fraktion (Totalextrakt, TE) wurde durch Zentrifugation (14.000 rpm, 30 Minuten, 4 °C) von Zelltrümmern getrennt. Parallel dazu wurde die Glutathion-Sepharose-Matrix (GE-Healthcare) vorbereitet. Dafür wurden 330 µl Matrix in jeweils ein 2 ml Eppi überführt und mit 1xPBST auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Matrix durch Zentrifugieren (14000 rpm, 1 Minute, 4 °C) pelletiert und zweimal mit 2 ml 1xPBST gewaschen. Die beiden Matrix-Pellets wurden daraufhin in 500 µl 1xPBST resuspendiert und vereint (verwendbare Matrix). Die GST-markierten Proteine (800 µl TE; für GST 40 µl TE + 760 µl 1xPBST) wurden an die vorbereitete Glutathion-Sepharose-Matrix (40 µl) für 1 Stunde bei 8 °C in einem Rollinkubator immobilisiert. Danach wurde die Matrix durch Zentrifugieren (4000 rpm, 1 Minute, 4 °C) pelletiert und zweimal mit 1 ml 1xPBST gewaschen. Im Anschluss wurden 700 µl TE der zu analysierenden potentiellen Interaktionspartner (His₆-markierte Proteine) auf die Matrix gegeben und für 2 Stunden bei 8 °C in einem Rollinkubator langsam invertiert. Danach wurde die Matrix durch Zentrifugieren pelletiert, mit 1 ml 1x BST versetzt und für weitere 10 Minuten bei 8 °C langsam invertiert. Darauf wurde die Matrix erneut dreimal mit 1 ml 1xPBST gewaschen. Der Überstand des letzten Waschschrilles diente als Waschfraktion (W) bei der folgenden SDS-PAGE. Zur Elution der immobilisierten GST-markierten Proteine (mit gebundenem His₆-markiertem Interaktionspartner) wurden 40 µl reduziertes Glutathion auf die Matrix gegeben und für 1 bis 2 Stunden bei 8 °C im Rollinkubator invertiert. Nach der Elution wurde der Überstand (Elutionsfraktion, E) von der Matrix durch

Zentrifugation (14.000 rpm, 1 Minute, 4 °C) getrennt. Für die fortführende Analyse mittels SDS-PAGE wurden die TE-, W- und E-Fractionen mit 4xLaemmli versetzt und denaturiert.

2.2.23. qRT-PCR

Zur Bestimmung der durch AvrBs3-induzierten Transkriptmenge von *UPA20* und *Bs3* wurde zunächst *Xanthomonas* 85-10 mit den jeweiligen Plasmiden (pGGX1) auf NYG Nährplatten mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Das *Xanthomonas*-Zellmaterial wurde in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 0,4 (4 x 10⁸ Zellen/ml) verdünnt. Diese *Xanthomonas*-Suspensionen wurden mit einer Kanülenlosen Spritze in Blätter von Paprika (*C. annuum*, ECW-30R) inokuliert. Nach 14 bis 16 Stunden wurden 20 Blattscheiben (Durchmesser 0,28 cm) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluss des Pflanzenmaterials erfolgte mittels Kugelmühle (30 Hz, 2 Minuten) und die RNA-Isolierung mit Hilfe des *RNeasy Plant Miniprep Kit* (Quiagen) nach Herstellerangaben. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Nanodrop (Life Technologies) ermittelt. Die anschließende cDNA-Synthese von jeweils 4 µg RNA erfolgte durch reverse Transkription unter Verwendung von oligo dT-Primer und des *Revert Aid First Strand Synthesis Kit* (Life Technologies) den Herstellerangaben entsprechend. In die qRT-PCR-Reaktion wurden 40 ng cDNA eingesetzt und der *ABsolut Blue QPCR SYBR Green ROX Mix* (Thermo Scientific) verwendet. Die für die Amplifizierung der cDNA verwendeten Oligonukleotide für *UPA20* bzw. *Bs3* sowie des Referenzgens *EF1α* sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Die Spezifität der Oligonukleotide wurde mit einer Schmelzkurve (in 0,5 °C-Schritten für jeweils 15 Sekunden von 50 °C bis 100 °C) überprüft.

Tabelle 2.20: qRT-PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Reaktionsansatz	Endkonzentration
<i>ABsolut blue QPCR SYBR Green ROX Mix</i>	10 µl	2,5 ng/µl
Oligonukleotid Mix (<i> fwd</i> und <i> rev</i> ; 1 µM)	2,8 µl	140 nM
cDNA (10 ng/µl)	4 µl	2 ng/µl
Milipore H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl	

Programm für qRT-PCR

1	Denaturierung	95 °C	15 Minuten
2a.	Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
2b	Anlagerung	57 °C	15 Sekunden
2c	Amplifikation	72 °C	25 Sekunden (Messung; 50x Zyklus zu 2a)
3.	Denaturierung	95 °C	10 Sekunden
4.	Anlagerung	50 °C	10 Sekunden
5a.	Schmelzkurve	50 °C	15 Sekunden (in 0,5 °C-Schritten zu 5b)
5b.	Schmelzkurve	100 °C	15 Sekunden

Zur Berechnung der relativen Transkriptmengen wurde zunächst der Schwellenzyklus (C_T) jeder Probe ermittelt. Der C_T -Wert ist der Zyklus bei dem sich die Fluoreszenz einer Probe exponentiell von der Hintergrundstrahlung abhebt. Dies geschieht durch die Amplifizierung von cDNA bei der die Menge des Amplifikats in jedem Zyklus verdoppelt wird. In einem qRT-PCR-Diagramm ist die Fluoreszenz (Y-Achse) über der Zyklenzahl (X-Achse) aufgetragen. Es wurde eine Gerade parallel zur X-Achse in das Diagramm gelegt die jede Fluoreszenzkurve am Beginn der exponentiellen Phase schneidet. Das gefällte Lot unter diesen Schnittpunkten zeigt den C_T -Wert der jeweiligen Probe auf der X-Achse. Um den C_T -Wert genau zu bestimmen müssen mindestens zwei technische Replikate durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt werden. Die Standardabweichung des Mittelwertes sollte dabei einen halben Zyklus nicht überschreiten.

Für die Berechnung der relativen Transkriptmengen musste die Amplifikationseffizienz der verwendeten Oligonukleotide ermittelt werden. Dafür wurden Verdünnungsstufen einer Referenz-cDNA (AvrBs3(WT)-Probe) erstellt und bei der qRT-PCR mitgeführt. Diese Verdünnungsstufen müssen so gewählt werden, dass sie den Bereich der eingesetzten cDNA-Mengen abdecken. In einem Diagramm indem die Schwellenzyklen (Y-Achse) über den logarithmischen Verdünnungsstufen (X-Achse) aufgetragen sind, kann durch lineare Regression dieser Punkte die Formel zur Berechnung der relativen Transkriptmengen mit Excel generiert werden ($Y = m * X + n$; m - Anstieg der Eichgraden; n - Schnittpunkt mit der Y-Achse). In dieser Formel entspricht X dem C_T -Wert und der daraus errechenbare Wert Y dem dekadischen Logarithmus der relativen Ausgang-cDNA-Menge einer jeweiligen Probe. Dies wurde sowohl für das Referenzgen *EF1 α* als auch *UPA20* bzw. *Bs3* durchgeführt. Die relativen Ausgangs-cDNA-Mengen des Referenzgens *EF1 α* dienten zur Normalisierung der relativen Ausgangs-cDNA-Mengen von *UPA20* bzw. *Bs3*.

2.2.24. Konfokale laser-scanning Mikroskopie (LSM)

Für Lokalisierungsstudien von GFP-markierten Proteinen wurde Blattmaterial drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression geerntet. Zur Markierung von Zellkernen wurde das Blattmaterial durch Unterdruck mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI-Lösung 1 µg/ml in Methanol) versetzt und für 1 Stunde, ohne Lichteinwirkung und bei RT inkubiert. Die Blattscheiben wurden anschließend auf ein Objektträger übertragen mit Wasser benetzt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Mit dem *laser-scanning*-Mikroskop (LSM, Zeiss) ist es möglich neben der Lichtmikroskopie auch die Lokalisierung von Fluoreszenzproteinen zu analysieren. GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima. Es absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 475 nm (blau) und 395 nm (ultraviolett). Bei der Bestrahlung des Blattgewebes mit einem starken monochromatischem Licht (Laser) mit einer Wellenlänge im Bereich der Absorptionsmaxima von GFP werden die Elektronen des Fluorochroms (Ser65-Tyr66-Gly67) vom Grundniveau auf ein höheres Niveau angeregt. Dieser Zustand des erhöhten Energieniveaus ist nicht stabil und fällt unter Freisetzung von Wärme und Emission von Photonen (Fluoreszenzlicht) wieder auf das Grundniveau herab. Das Fluoreszenzlicht von GFP besitzt eine Wellenlänge von 509 nm (grün). Für die DAPI-Färbung trifft dasselbe Prinzip zu, wobei die Absorption bei 340 nm und die Emission bei 450 nm erfolgte. Das LSM detektiert Fluoreszenz hochauflösend und ermöglicht damit eine Analyse der subzellulären Lokalisierung von Fluorophor-markierten Proteinen. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm ZEN (Mikroskop-Software, Zeiss) bearbeitet und erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Funktionelle Charakterisierung der Homo-Oligomerisierung von AvrBs3

Für AvrBs3 wurde eine Homo-Oligomerisierung *in vitro* (GST-pull-down), in Hefe (Hefe-Dihybrid-Studien) und *in planta* (Ko-Kernimport) gezeigt (Gürlebeck *et al.* 2005). Das Molekulargewicht des AvrBs3-Homo-Oligomers deutet darauf hin, dass es sich hierbei vermutlich um ein Dimer handelt (BN-PAGE; (Gürlebeck *et al.* 2005)). Vorarbeiten lieferten erste Hinweise auf eine Beteiligung von Disulfidbrücken an der Homo-Oligomerisierung von rekombinantem AvrBs3, da die Zugabe von DTT zu einer Anreicherung von Monomeren führte (D. Blüher und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). In der AS-Sequenz von AvrBs3 sind 19 Cysteine enthalten. Es befindet sich je ein Cystein an Position 30 in jedem 34 AS-Repeat (C30) und zwei weitere Cysteine in der C-terminalen Region (CTR; Position C912 und C963). Die Hypothese der Disulfidbrücken-basierten Homo-Oligomerisierung von AvrBs3 wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft. Ein zusätzliches Ziel stellte die Analyse der biologischen Funktion der AvrBs3-Oligomerisierung dar.

3.1.1. AvrBs3 oligomerisiert über Disulfidbrücken und bindet DNA als Monomer

Zunächst wurde die Beteiligung von Disulfidbrücken an der AvrBs3-Oligomerisation überprüft und Konditionen identifiziert, die zur vollständigen Reduktion der AvrBs3-Oligomere führen. Dazu wurde 6x-His-markiertes AvrBs3 (His₆-AvrBs3) in *E. coli* exprimiert und gereinigt (siehe 2.2.17). Je 0,5 µg gereinigtes His₆-AvrBs3 wurde mit steigenden Mengen von DTT (0-15 mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT), bzw. mit 10 mM DTT über Nacht (ÜN) bei 8 °C behandelt und anschließend mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE analysiert (siehe 2.2.19). Wie die Abbildung 3.1.1 A zeigt, lag AvrBs3 ohne Inkubation mit DTT in komplexer Form vor. Mit zunehmender DTT-Konzentration nahm die Menge an AvrBs3-Monomer zu. Die vollständige Reduktion der AvrBs3-Homo-Oligomere zu Monomeren wurde durch Inkubation in

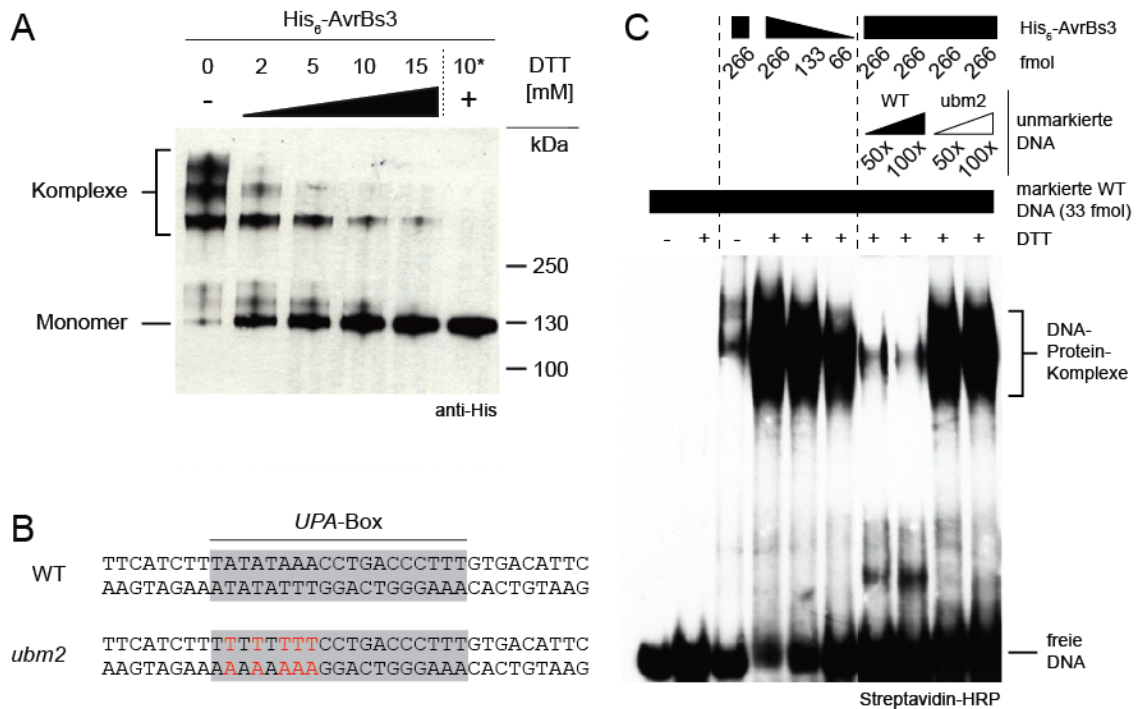


Abbildung 3.1.1: Die AvrBs3-Homo-Oligomerisierung hemmt die DNA-Bindung

(A) AvrBs3 oligomerisiert über Disulfidbrücken. 0,5 µg gereinigtes His₆-AvrBs3 wurde mit verschiedenen DTT-Konzentrationen für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. mit 10 mM DTT über Nacht bei 8 °C (10*, +) inkubiert. Die Proteine wurden mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen His-Antikörpers detektiert. (B) Basensequenz der für EMSA-Studien verwendeten DNA-Fragmente. Die von AvrBs3-gebundene DNA-Zielsequenz (UPA-Box) ist grau unterlegt. Mutationen in der *ubm2*-Sequenz sind rot markiert. (C) AvrBs3 bindet als Monomer an die DNA. Biotinylierte DNA wurde mit unbehandeltem oder reduziertem (+, Inkubation mit 10 mM DTT über Nacht bei 8°C) His₆-AvrBs3 für 30 Minuten bei RT inkubiert. Ein Überschuss an unmarkierter WT-DNA und mutierter DNA (50x, 100x) wurde für die Kompetitionsanalyse eingesetzt. Proben wurden mittels 5 %igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine positiv geladene Membran transferiert und die biotinylierten DNA-Fragmente bzw. DNA-Protein-Komplexe mittels Western Blot unter Verwendung einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP; *horseradish peroxidase*) und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem detektiert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

10 mM DTT über Nacht (10*) erreicht (Abbildung 3.1.1 A). Dies bestätigt die Hypothese, dass AvrBs3 über Disulfidbrücken oligomerisiert. Es stellte sich die Frage, ob AvrBs3 als Monomer oder Dimer an DNA bindet. Aus diesem Grund wurde nicht-reduziertes und reduziertes His₆-AvrBs3 mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) auf DNA-Bindung untersucht (siehe 2.2.21). Als "Ziel-DNA" wurde ein biotinyliertes doppelsträngiges 36 Bp-Fragment verwendet, welches vom *UPA20*-Promotor abgeleitet wurde und zentral die von AvrBs3-gebundene DNA-Zielsequenz (UPA-Box) enthielt (WT; Abbildung 3.1.1 B). Es zeigte sich, dass bei der Inkubation des DNA-Fragments mit unbehandeltem His₆-AvrBs3 (-) deutlich weniger DNA-Protein-Komplexe detektiert werden konnten als bei der Inkubation mit der gleichen molaren Menge reduziertem His₆-AvrBs3 (+) (Abbildung 3.1.1 C). Konkurrenzexperimente mit

unmarkierter WT-DNA bzw. unmarkierter mutierter DNA (*ubm2*; (Kay *et al.* 2009); Abbildung 3.1.1 B) bestätigten die Spezifität dieser Bindung (Abbildung 3.1.1 C). Dies deutet an, dass AvrBs3 als Monomer an die DNA bindet und dass eine AvrBs3-Homo-Oligomerisierung die DNA-Bindung negativ beeinflusst. Zwischenzeitlich erhaltene Strukturdaten und ITC-Messungen zeigten, dass ein Molekül eines TAL-Effektors an ein Molekül doppelsträngige DNA bindet ((Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012); F. List und U. Bonas unveröffentlichte Daten).

3.1.2. Die Cysteine der *repeats* sind notwendig für die AvrBs3-Oligomerisierung, jedoch nicht für die spezifische DNA-Bindung *in vitro*

Die Aminosäuresequenz von AvrBs3 weist 19 Cysteine auf: ein Cystein pro *repeat* (C30) und 2 Cysteine in der CTR (Abbildung 3.1.2 A). Für AvrBs3 ist bekannt, dass die *repeat*-Region für die Dimerisierung essenziell ist (Gürlebeck *et al.* 2005). Um herauszufinden, ob die Cysteine in den *repeats* für die AvrBs3-Oligomerisierung verantwortlich sind, wurden diese zu Serin bzw. Alanin substituiert (AvrBs3(C30S)_{Rep} bzw. AvrBs3(C30A)_{Rep}; Abbildung 3.1.2 A). Als Kontrolle diente ein AvrBs3-Derivat, bei dem alle Cysteine zu Serin substituiert wurden (AvrBs3(Cys/Ser)). Für die gezielte, PCR-basierte Mutagenese einzelner AvrBs3-*repeats*, mussten auf Grund der starken Konservierung DNA-*repeat*-Submodule erstellt werden. Diese sind von *BpI*-Schnittstellen flankiert und ermöglichen eine gerichtete Assemblierung der *repeat*-Region mittels Golden-Gate-Klonierung (T. Schreiber und U. Bonas unveröffentlicht; siehe 2.2.13 und 7.6.4). Mutationen innerhalb der AvrBs3-*repeats* wurde auf der Ebene der DNA-*repeat*-Submodule erstellt. Die generierten AvrBs3-Derivate, wurden wie in 3.1.1 beschrieben mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE bezüglich der Fähigkeit zur Homo-Oligomerisierung analysiert (Abbildung 3.1.2 B). Da die Cystein-zu-Serin-Substitution die Proteinstabilität von AvrBs3 negativ beeinflusste (Schreiber *et al.* 2015), wurden N-terminal verkürzte AvrBs3-Derivate verwendet (Deletion der N-terminalen 152 Aminosäuren His₆-AvrBs3-ΔN152(Cys/Ser), His₆-AvrBs3-ΔN152(C30S)_{Rep} und His₆-AvrBs3-ΔN152(C30A)_{Rep}). Die N-terminale Verkürzung von AvrBs3 führt zu größeren Ausbeuten bei der Proteinreinigung und einer erhöhten Stabilität des Proteins, ohne die Aktivität *in planta* zu beeinflussen ((Szurek *et al.* 2001); A. Sorgatz und U. Bonas unveröffentlicht). Es zeigte sich, dass AvrBs3 keine

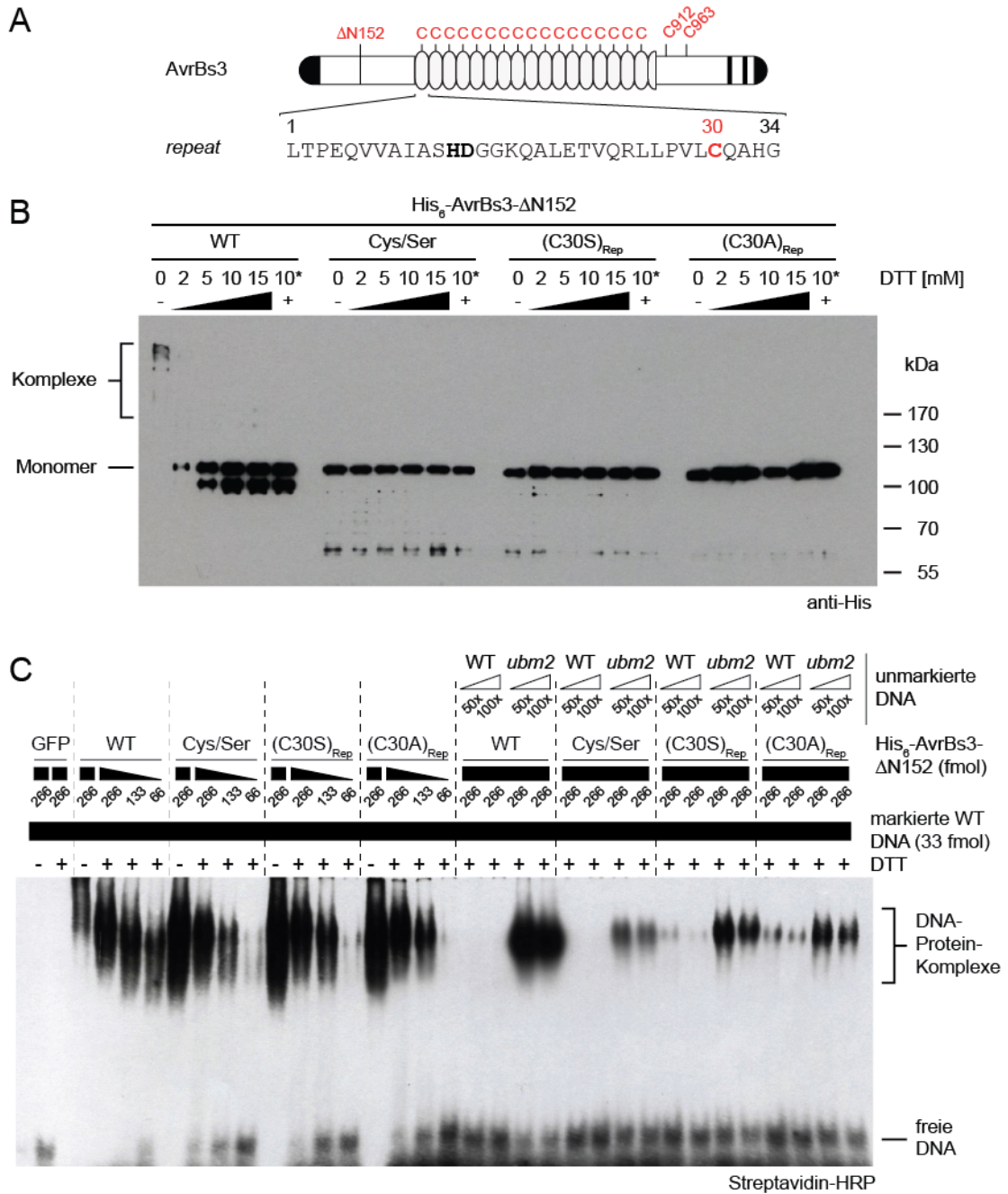


Abbildung 3.1.2: AvrBs3-Derivate mit Cystein-Substitutionen zeigen keine Oligomerisierung und eine reduzierte spezifische DNA-Bindung.

(A) Schematische Darstellung der erstellten AvrBs3-ΔN152-Derivate mit Cystein-Substitutionen für die rekombinante Expression in *E. coli*. N-terminale Verkürzung und substituierte Cysteine sind rot markiert. (B) Substitution der Cysteine in den repeats führt zum Verlust der AvrBs3-Oligomerisation. 0,5 µg gereinigtes His₆-AvrBs3-ΔN152, His₆-AvrBs3-ΔN152(Cys/Ser), His₆-AvrBs3-ΔN152(C30S)_{Rep} und His₆-AvrBs3-ΔN152(C30A)_{Rep} wurden mit verschiedenen DTT-Mengen für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. mit 10 mM DTT über Nacht bei 8 °C (10*, +) inkubiert und mittels nicht reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der His₆-markierten Proteine erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen His-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. (C) AvrBs3-ΔN152-Derivate mit Cystein-Substitutionen binden spezifisch an DNA. Biotinylierte DNA wurde mit unbehandelten oder reduzierten (+, Inkubation in 10 mM DTT über Nacht bei 8 °C) His₆-AvrBs3-ΔN152-Derivaten für 30 Minuten bei RT inkubiert. Ein Überschuss an unmarkierter WT und mutierter (*ubm2*) DNA-Fragmente wurden für die Kompetitionsanalyse verwendet. Proben wurden mittels 5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die biotinylierten DNA-Fragmente mittels Western Blot

unter Verwendung einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP; *horseradish peroxidase*) und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem detektiert. B und C wurden parallel mit denselben Proteinaliquots durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Homo-Oligomere bildet, wenn die Cysteine in den *repeats* durch Serin oder Alanin ersetzt sind (Abbildung 3.1.2 B). Demzufolge könnten die Cysteine in den *repeats* für die Oligomerisierung von AvrBs3 verantwortlich sein. Um den Einfluss der Cystein-Substitutionen in den *repeats* von AvrBs3 auf die spezifische DNA-Bindung zu untersuchen, wurden parallel zu der nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit denselben Proteinaliquots EMSA-Studien durchgeführt. His₆-AvrBs3(Cys/Ser), His₆-AvrBs3-ΔN152(C30S)_{Rep} sowie His₆-AvrBs3-ΔN152(C30A)_{Rep} binden DNA mit einer leicht reduzierten Affinität verglichen mit His₆-AvrBs3-ΔN152(WT) (Abbildung 3.1.2 C). Konkurrenzexperimente mit unmarkierter WT-DNA-Fragmenten und mutierten DNA-Fragmenten (*ubm2*), bestätigten die Spezifität der DNA-Bindung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindespezifität von His₆-AvrBs3(Cys/Ser), His₆-AvrBs3-ΔN152(C30S)_{Rep} und His₆-AvrBs3-ΔN152(C30A)_{Rep}, im Vergleich zu His₆-AvrBs3-ΔN152(WT), leicht verringert ist (Abbildung 3.1.2 C). Die Cysteine-zu-Serin- bzw. Cysteine-zu-Alanin-Substitution in den *repeats* von AvrBs3 führt nicht zum kompletten Verlust der spezifischen DNA-Bindeaktivität *in vitro*.

3.1.3. Cysteine der *repeats* sind essentiell für die *in planta*-Aktivität von AvrBs3

Wie in der Abbildung 3.1.1 C gezeigt wurde, beeinträchtigt die Oligomerisierung von AvrBs3 dessen DNA-Bindeaktivität *in vitro*. Daraus ergab sich die Frage, ob ein AvrBs3-Derivat, welches nur als Monomer vorliegt eine erhöhte Aktivität *in planta* besitzt. Daher wurden verschiedene Konstrukte für die *in planta* Expression von AvrBs3-Derivaten mit Cysteine-Substitutionen erstellt (T-DNA; Effektorkonstrukt; pGGA2 bzw. pGGA8; siehe Tabelle 2.6) und deren Aktivität mittels quantitativer GUS-Reporteranalyse (*N. benthamiana*, siehe 2.2.16) und HR-Assay untersucht (*C. annuum* (ECW-30R), *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*; siehe 2.2.15; Abbildung 3.1.3 A). Bei der quantitativen GUS-Reporteranalyse wurde neben dem Effektorkonstrukt zusätzlich eine T-DNA verwendet, auf der sich ein Reporter gen (β -Glucuronidase, *uidA*, GUS) unter der Kontrolle von *Bs4*-Minimalpromotors (*pBs4min*) mit 5'-fusionierter AvrBs3 DNA-Zielsequenz befindet (Reporterkonstrukt;

pGWB3; siehe Tabelle 2.6). Es zeigte sich, dass die Substitution der Cysteine in der CTR keinen Einfluss auf die AvrBs3-Aktivität hat (AvrBs3(C912S; C963S)). Zudem wies die Cystein-zu-Serin-Substitution einzelner AvrBs3-*repeats*, ausgenommen *repeat* 1, keinen Einfluss auf die Aktivität auf. Im Gegensatz dazu führten die Substitutionen der Cysteine in Blöcken von 4 bis 6 *repeats* zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität. Die AvrBs3-Derivate, in den die Cysteine aller *repeats* bzw. alle Cysteine substituiert wurden (AvrBs3(Cys/Ser); AvrBs3(C30S)_{Rep}; AvrBs3(C30A)_{Rep}), besaßen keine

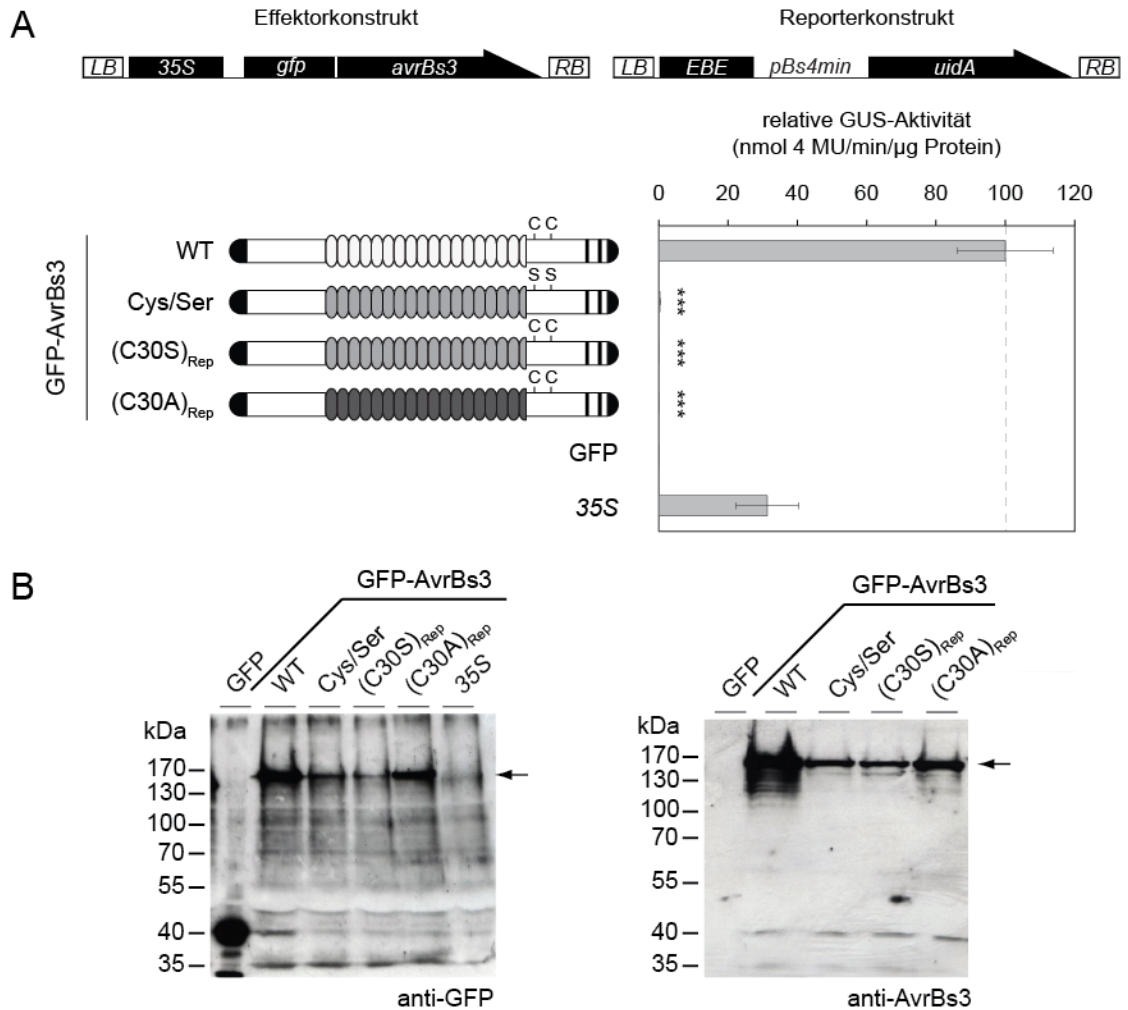


Abbildung 3.1.4: Die Cysteine in den *repeats* sind essentiell für die AvrBs3-vermittelte Transkriptionsaktivierung *in planta*.

(A) Verwendete AvrBs3-Derivate und deren korrespondierenden Aktivitäten relativ zur AvrBs3(WT)-vermittelten GUS-Aktivität. Das Effektorkonstrukt führt zur konstitutiven Expression von GFP-markierten AvrBs3-Derivaten. Das Reporterkonstrukt besitzt die optimale, *mismatch*-freie AvrBs3-DNA-Zielsequenz (EBE). Ovale stehen für *repeats* (weiß - WT; hellgrau - C30S; dunkelgrau - C30A). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation bestimmt. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p*-values: *** $p < 0,001$). GUS-Reporteranalyse wurde mit P19 durchgeführt. (B) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der GFP-markierten AvrBs3-Derivate *in planta* (markiert durch Pfeile) mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer anti-GFP und anti-AvrBs3 Antikörper und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Aktivität *in planta* (Abbildung 3.1.3 A). Der HR-Assay zeigte, dass die AvrBs3-Derivate, die keine Aktivität in der GUS-Reportergenanalyse aufwiesen, auch keine HR mehr induzierten (AvrBs3(Cys/Ser), AvrBs3(C30S)_{Rep}, AvrBs3(C30A)_{Rep}; Abbildung 3.1.3 A, Phänotypen siehe 7.1). Die restlichen AvrBs3-Derivate induzierten eine HR, allerdings zeigte sich, dass bei AvrBs3-Derivaten mit Cysteine-zu-Alanin-Substitutionen die induzierte HR stets zu einem späteren Zeitpunkt auftrat als bei den entsprechenden AvrBs3-Derivaten mit Cysteine-zu-Serin-Substitutionen (Abbildung 3.1.3 A). Des Weiteren führte die Cystein-zu-Serin-Substitution der mittleren AvrBs3-*repeats* (*repeat* 6-11) ebenfalls zu einer verzögerten HR-Induktion (Abbildung 3.1.3 A). Der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Derivate mittels Western Blot (siehe 2.2.20) ergab, dass sich die Cystein-zu-Serin-Substitution aller Cysteine (AvrBs3(Cys/Ser)) bzw. aller Cysteine in der *repeat*-Region (AvrBs3(C30S)_{Rep}) negativ auf die Proteinstabilität auswirkte (Abbildung 3.1.3 B und C). Die Proteinakkumulationen der Cystein-zu-Alanin-Substitutionen war hingegen vergleichbar mit dem WT-Protein, wobei diese wie die Cystein-zu-Serin-Substitutionen keine Aktivität besaßen (AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep}; Abbildung 3.1.3 A). GFP-markierte AvrBs3-Derivate, bei denen alle Cysteine der *repeat*-Region zu Serin ausgetauscht wurden, zeigten zwar eine stabilere Expression, jedoch konnten diese das Reporter-gen ebenfalls nicht induzieren (Abbildung 3.1.4 A und B). Dies deutet darauf hin, dass der Aktivitätsverlust der AvrBs3-Derivate mit Cystein-zu-Serin-Substitution (AvrBs3(Cys/Ser), AvrBs3(C30S)_{Rep}) nicht durch eine verminderte Expressionsrate verursacht wird.

3.1.4. Die Cysteine der *repeat*-Region sind essentiell für die biologische Aktivität von AvrBs3

Zusätzlich sollte die Aktivität der Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate im Kontext der *Xcv*-Paprika-Interaktion analysiert werden. Dafür wurden Konstrukte generiert, die eine konstitutive Expression der AvrBs3-Derivate in *Xcv* 85-10 gewährleisten (pGGX1; siehe Tabelle 2.6). Die triparentale Konjugation der Expressionskonstrukte in *Xcv* 85-10 und die Expressionsanalyse der AvrBs3-Derivate mittels Western Blot (Abbildung 3.1.5) wurden aus zeitlichen Gründen von Anika Sorgatz in der AG Bonas durchgeführt.

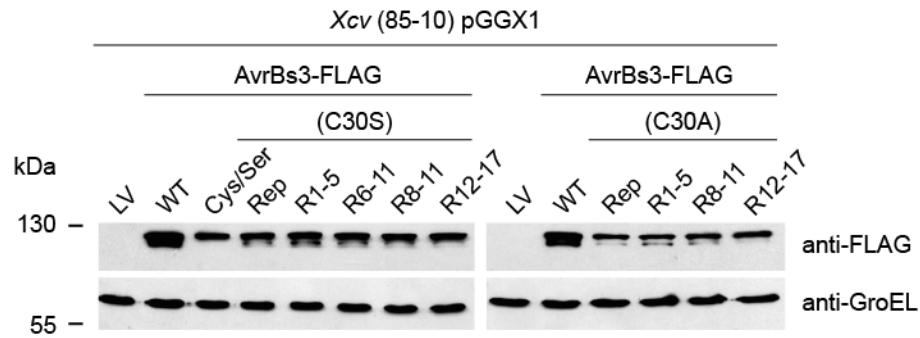


Abbildung 3.1.5: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3-Derivate in Xcv 85-10.

Der *Xcv*-Proteinextrakt wurde mittels 10 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteinsynthesenachweis erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines FLAG- bzw. GroEL-spezifischen Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. GroEL diente als Ladungskontrolle. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Die *Xcv*-Stämme mit den verschiedenen Expressionsplasmiden wurden in *C. annuum* ECW-30R inokuliert und die AvrBs3-vermittelte Induktion der HR über einen Zeitraum von zwei bis fünf Tagen nach Inokulation dokumentiert (Abbildung 3.1.6). Der *Xcv*-Stamm mit einem Vektor ohne *insert* diente hierbei als Negativkontrolle (*Xcv* 85-10 (pGGX1-LV)) und der AvrBs3(WT)-exprimierende *Xcv*-Stamm als Positivkontrolle. Die Substitution aller Cysteine bzw. der Cysteine in der *repeat*-Region führte zum Aktivitätsverlust von AvrBs3 und zum Ausbleiben der AvrBs3-vermittelten HR-Induktion. Im Vergleich zu AvrBs3(WT), induzierten die AvrBs3-Derivate mit Cystein-zu-Serin-Substitutionen in *repeat*-Blöcken eine verzögerte HR, wobei die Cysteine-zu-Serin-Substitution in den *repeats* 8 bis 11 die geringste und die Cystein-zu-Serin-Substitution in den *repeats* 6 bis 11 die längste Verzögerung der AvrBs3-vermittelten Bs3-HR aufwies (2 dpi; Abbildung 3.1.6). Zusätzlich zeigte sich, dass die Cystein-zu-Alanin-Substitutionen zu einer noch geringeren Aktivität von AvrBs3 führten als die Cysteine-zu-Serin-Substitutionen, was in einer weiteren Verzögerung der AvrBs3-vermittelten HR zu erkennen ist (3 dpi; Abbildung 3.1.6).

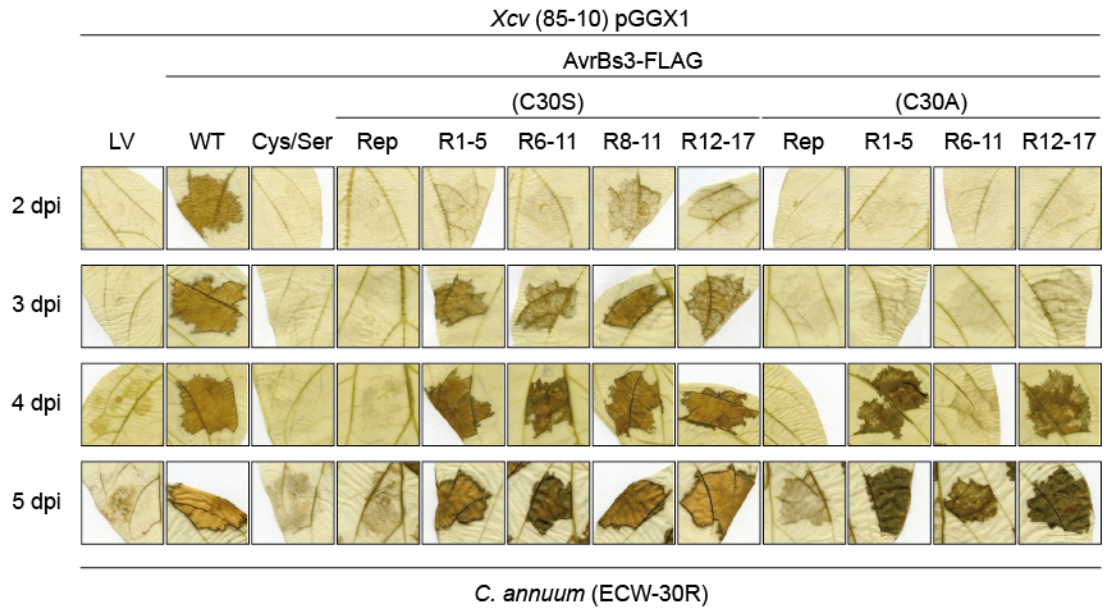


Abbildung 3.1.6: Die Cysteine in den AvrBs3-repeats sind essentiell für die HR-Induktion nach Inokulation von *Xcv* 85-10 in *C. annuum* ECW-30R

Gezeigt sind die HR-Phänotypen nach Inokulation von *Xcv* 85-10 in *C. annuum* (ECW-30R). Die *Xcv*-Stämme wurden mit einer $OD_{600} = 0,4$ in *C. annuum* ECW-30R inokuliert. Die Blätter wurden den Angaben entsprechend nach Inokulation geerntet und zur besseren Visualisierung der HR in Ethanol gebleicht. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Neben der makroskopischen Analyse der AvrBs3-vermittelten HR in *C. annuum* ECW-30R, wurden auch die durch die AvrBs3-Derivate induzierten Transkriptmengen von *Bs3* und *UPA20* mittels qRT-PCR ermittelt. Dafür wurde Pflanzenmaterial 14-16 Stunden nach Inokulation geerntet (siehe 2.2.23). Die *Xcv*-Stämme mit pGGX1:AvrBs3(WT) und pGGX1:LV (leerer Vektor) dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die Transkriptmenge des *Elongationsfaktors 1 α* (*EF1α*) diene als Referenz (Verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle 2.5). Die durch AvrBs3(WT)-induzierte Transkriptmenge von *Bs3* bzw. *UPA20* wurde auf den Wert „1“ gesetzt und alle restlichen durch AvrBs3-Derivate induzierten Transkriptmengen von *Bs3* bzw. *UPA20* sind relativ zu diesem Wert dargestellt (Abbildung 3.1.7). Hierbei zeigte sich, dass lediglich die AvrBs3-Derivate mit Cystein-zu-Serin-Substitutionen in *repeat*-Blöcken (R1-5, R8-11 und R12-17) die Transkription von *Bs3* und *UPA20* induzierten. Alle anderen AvrBs3-Derivate hingegen, führten zu keinem Anstieg der *Bs3*- bzw. *UPA20*- Transkriptmenge (Abbildung 3.1.7). Weiterhin führten die qRT-Analysen zu der Erkenntnis, dass bereits geringste Mengen an *Bs3*-Transkript zur Induktion einer HR ausreichend sind.

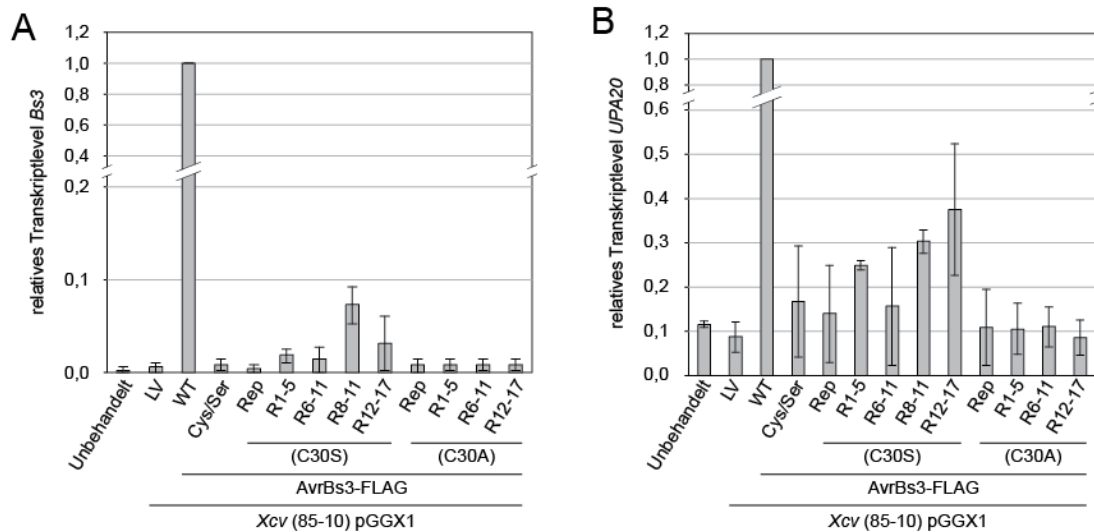


Abbildung 3.1.7: Bestimmung der relativen Transkriptmengen von *Bs3* und *UPA20* in *C. annuum* ECW-30R nach *Xcv*-vermittelter Translokation von *AvrBs3* bzw. *AvrBs3*-Derivaten.

Gezeigt sind die relativen Transkriptmengen von *Bs3* und *UPA20* nach Inokulation von *Xcv* 85-10 in *C. annuum* (ECW-30R). Pflanzenproben für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden 14-16 Stunden nach Inokulation geerntet. Die qRT-PCR wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für *Bs3* (A) und *UPA20* (B) durchgeführt. *Xcv*-Stämme mit *AvrBs3*(WT) und Leervektor dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Induzierte Transkriptmengen sind relativ zu den durch *AvrBs3*(WT)-induzierten Transkriptmengen und repräsentieren Mittelwerte aus drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten (standard deviation of means).

3.1.5. Cystein-substituierte *AvrBs3*-Derivate lokalisieren im pflanzlichen Zellkern

Da die Substitution der Cysteine der *repeat*-Region zum Aktivitätsverlust von *AvrBs3* führt (Abbildung 3.1.3, Abbildung 3.1.4, Abbildung 3.1.6, Abbildung 3.1.7) und EMSA-Studien zeigten, dass Cystein-substituierten *AvrBs3*-Derivate spezifisch an DNA binden (Abbildung 3.1.2 C), ist unklar, warum diese keine Aktivität *in planta* besitzen. Um auszuschließen, dass die Substitution aller Cysteine in den *repeats* die subzelluläre Lokalisation von *AvrBs3* beeinflusst, wurde die Lokalisation von GFP-markierten *AvrBs3*-Derivaten (*AvrBs3*(Cys/Ser), *AvrBs3*(C30S)_{Rep} und *AvrBs3*(C30A)_{Rep}) *in planta* analysiert (siehe 2.2.24). Die *AvrBs3*-Derivate wurden *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert und deren Lokalisation drei dpi mittels konfokalem Mikroskop untersucht. GFP-*AvrBs3* diente als Positivkontrolle für die Kernlokalisierung. Um die Zellkerne zu visualisieren wurde die DNA der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Alle getesteten *AvrBs3*-Derivate sind, wie *AvrBs3*(WT), im pflanzlichen Zellkern lokalisiert (Abbildung 3.1.8 A). Die Synthese aller Proteine wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.1.8 B).

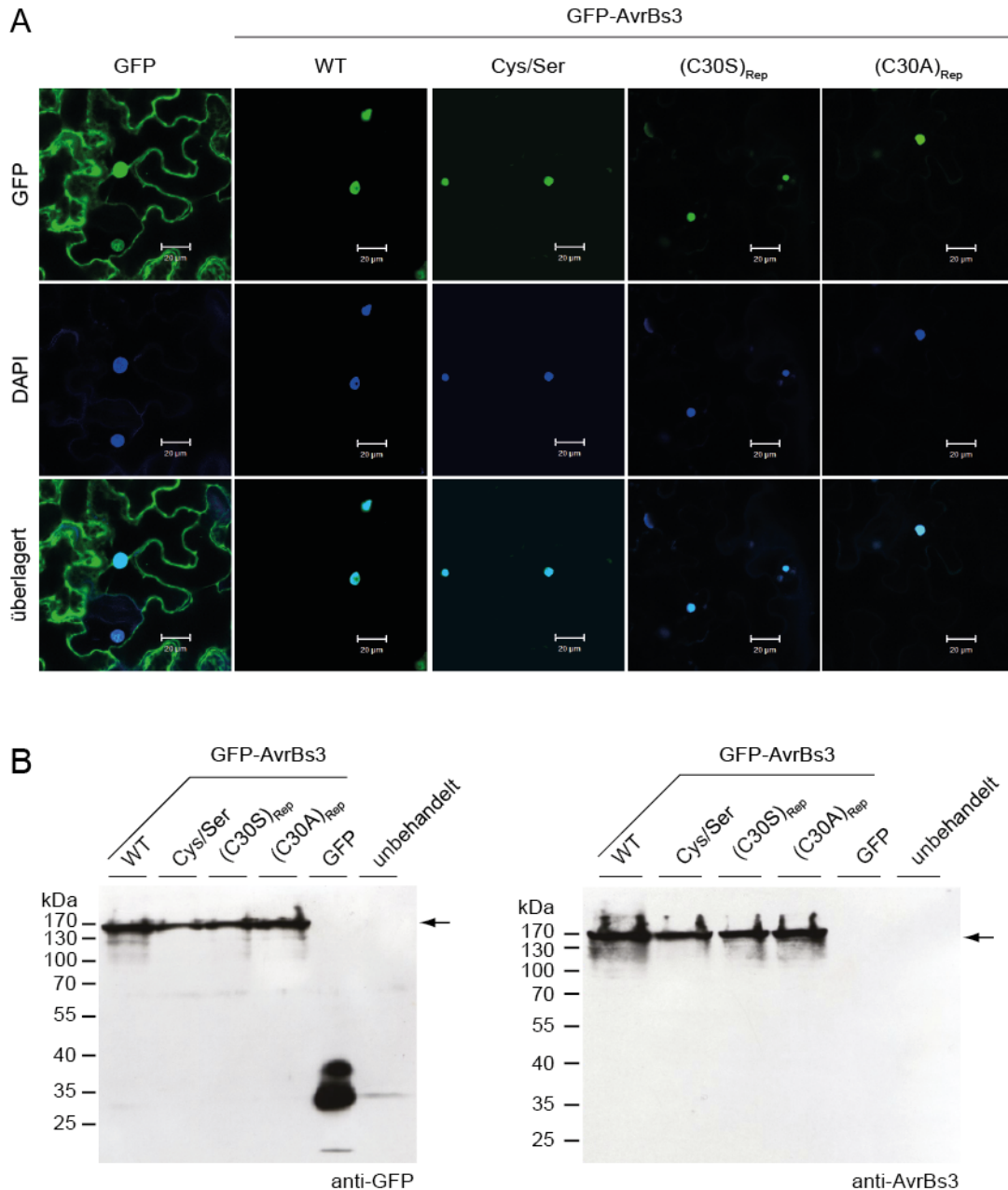


Abbildung 3.1.8: Cystein-substituierte AvrBs3-Derivate lokalisieren im pflanzlichen Zellkern.

(A) Analyse der subzellulären Lokalisation der GFP-markierten AvrBs3-Derivate mittels konfokalem Mikroskop drei Tage nach *Agrobacterium*-vermittelter Expression in Blättern von *N. benthamiana*. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung kennzeichnet DNA in Zellkernen. Der Maßstab kennzeichnet eine Länge von 20 µm. GFP-AvrBs3 diente als Positivkontrolle für Zellkernlokalisation. **(B)** Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der GFP-markierten Proteine *in planta* mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer GFP- sowie AvrBs3-Antikörper und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.1.6. Cystein-substituierte AvrBs3-Derivate haben spezifische DNA-Bindung *in planta* verloren

Trotz spezifischer DNA-Bindung *in vitro* und Lokalisierung im pflanzlichen Zellkern sind AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} *in planta* inaktiv. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Substitution der Cysteine in den *repeats* die Transkriptionsinitiation verhindert. In diesem Fall könnten AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} als Repressoren genutzt werden. Daher wurde ein Kompetitions-Assay mittels quantitativer GUS-Reportergenstudie durchgeführt. Dieser basiert darauf, dass drei *Agrobacterium*-Stämme (zwei T-DNAs mit Effektoronstrukten und eine T-DNA mit Reporterkonstrukt) in Blätter von *N. benthamiana* inokuliert werden. Dabei konkurrieren die Effektoren (AvrBs3 und AvrBs3(C30S)_{Rep}) um dieselbe DNA-Zielsequenz im Reporterkonstrukt (Abbildung 3.1.9 A). Als Positivkontrolle diente ein AvrBs3-Derivat, in dem die Aktivierungsdomäne deletiert wurde (AvrBs3-ΔAD). In Hefe konnte bereits gezeigt werden, dass TALEs ohne Aktivierungsdomäne die Transkription aktiver Gene blockieren und deren Aktivität unterdrücken können (Blount *et al.* 2012). Als Negativkontrolle wurde der TALE Hax2 (*homolog of AvrBs3 in Xanthomonas 2*; (Kay *et al.* 2005)) verwendet, dessen DNA-Zielsequenz sich von der AvrBs3 DNA-Zielsequenz unterscheidet. Die Koexpression der TALE-Derivate mit GFP in *N. benthamiana*, dient dazu die Aktivität dieser Derivate ohne Kompetitor zu analysieren. Wie erwartet, zeigten AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} sowie Hax2 keine messbare Aktivität. Lediglich die Expression von AvrBs3 und AvrBs3-ΔAD führte zu einer Aktivierung des Reporterkonstrukts, wobei die Induktion durch AvrBs3-ΔAD deutlich reduziert war (Abbildung 3.1.9 B). Die Koexpression der zu analysierenden AvrBs3-Derivate mit AvrBs3 zeigte, dass ausschließlich AvrBs3-ΔAD die Aktivität von AvrBs3 signifikant verringert und demzufolge mit AvrBs3 um dieselbe DNA-Zielsequenz konkurriert. Die Koexpression von AvrBs3 mit AvrBs3(C30S)_{Rep} und csAvrBs3(C30A)_{Rep} bzw. Hax2, besaß keinen negativen Einfluss auf die AvrBs3-Aktivität. Alle Konstrukte wurden exprimiert (Abbildung 3.1.9 C). Schlussfolgernd binden AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} *in planta* vermutlich nicht spezifisch an DNA. Diese Vermutung könnte den Aktivitätsverlust dieser Derivate erklären.

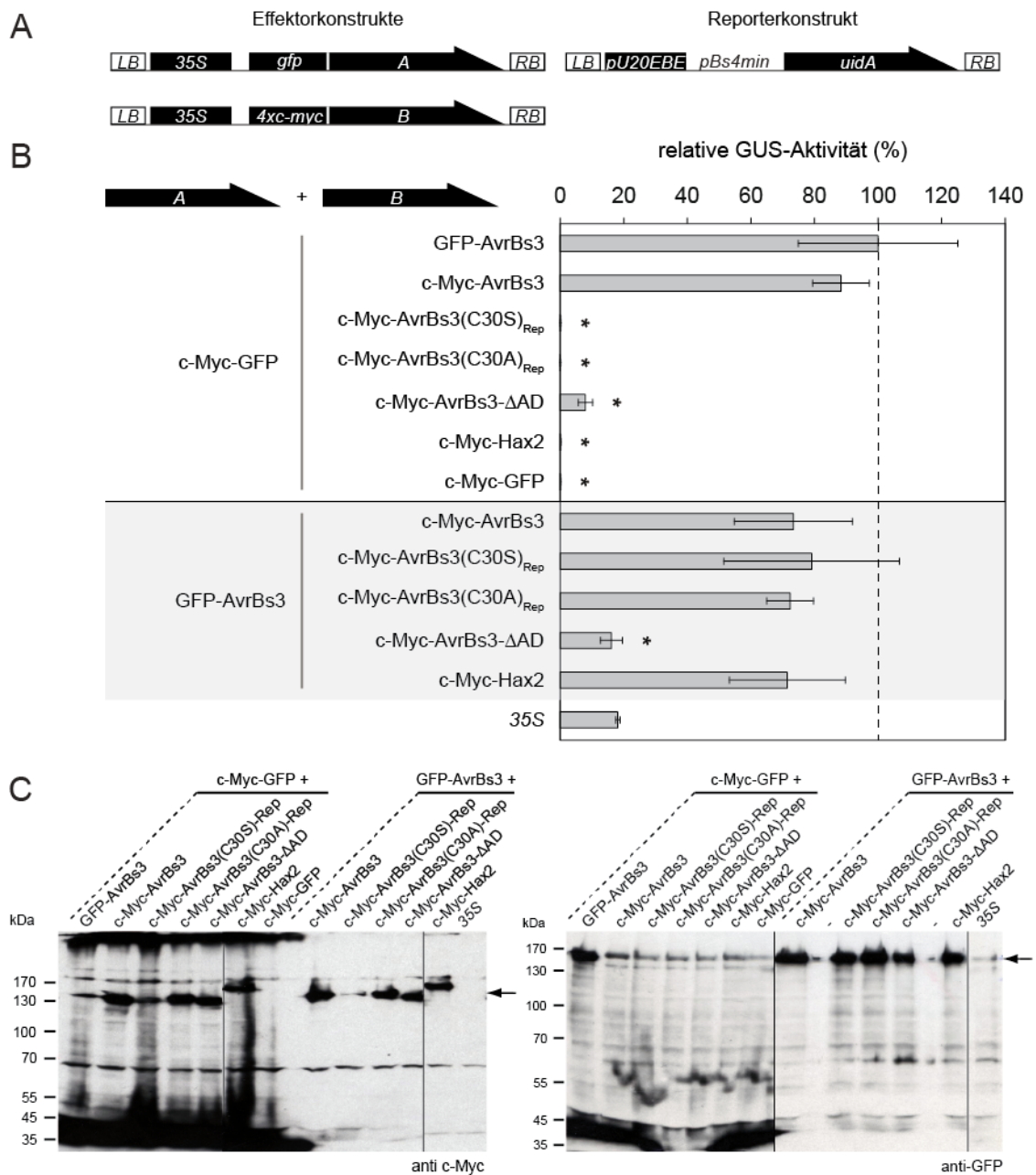


Abbildung 3.1.9: AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} konkurrieren nicht mit AvrBs3 um dessen DNA-Zielsequenz *in planta*

(A) Schematische Darstellung der T-DNAs für *Agrobacterium*-vermittelte Expression und GUS-Reporteranalyse in *N. benthamiana*. Effektorstrukturen führen zur konstitutiven Expression von 4xc-Myc- bzw. GFP-markierten AvrBs3-Derivaten. Das Reporterkonstrukt besitzt die AvrBs3 DNA-Zielsequenz aus dem *UPA20* Promotor (*pU20-EBE* = *effector binding element*) mit zwei *mismatches*. (B) GUS-Aktivitäten der AvrBs3-Derivat-Kombinationen sind relativ zur AvrBs3 WT + GFP-vermittelten GUS-Aktivität (100%). 35S:*uidA* (35S) diente als Positivkontrolle. Die GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation bestimmt. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-value*: * *p*<0,05). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. (C) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der GFP- bzw. 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Derivate *in planta* mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer GFP- sowie c-Myc-Antikörper und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.1.7. AvrBs3 interagiert nicht mit dem *tetratricopeptide domain-containing* Thioredoxin aus *C. annuum* (CaTDX)

Da die Komplexbildung von AvrBs3 die DNA-Bindung negativ beeinflusst (Abbildung 3.1.1) wäre die postulierte Dimerisation von AvrBs3 *in planta* (Gürlebeck *et al.* 2005) wohlmöglich nachteilig für dessen Aktivität. Eine Möglichkeit wäre, dass AvrBs3-Dimere aktiv *in planta* zu Monomeren reduziert werden. Bei einer Hefe-Dihybrid-Sichtung nach Interaktionspartnern der AvrBs3-Homologen PthA1-4, wurde unter anderem ein Thioredoxin (*tetratricopeptide domain-containing thioredoxin* - TDX; GQ853549; aus Orange (*Citrus sinensis*)) als Interaktionspartner von PthA2 und PthA3

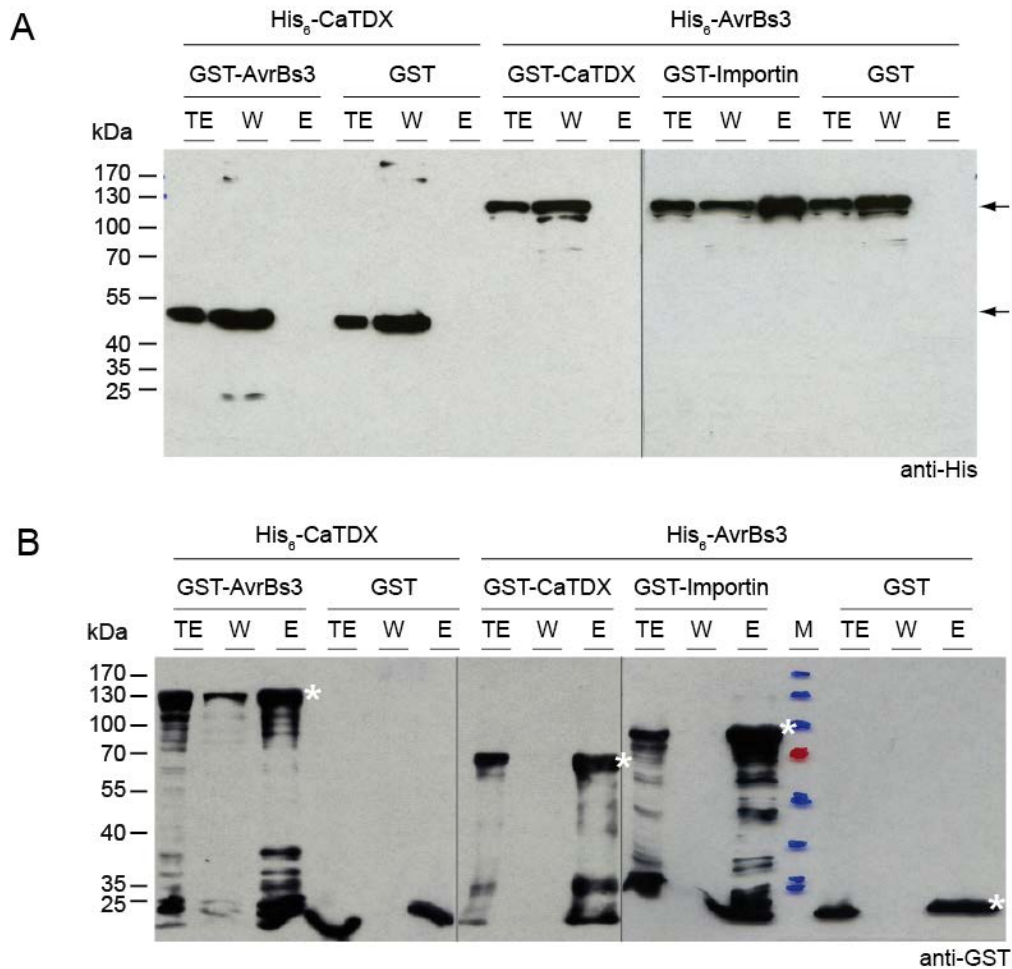


Abbildung 3.1.10: AvrBs3 interagiert nicht mit *tetratricopeptide repeat-containing* Thioredoxin aus *C. annuum* (CaTDX).

GST pull-down mit GST-markierten AvrBs3 und His₆-markierten CaTDX und umgekehrt. Importin α 1 und GST dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Gezeigt sind die Proteinnachweise der His- (Pfeil) bzw. GST-markierten (*) Proteine im Totalextrakt, der Waschfraktion und dem Eluat mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer His- (A) bzw. GST-Antikörper (B) und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem (TE - Totalextrakt, W - Waschfraktion, E - Elutionsfraktion; Pfeile - His-markierte Proteine, weiße Sterne - GST-markierte Proteine). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

identifiziert (Domingues *et al.* 2010). TDX-Homologe gibt es in vielen Pflanzen (*S. lycopersicum*, *C. annuum*, *Oryza sativa japonica*, *Arabidopsis thaliana*) mit variierenden Identitäten auf Aminosäureebene zu TDX aus *Citrus sinensis* von 60 %-73 %. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels GST pull-down untersucht, ob AvrBs3 mit dem TDX-Homolog aus *C. annuum* (CaTDX; 63 % Identität auf Aminosäureebene zu TDX; Aminosäurevergleich siehe 7.3) interagiert (Abbildung 3.1.10). Importin α 1 aus *C. annuum* und GST dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Dabei konnte weder mit Immobilisation von GST-AvrBs3 noch GST-CaTDX, eine direkte Interaktion zwischen AvrBs3 und CaTDX nachgewiesen werden (Abbildung 3.1.10).

3.1.8. AvrBs3 wird nicht als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert

In vorangegangenen Arbeiten wurde postuliert, dass AvrBs3 als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert wird (Gürlebeck *et al.* 2005). Lokalisationsstudien zeigten, dass ein GFP-markiertes AvrBs3 ohne NLS durch unmarkiertes WT AvrBs3 „huckepack“ in den Zellkern transportiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein GUS-Reporteranalyse-basierter AvrBs3-„Kernimportassay“ in *N. benthamiana* durchgeführt. Dafür wurden drei *Agrobacterium*-Stämme (zwei T-DNAs mit Effektorstrukturen und eine T-DNA mit Reporterkonstrukt) gemischt und in Blätter von *N. benthamiana* inokuliert. Hierbei muss ein AvrBs3-Derivat ohne NLS (AvrBs3-NLS-Deletionsderivat; „Fracht“) durch ein anderes nicht funktionales AvrBs3- bzw. TALE-Derivat („Transporter“) in den Kern transportiert werden, um das Reportergen zu induzieren (Abbildung 3.1.11 A). Es wurden *in planta* Expressionskonstrukte verschiedener 4xc-Myc-markierter AvrBs3-Derivate erstellt, welche dieselbe Deletion im C-terminalen Bereich aufwiesen, wie die GFP-markierten AvrBs3-NLS-Deletionsderivate, die in früheren Studien verwendet wurden ((Gürlebeck *et al.* 2005); (AvrBs3- Δ NLS), „Fracht“, Abbildung 3.1.11 A). Neben AvrBs3- Δ NLS wurde auch ein N-terminal verkürztes, AvrBs3-NLS-Deletionsderivat erstellt, bei dem zusätzlich die ersten N-terminalen 152 Aminosäuren deletiert sind (AvrBs3- Δ N152- Δ NLS). Der artifizielle TAL-Effektor (14-2; (Schreiber and Bonas 2014)) wurde als Transporter gewählt, da dieses Konstrukt möglicherweise über seine *repeat*-Region mit den AvrBs3-Derivaten ohne NLS interagieren kann, aber auf Grund seiner verschiedenen DNA-Bindesepezifität das Reportergen nicht induziert. Dieselbe Argumentation trifft zugleich auf AvrBs3- Δ rep16 zu, ein AvrBs3-Derivat mit einer Deletion der *repeats* 11 bis 14 (Römer *et al.* 2007). Da nicht ausgeschlossen werden

kann, dass die RVD-Komposition die Oligomerisierung von TALEs beeinflusst, wurden die NLS-deletierten AvrBs3-Derivate mit AvrBs3- Δ AD koexprimiert. AvrBs3- Δ AD besitzt

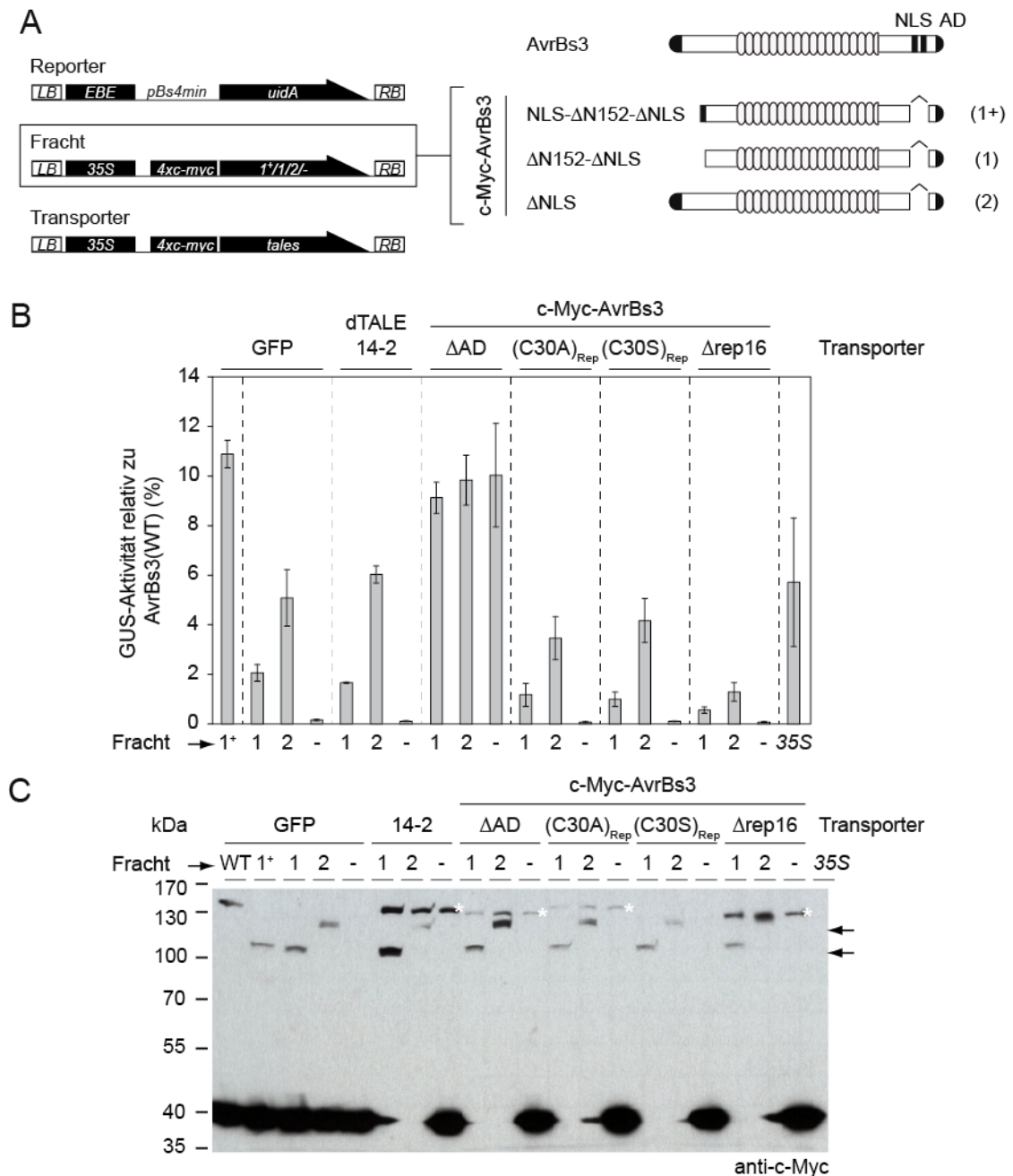


Abbildung 3.1.11: AvrBs3 wird nicht als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Effektor- und Reporterkonstrukte. Effektorstrukture („Fracht“ und „Transporter“) führen zur konstitutiven Expression 4xc-Myc-markierter AvrBs3-Derivate bzw. TALE-Derivate. Das Reporterkonstrukt besitzt die optimale, *mismatch*-freie AvrBs3 DNA-Zielsequenz (EBE). (B) GUS-Reportergerananalyse-basierter Kernimport-Assay mit verschiedenen AvrBs3-Derivaten. GUS-Aktivitäten sind relativ zur AvrBs3(WT)-Aktivität. GFP und 35S:*uidA* (35S) dienen als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation bestimmt. (C) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Derivate *in planta* (Transporter *; Fracht - Pfeil) mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

dieselbe RVD-Komposition wie die AvrBs3-NLS-Deletionsderivate, sollte hingegen auf Grund der fehlenden Aktivierungsdomäne das Reporter-gen ebenfalls nicht induzieren. Die Koexpression der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate mit den Cystein-substituierten AvrBs3-Derivaten (AvrBs3(C30S)_{Rep} bzw. AvrBs3(C30A)_{Rep}) sollte zu keinem Ko-Kernimport führen und genutzt werden, um die Notwendigkeit der Cysteine für eine Oligomerisierung von TALEs *in planta* zu analysieren (Abbildung 3.1.11 B). Als Positivkontrolle wurde NLS-AvrBs3- Δ N152- Δ NLS verwendet, ein AvrBs3-NLS-Deletionsderivat mit N-terminal fusionierter funktionaler SV40 NLS-Sequenz. Die SV40 NLS stammt aus dem „SV40 *large T*-Antigen“-Protein des SV40 Virus (Kalderon *et al.* 1984). Bei einem Kernimport von AvrBs3- Δ N152- Δ NLS müsste sich dessen Aktivität dem Aktivitätsniveau von NLS-AvrBs3- Δ N152- Δ NLS angleichen. Zunächst wurden die Positivkontrolle und beide AvrBs3-NLS-Deletionsderivate zusammen mit GFP *Agrobacterium*-vermittelt exprimiert, um die Aktivität dieser Konstrukte zu ermitteln (Abbildung 3.1.11 B). Die Koexpression der AvrBs3-Derivate ohne NLS mit GFP resultierte bereits in einer geringen Induktion des Reporter-gens (Aktivität der Derivate relativ zu AvrBs3(WT): AvrBs3- Δ N152- Δ NLS (2 %); AvrBs3- Δ NLS (5 %)). Es zeigte sich, dass die Fusion der SV40 NLS an AvrBs3- Δ N152- Δ NLS einem signifikanten Anstieg der Aktivität bewirkt (Vergleich NLS-AvrBs3- Δ N152- Δ NLS und AvrBs3- Δ N152- Δ NLS; Abbildung 3.1.11 B). Die messbare Aktivität mit ca. 11% der AvrBs3(WT)-Aktivität war relativ gering. Die Deletion der N-terminalen 152 Aminosäuren führte zu einer reduzierten Aktivität (Vergleich AvrBs3- Δ N152- Δ NLS und AvrBs3- Δ NLS). Bei der Koexpression des artifiziellen TALEs 14-2, sowie der beiden Cysteine-substituierten AvrBs3-Derivate (AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep}) wurde kein Anstieg der Aktivität der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate gemessen. Die Koexpression von AvrBs3- Δ rep16 führte zu einer geringfügigen Reduktion der Aktivität der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate. Die Koexpression der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate und AvrBs3- Δ AD erbrachte kein auswertbares Resultat, weil dessen Aktivität die Aktivität der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate überdeckte (Abbildung 3.1.11 B). Die generierten Daten deuten darauf hin, dass AvrBs3 *in planta* nicht als Heterodimer bzw. Heterooligomer in den Zellkern transportiert wird. Bis auf AvrBs3(C30S)_{Rep} wurde die Synthese aller Proteine mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.1.11 C).

3.1.9. Notwendigkeit der N-terminalen und C-terminalen Regionen für die *in planta* AvrBs3-Aktivität

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die *repeat*-Region von AvrBs3 nur eine schwache DNA-Bindung aufweist (Kay *et al.* 2007). TALEs weisen neben der *repeat*-Region relativ große sowie hoch konservierte N-terminale und C-terminale

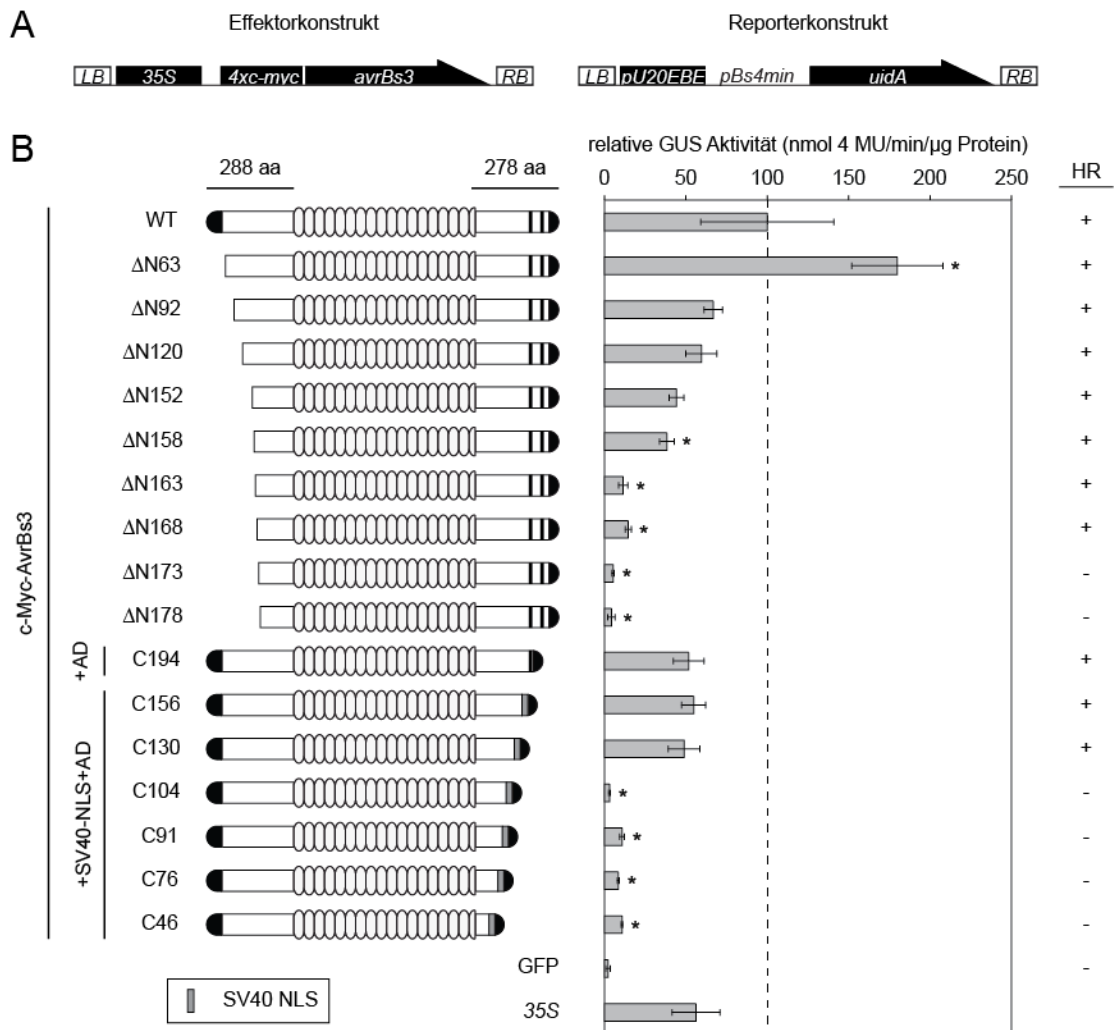


Abbildung 3.1.12: Aktivität von AvrBs3-Deletionsderivaten

(A) Schematische Darstellung der T-DNAs für *Agrobacterium*-vermittelte Expression und GUS-Reporteranalyse in *N. benthamiana*. Effektorkonstrukte führen zur konstitutiven Expression von 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Deletionsderivaten. Das Reporterkonstrukt besitzt die natürliche AvrBs3 DNA-Zielsequenz aus dem *UPA20* Promotor (*pU20-EBE* = *effector binding element, 2 mismatches*). AvrBs3(WT) und GFP dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. (B) GUS-Aktivitäten der AvrBs3-Deletionsderivate relativ zur AvrBs3(WT)-vermittelten GUS-Aktivität (100%). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation bestimmt. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p*-value: * *p*<0,05). GUS-Reporteranalyse wurde mit P19 durchgeführt. HR-Induktion der AvrBs3-Deletionsderivate in *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Bereiche auf. Um zu analysieren, welche Proteinbereiche für die Aktivität von AvrBs3 nötig sind, wurden Konstrukte für die Expression von AvrBs3-Deletionsderivaten *in planta* erstellt, bei denen die NTR und CTR systematisch verkürzt wurden (siehe 7.6.2 und 7.6.3). In der CTR sind die essentiellen Kernlokalisierungssignale (NLS) und eine Aktivierungsdomäne (AD) enthalten. Für den Erhalt der AvrBs3-Aktivität, wurden bei C-terminalen Deletionen die AvrBs3-AD und die SV40 NLS C-terminal fusioniert (Abbildung 3.1.12). Die Aktivität der AvrBs3-Deletionsderivate wurden mittels GUS-Reporterstudie untersucht (Abbildung 3.1.12 B). Dabei zeigte sich, dass lediglich 63 AS der NTR von AvrBs3 deletiert werden können ohne dessen Aktivität zu beeinflussen. Die Deletion zusätzlicher AS der NTR führte kontinuierlich zum weiteren Aktivitätsverlust. Interessanterweise bewirkte die Deletion der N-terminalen 152 AS eine Reduktion der Aktivität um 50 % - 80 % (AvrBs3- Δ N152). Für AvrBs3- Δ N152 (bezeichnet als 356; (Szurek *et al.* 2002)) wurde eine „WT-Aktivität“ beschrieben, denn die *Agrobacterium*-vermittelte Expression von AvrBs3- Δ N152 in *C. annuum* ECW-30R löst eine HR aus ((Szurek *et al.* 2002); Abbildung 3.1.12 B; Abbildung 7.2.1). Wie die Abbildung 3.1.12 zeigte, führte die Deletion von 173 und 178 Aminosäuren der NTR nahezu zum Aktivitätsverlust von AvrBs3, was auch mit dem Verlust der HR-Induktion in *Bs3*-transgenen *N. benthamiana* einhergeht (Abbildung 3.1.12 B; Abbildung 7.2.1). Deletionen in der CTR von AvrBs3 führten in jedem Fall zum Aktivitätsverlust, wobei mindestens 130 Aminosäuren der CTR für die Aktivität von AvrBs3 (GUS-Induktion bzw. HR) erforderlich waren (Abbildung 3.1.12 B). Im Gegensatz zu N-terminalen AvrBs3-Deletionsderivaten wurde die Synthese C-terminaler AvrBs3-Deletionsderivate,

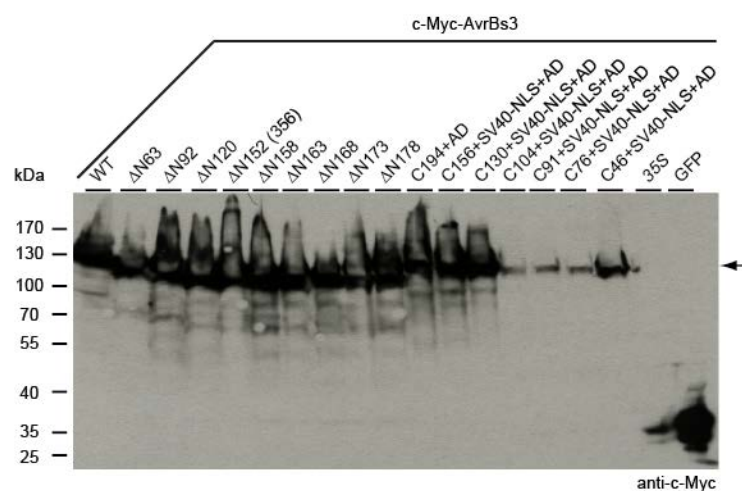


Abbildung 3.1.13: C-terminale Deletionen von AvrBs3 beeinflussen die Proteinstabilität.

Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Deletionsderivate *in planta* mit hohen Proteinmengen mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

dessen CTR kürzer als 130 Aminosäuren ist, ausschließlich bei Verwendung großer Proteinmengen detektiert (Abbildung 3.1.13). Dies bedeutet, dass nahezu die komplette Aminosäuresequenz von AvrBs3 für volle Aktivität notwendig ist.

3.1.10. Einfluss der NTR und CTR von AvrBs3 auf die DNA-Bindung

Um zu analysieren, inwiefern die DNA-Bindung von AvrBs3 durch Deletionen der NTR und CTR beeinflusst wird, wurden ausgewählte AvrBs3-Deletionsderivate mittels EMSA untersucht (AvrBs3(WT), AvrBs3- Δ N152, AvrBs3- Δ N178, AvrBs3-C46-SV40-NLS-AD (AvrBs3-C46) sowie eine Kombination aus N-terminaler und C-terminaler Verkürzung (AvrBs3- Δ N152-C15; Abbildung 3.1.14). Als Ziel-DNA wurde wiederum das biotinylierte 36 Bp *UPA20*-Promotorfragment verwendet (Abbildung 3.1.1 B). Die Deletion der N-terminalen 152 Aminosäuren reduzierte die DNA-Bindeaffinität von AvrBs3 deutlich. Im Gegensatz zu AvrBs3(WT), wurde für AvrBs3- Δ N152 ausschließlich ein DNA-Protein-Komplex bei einem molarem Verhältnis 8:1 (Protein:DNA) detektiert (Abbildung 3.1.14). Daraus resultiert, dass die Deletion der N-terminalen 152 Aminosäuren eine ungefähre Reduktion der DNA-Bindeaffinität um den Faktor 4 verursacht. Vergleichbare Resultate wurden auch bei der Analyse dieser Konstrukte mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) und Fluoreszenzpolarisations-Messungen (FLP) beobachtet (ITC und FLP durchgeführt von F. List und U. Bonas unveröffentlicht; (Schreiber *et al.* 2015)). Die Deletion von Aminosäuren der CTR von AvrBs3 wirkte sich hingegen lediglich gering auf die DNA-Bindeaffinität aus und scheint daher eine untergeordnete Rolle für die DNA-Bindung zu spielen (Vergleiche AvrBs3(WT) und AvrBs3-C46 bei 66 fmol Protein; Abbildung 3.1.14 A). Die Kombination von N-terminaler und C-terminaler Deletion (AvrBs3- Δ N152-C15) führte zu einer geringfügigen Änderung der DNA-Bindeaffinität im Vergleich zum N-terminal-verkürzten Derivat (AvrBs3- Δ N152, Vergleich bei 133 fmol Protein; Abbildung 3.1.14 B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NTR von AvrBs3 essentiell für dessen volle DNA-Bindeaffinität ist.

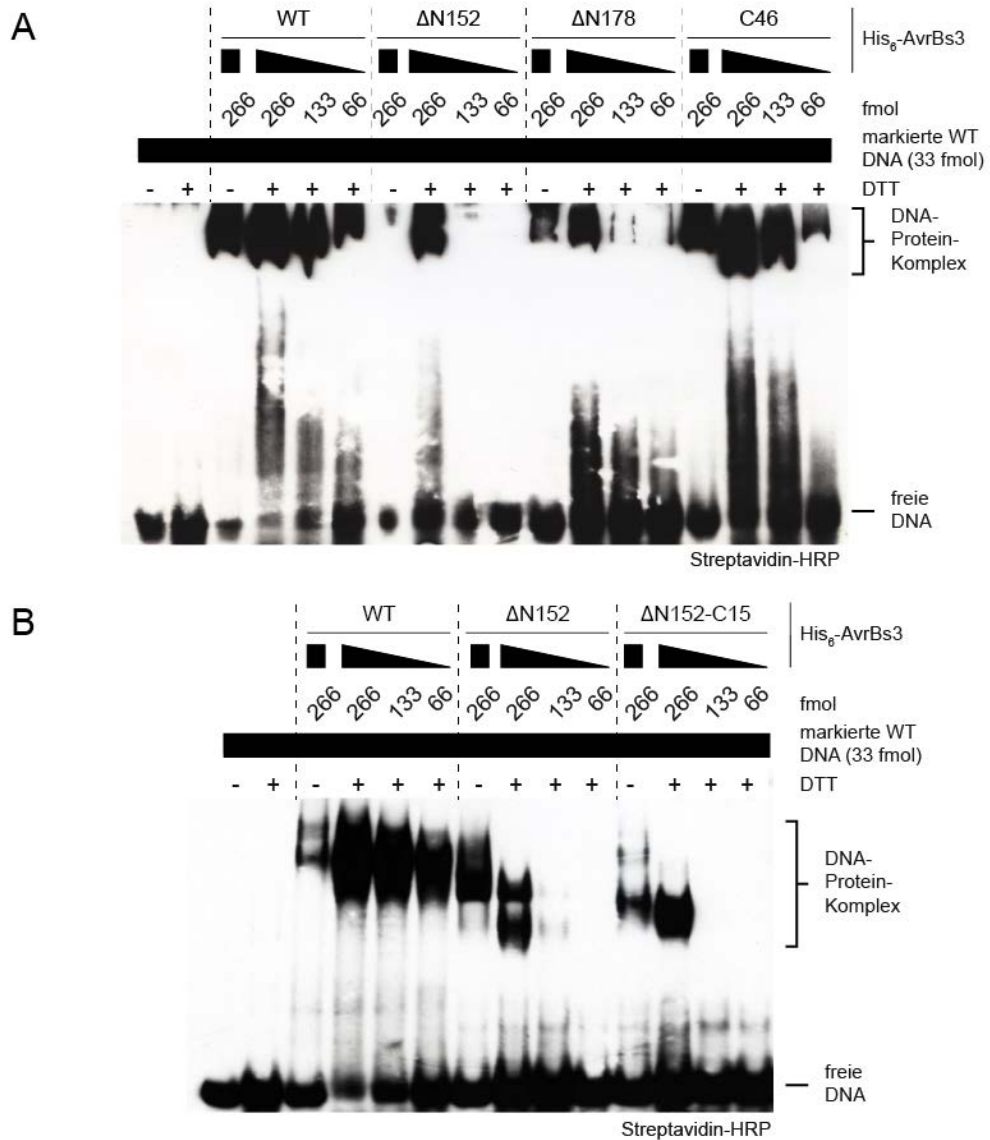


Abbildung 3.1.14: Die NTR ist essentiell für die volle DNA-Bindeaffinität von AvrBs3.

(A und B) Biotinylierte DNA wurde mit unbehandeltem oder reduziertem (+, Inkubation mit 10 mM DTT über Nacht bei 8 °C) His₆-markiertem AvrBs3-Deletionsderivaten für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden mittels 5 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die biotinylierten DNA-Fragmente bzw. DNA-Protein-Komplexe mittels Western Blot unter Verwendung einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP; *horseradish peroxidase*) und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem detektiert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.2. Analyse der AvrBs3 DNA-Bindenspezifität für Thymin an Position 0

Wie in Abbildung 3.1.14 gezeigt, scheint der N-terminale Bereich von AvrBs3 wichtig für die DNA-Bindung zu sein. Diese Beobachtung stimmt mit nunmehr publizierten Daten überein, die zur Annahme führten, dass die NTR als Zugangspunkt für die DNA-Bindung von TAL-Effektoren dient und diese über die *repeat*-Region von 5' nach 3' erfolgt (Gao *et al.* 2012; Mali *et al.* 2013; Meckler *et al.* 2013). Die Position T₀ der DNA-Zielsequenz scheint essentiell für die AvrBs3-vermittelte Geninduktion zu sein (Römer *et al.* 2009). In diesem Abschnitt sollte der Mechanismus der T₀-Koordinierung analysiert werden. Weiterhin sollten Bedingungen identifiziert werden unter den TAL-Effektoren auch unabhängig von T₀ funktionieren.

3.2.1. RVD-Base-Fehlpaarungen in der AvrBs3 DNA-Zielsequenz erhöhen die T₀-Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität

Eine quantitative Analyse des Einflusses von T₀-Mutationen auf die AvrBs3-vermittelte Geninduktion *in planta* wurde bisher nicht durchgeführt. Zusätzlich beinhalten alle natürlichen AvrBs3 DNA-Zielsequenzen aus *C. annuum* (UPA-Box) tolerierte RVD-Base-Fehlpaarungen und unterscheiden sich von der RVD-definierten (*mismatch*-freien) DNA-Zielsequenz. Um die T₀-Spezifität von AvrBs3 und dessen Beeinflussung durch RVD-Base-Fehlpaarungen quantitativ zu analysieren, wurden GUS-Reporteranalysen mit zwei Klassen von Reporterkonstrukten durchgeführt. Beide Klassen bestehen aus dem Reporter (β-Glucuronidase, *uidA*, GUS) unter Kontrolle von *pBs4min* mit 5'-fusionierter AvrBs3 DNA-Zielsequenz. Die Reporter enthalten entweder die AvrBs3 DNA-Zielsequenz des UPA20-Promotors (*pUPA20-EBE_{AvrBs3}*, *mismatch* an Position 1 und 17) oder die RVD-definierte DNA-Zielsequenz (*EBE_{AvrBs3}*) und unterscheiden sich im Nukleotid an Position Null (N₀; Abbildung 3.2.1 A; siehe 7.7). Die GUS-Reporteranalyse zeigte, dass die AvrBs3-Aktivität von N₀ mit der Hierarchie T₀>C₀>A₀>G₀ abhängt. Zudem führen RVD-Base-Fehlpaarungen zu einer leicht verringerten Aktivität und einer verstärkten T₀-Abhängigkeit von AvrBs3 (Abbildung 3.2.1 B). Die verwendeten Effektorstrukturen (kodierend für AvrBs3- bzw. TALE-Derivate und GFP) in diesem und allen folgenden GUS-Reporteranalysen besitzen stets ein 5'-fusioniertes 4xc-Myc-Epitop. Die Synthese aller 4xc-Myc-

markierten Proteine wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.1 C). Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, wurde für alle weiteren Analysen die Reporterkonstrukte mit der RVD-definierten (*mismatch*-freien) AvrBs3 DNA-Zielsequenz verwendet (EBE_{AvrBs3} ; N_0).

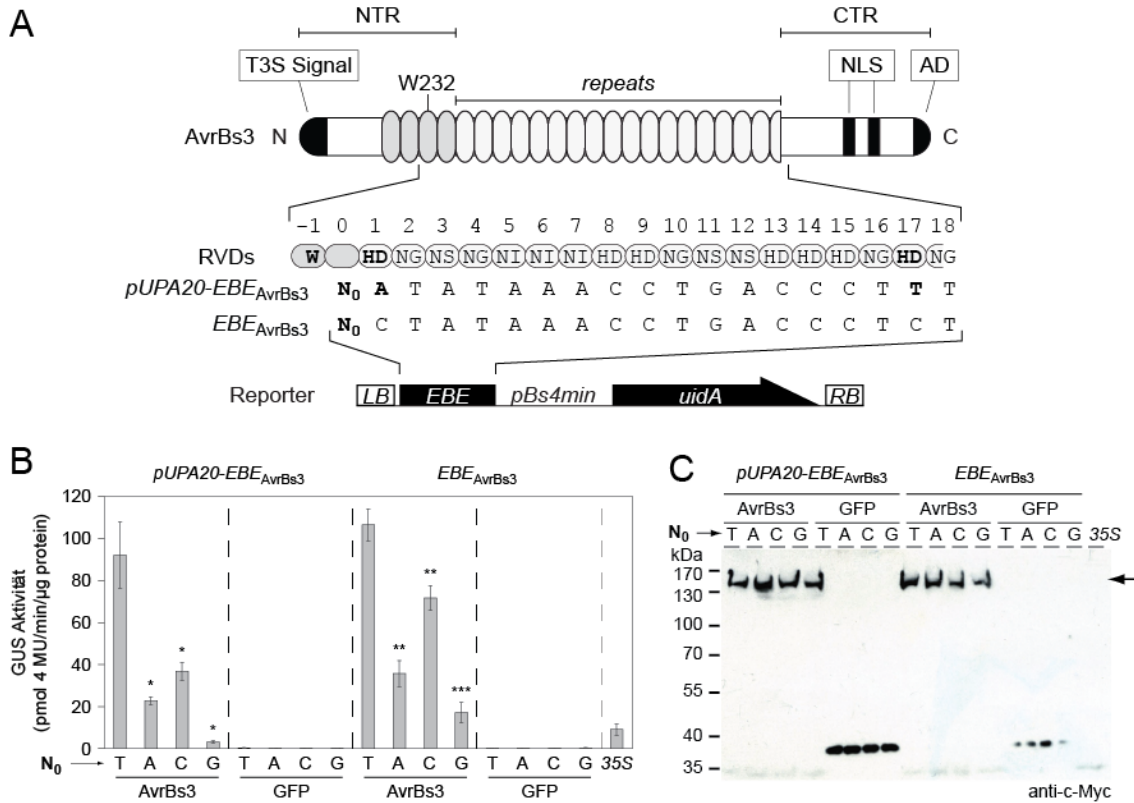
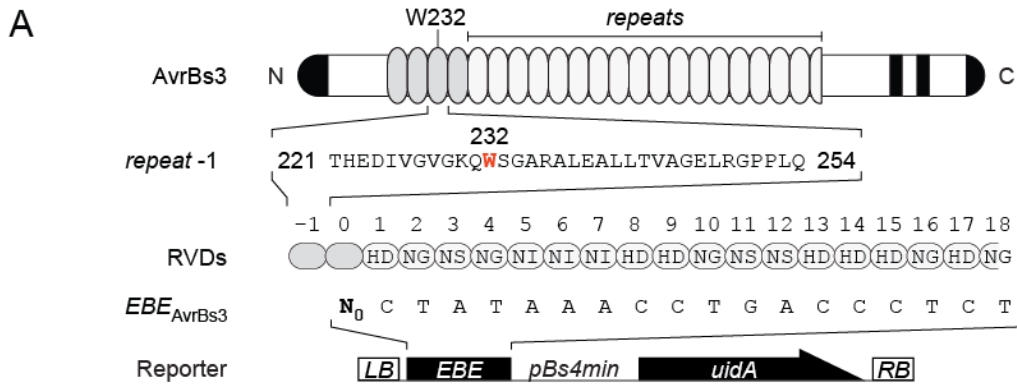


Abbildung 3.2.1: RVD-Base-Fehlpaarungen in der DNA-Zielsequenz verstärken die T_0 -Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität.

(A) Schematische Darstellung von AvrBs3 und den verwendeten Reporterkonstrukten. NTR - N-terminale Region; CTR - C-terminale Region; T3S-Signal - Typ-III-Sekretionssignal; NLS - *nuclear localization signals*; AD - *activation domain*; RVD - *repeat variable diresidue*; EBE - *effector binding element* (codierender Strang). *repeats* sind als Ovale dargestellt (weiß - *repeats*; grau - *degenerierte repeats*). Die Reporterkonstrukte besitzen entweder die natürliche ($pUPA20-EBE_{AvrBs3}$) oder die RVD-definierte (EBE_{AvrBs3}) AvrBs3 DNA-Zielsequenz. **(B)** GUS-Aktivitäten von AvrBs3 in Kombination mit den verschiedenen Reporterkonstrukten. GFP und 35S:*uidA* (35S) diente als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-values*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. **(C)** Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis von 4x-c-Myc-markiertem AvrBs3 *in planta* mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.2.2. W232 und T₀ sind essentiell für die vollständige AvrBs3-Aktivität

Strukturelle Analysen von TAL-Effektoren haben gezeigt, dass sich neben den gewöhnlichen *repeats* auch vier zusätzliche, degenerierte *repeats* (*repeat* -3 bis 0; Abbildung 1.2.6; Abbildung 3.2.2 A) in der NTR befinden (Gao *et al.* 2012). Die zu T₀ räumlich nächste Aminosäure ist ein Tryptophan im RVD-*loop* des degenerierten *repeat* -1 (W232), welches vermutlich für die Koordinierung von T₀ verantwortlich ist (Mak *et al.* 2012). Bei der spezifischen Interaktion zwischen einem TALE-*repeat* und der korrespondierenden Base, wird die Spezifität nur von einem Aminosäurerest (Position 13, *base-specific residue* - BSR) definiert. Trifft dies im gleichem Maße für die Koordinierung von T₀ zu, könnte durch die Substitution von W232 die Spezifität des degenerierten *repeat* -1 bzw. der NTR von T₀ zu einer anderen Base verändert werden. Um die Notwendigkeit von W232 zu untersuchen und um TALE-NTRs mit einer veränderten Spezifität für Position Null zu generieren, wurden AvrBs3 W232-Substitutionsderivate erstellt und deren Aktivität in Abhängigkeit von N₀ mittels GUS-Reporteranalyse untersucht (Abbildung 3.2.2 A). Wie in Abbildung 3.2.2 sichtbar, führte die Substitution von W232 in jedem Fall zu einer verringerten AvrBs3-Aktivität *in planta*. Der Aminosäureaustausch von W232 zu strukturell ähnlichen, aromatischen Aminosäuren (Thyrosin, Phenylalanin) besaß den geringsten Effekt auf die AvrBs3-Aktivität (66 % bzw. 55 % der AvrBs3(WT)-Aktivität). Alle anderen AvrBs3-Derivate mit W232-Substitutionen wiesen eine deutlich verringerte Aktivität im Vergleich zu AvrBs3(WT) auf. Eine Veränderung der T₀-Spezifität durch den Aminosäureaustausch von W232 wurde nicht erreicht. Lediglich AvrBs3(W232R) zeigte, verglichen mit AvrBs3(WT) eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Aktivität in Kombination mit dem Reporterkonstrukt $EBE_{AvrBs3}(G_0)$ (Abbildung 3.2.2 B). Die Proteinsynthese aller 4xc-Myc-markierten AvrBs3-W232-Substitutionsderivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.3).



B

relative GUS Aktivität (%)

AvrBs3	T ₀	A ₀	C ₀	G ₀
WT	100	43.4 ± 13.5	71.9 ± 21.3	21.1 ± 12.7
W232Y	65.8 ± 10.4	24.8 ± 4.5	34.9 ± 5.0	13.3 ± 8.1
W232F	54.7 ± 12.5	20.8 ± 0.3	37.9 ± 23.7	12.8 ± 11.3
W232H	35.4 ± 0.5	27.0 ± 1.8	22.6 ± 7.4	13.4 ± 4.5
W232A	35.3 ± 20.8	20.1 ± 9.9	27.1 ± 3.7	12.1 ± 3.7
W232L	25.4 ± 0.9	17.5 ± 5.2	25.5 ± 15.5	18.3 ± 16.0
W232G	24.7 ± 5.7	24.3 ± 12.8	24.0 ± 8.8	16.9 ± 11.3
W232R	24.5 ± 20.8	27.7 ± 17.2	21.7 ± 9.9	25.2 ± 18.0
W232V	23.8 ± 1.8	14.5 ± 4.2	19.8 ± 0.3	10.8 ± 2.3
W232N	22.6 ± 4.7	14.2 ± 1.1	20.2 ± 6.8	9.2 ± 2.2
W232I	20.9 ± 3.3	12.2 ± 2.6	14.3 ± 4.1	5.3 ± 0.1
W232P	20.7 ± 1.0	19.5 ± 3.5	21.8 ± 7.0	11.6 ± 6.6
W232Q	20.7 ± 7.9	24.9 ± 3.8	26.0 ± 0.2	13.3 ± 8.1
W232K	17.5 ± 10.3	17.9 ± 14.8	13.7 ± 3.0	16.8 ± 11.7
W232S	16.7 ± 6.6	12.2 ± 5.6	18.9 ± 8.5	8.6 ± 4.1
W232C	16.2 ± 1.2	12.2 ± 4.0	17.7 ± 3.6	11.1 ± 8.4
W232D	12.5 ± 3.9	7.2 ± 0.4	18.3 ± 11.2	11.4 ± 6.7
W232E	11.6 ± 3.8	5.4 ± 1.6	16.2 ± 3.8	7.6 ± 2.0
Skalierung	≤100%	≤75%	≤50%	≤25%

Abbildung 3.2.2: W232 und T₀ sind essentiell für die vollständige AvrBs3-Aktivität.

(A) Schematische Darstellung von AvrBs3 und den verwendeten Reporterkonstrukten. Die Aminosäuresequenz von *repeat -1* ist angegeben und W232 rot hervorgehoben. (B) Relative GUS-Aktivitäten (%) induziert durch AvrBs3(WT) und W232-Substitutionsderivaten. Die GUS-Aktivität wurde zwei-drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. GUS-Aktivitäten sind relativ zur GUS-Aktivität von AvrBs3(WT) in Kombination mit T₀-Reporterkonstrukt (100%). Die Standardabweichung resultiert aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten. Die Farbskala dient zur Visualisierung der GUS-Aktivitäten einzelner AvrBs3-Derivat-Reporter-Kombinationen. Die GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. Das Experiment wurde zwei- bis dreimal durchgeführt.

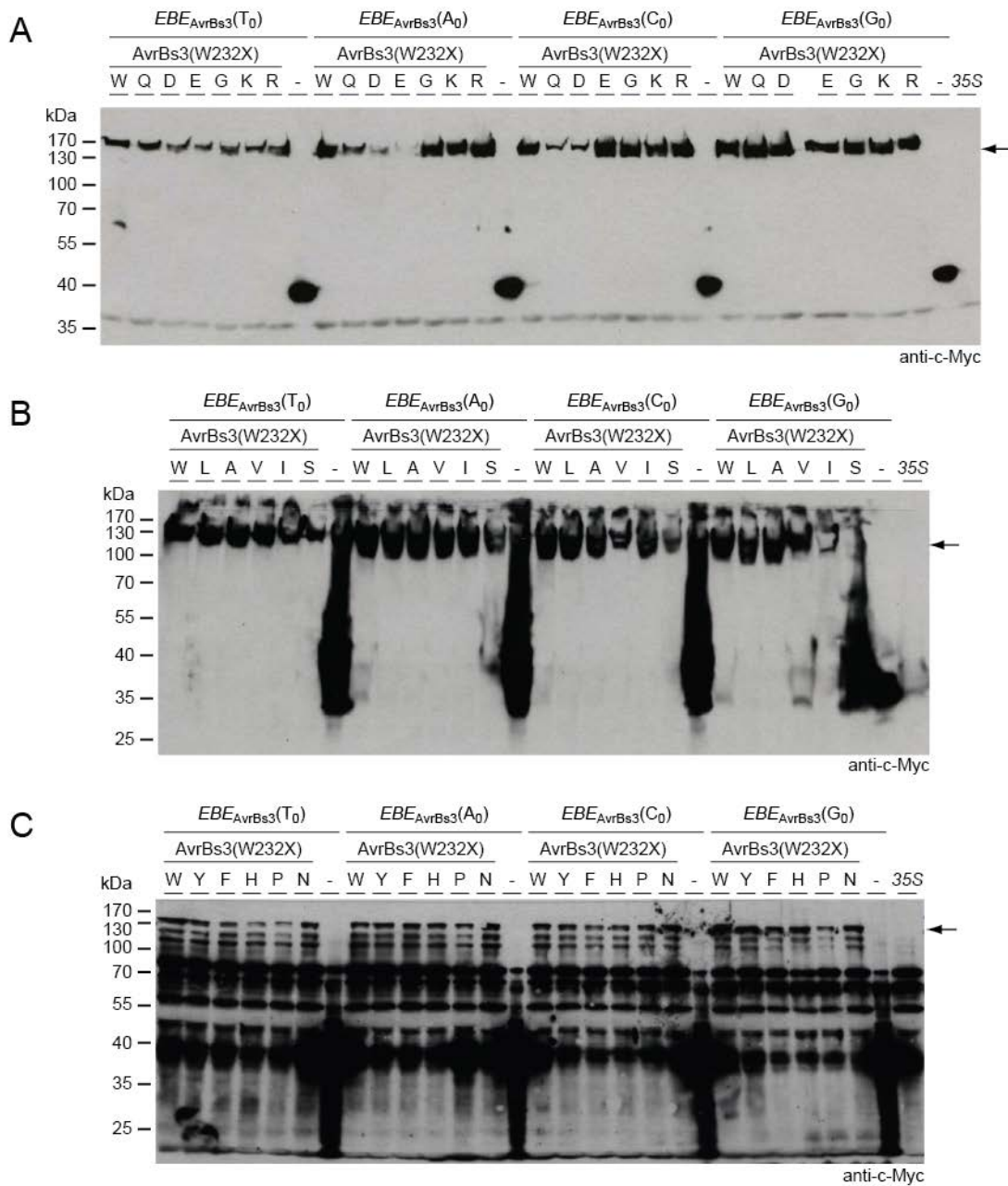


Abbildung 3.2.3: Proteinsynthesenachweis der W232-Substitutionsderivate von AvrBs3.

(A, B und C) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis von 4xc-Myc-markierten AvrBs3, AvrBs3-W232-Substitutionsderivaten und GFP (-) mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Der Western Blot ist zugehörig zu der GUS-Reporteranalyse aus Abbildung 3-2-2. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde zwei- bis dreimal durchgeführt.

3.2.3. Arginin an Position 266 der AvrBs3-NTR koordiniert nicht T₀ in der DNA-Zielsequenz

Durch die Substitution von W232 konnte die Spezifität von AvrBs3 für T₀ nicht verändert werden. In der kürzlich veröffentlichten Röntgen-Kristall-Strukturanalyse des AvrBs3-DNA-Komplexes wurde T₀ nicht durch W232, sondern durch ein Arginin in *repeat* 0 (R266) Koordiniert ((Stella *et al.* 2013); Abbildung 1.2.6 D). In diesem Komplex koordinierte zudem ein weiteres Arginin in *repeat* -1 (R236) das Nukleotid an Position -1 (T₋₁) mit einer stabilisierenden Wirkung auf die R266-T₀-Interaktion (Stella *et al.* 2013). Um den Einfluss von R236 und R266 auf die T₀-abhängige AvrBs3-

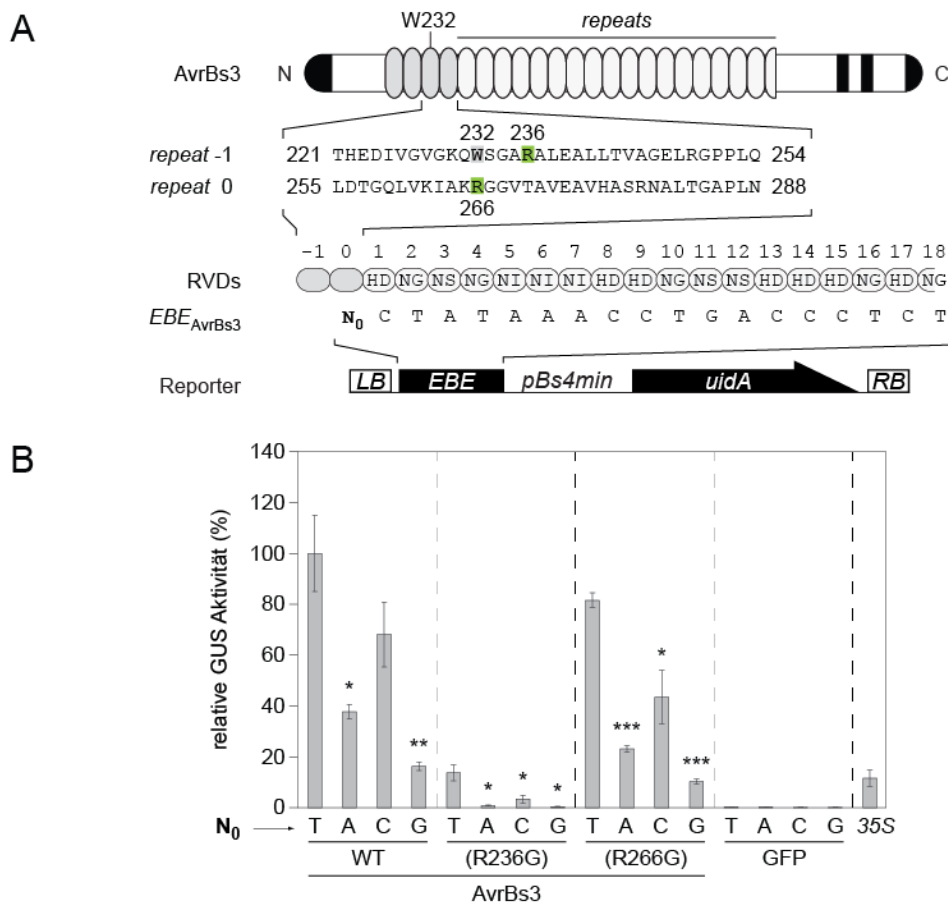


Abbildung 3.2.4: Effekt von R236- und R266-Substitutionen auf die AvrBs3-Aktivität.

(A) Schematische Darstellung von AvrBs3 und den verwendeten Reporterkonstrukten. Die Aminosäuresequenz von *repeat* -1 und *repeat* 0 ist angegeben. Die veränderten Aminosäuren (R236 und R266) sind grün hervorgehoben. **(B)** Relative GUS-Aktivitäten der AvrBs3-Substitutionsderivate in Kombination mit verschiedenen Reporterkonstrukten. GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. GUS-Aktivitäten sind relativ zur GUS-Aktivität von AvrBs3(WT) in Kombination mit T₀-Reporterkonstrukt (100%). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p*-values: * *p*<0,05; ** *p*<0,01; *** *p*<0,001). GUS-Reportergenanalyse wurde ohne P19 durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

vermittelte Geninduktion zu analysieren, wurden zunächst Substitutionsderivate erstellt, bei denen das jeweilige Arginin zu Glycin ausgetauscht wurde (AvrBs3(R236G); AvrBs3(R266G); Abbildung 3.2.4 A). Im Folgenden wurde die Aktivität der erstellten AvrBs3-Derivate in Abhängigkeit von N_0 mittels GUS-Reporteranalyse untersucht (Abbildung 3.2.4 B). Die Substitution R266G führte zu einer geringfügigen Reduktion der AvrBs3-Aktivität, die Spezifität für T_0 blieb jedoch unverändert (Abbildung 3.2.4 B). Dies deutet darauf hin, dass die prognostizierte T_0 -Koordinierung durch R266 unwahrscheinlich ist. Hingegen zeigte das AvrBs3-Derivat AvrBs3(R236G) eine reproduzierbare schwache Aktivität ausschließlich in Kombination mit dem T_0 -Reporter ($EBE_{AvrBs3}(T_0)$). Allerdings konnte die Proteinsynthese von AvrBs3(R236G) nicht nachgewiesen werden. Dass R236 einen Beitrag zur Funktion von AvrBs3 leistet, lässt sich aus diesem Grund zunächst nicht ausschließen.

3.2.4. Die NTR von TalC ist nicht kompatibel mit der AvrBs3 repeat-Region

TalC, ein funktionales AvrBs3-Homolog und zugleich ein Virulenzfaktor aus dem afrikanischen Xoo-Stamm BAI3, ist der einzige bekannte TAL-Effektor bei dem W232 nicht konserviert ist. TalC besitzt ein Cystein anstelle eines Tryptophan im RVD-*loop* des degenerierten *repeat* -1 (Yu *et al.* 2011). Die W232C-Substitution im Hintergrund von AvrBs3 führte zu einer Reduktion der Aktivität auf 16 % verglichen mit der AvrBs3(WT)-Aktivität (Abbildung 3.2.2 B). Ein Aminosäurevergleich der NTR von AvrBs3 und TalC zeigt, dass neben der W232C-Substitution auch weitere Aminosäureaustausche und eine Deletion von 22 Aminosäuren in TalC vorliegen (siehe 7.4). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die TalC-DNA-Zielsequenz im Promotor von *OsSWEET14* aus Reis ein Cytosin anstatt eines Thymin an Position 0 aufweist (Yu *et al.* 2011). Um zu analysieren, ob die NTR von TalC eine C_0 -Spezifität besitzt, wurden Chimäre aus AvrBs3 und TalC erstellt, bei denen verschiedene Bereiche der AvrBs3-NTR durch die korrespondierenden Bereiche der TalC-NTR ersetzt wurden (Abbildung 3.2.5 A). Die Aktivität der AvrBs3-TalC-Chimären wurde mittels GUS-Reporteranalyse untersucht. Der Austausch der kompletten NTR (AvrBs3-NTR(TalC)) führte zu einem stärkeren Aktivitätsverlust von AvrBs3 als die W232C-Substitution (AvrBs3(W232C)). Die Analyse der AvrBs3-TalC-Chimäre (AvrBs3-N1-5(TalC)) ergab, dass ein Tryptophan in *repeat* -1 essentiell für die Aktivität der untersuchten AvrBs3-TalC-Chimäre ist. Zudem zeigte sich, dass die Aminosäureunterschiede von TalC *upstream* und *downstream* von W232 einen

negativen Einfluss auf die AvrBs3-Aktivität haben (AvrBs3-N2(TalC) und AvrBs3-N5(TalC); Abbildung 3.2.5 A). Die Proteinsynthese aller 4xc-Myc-markierten AvrBs3-TalC-Chimäre wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.5 B).

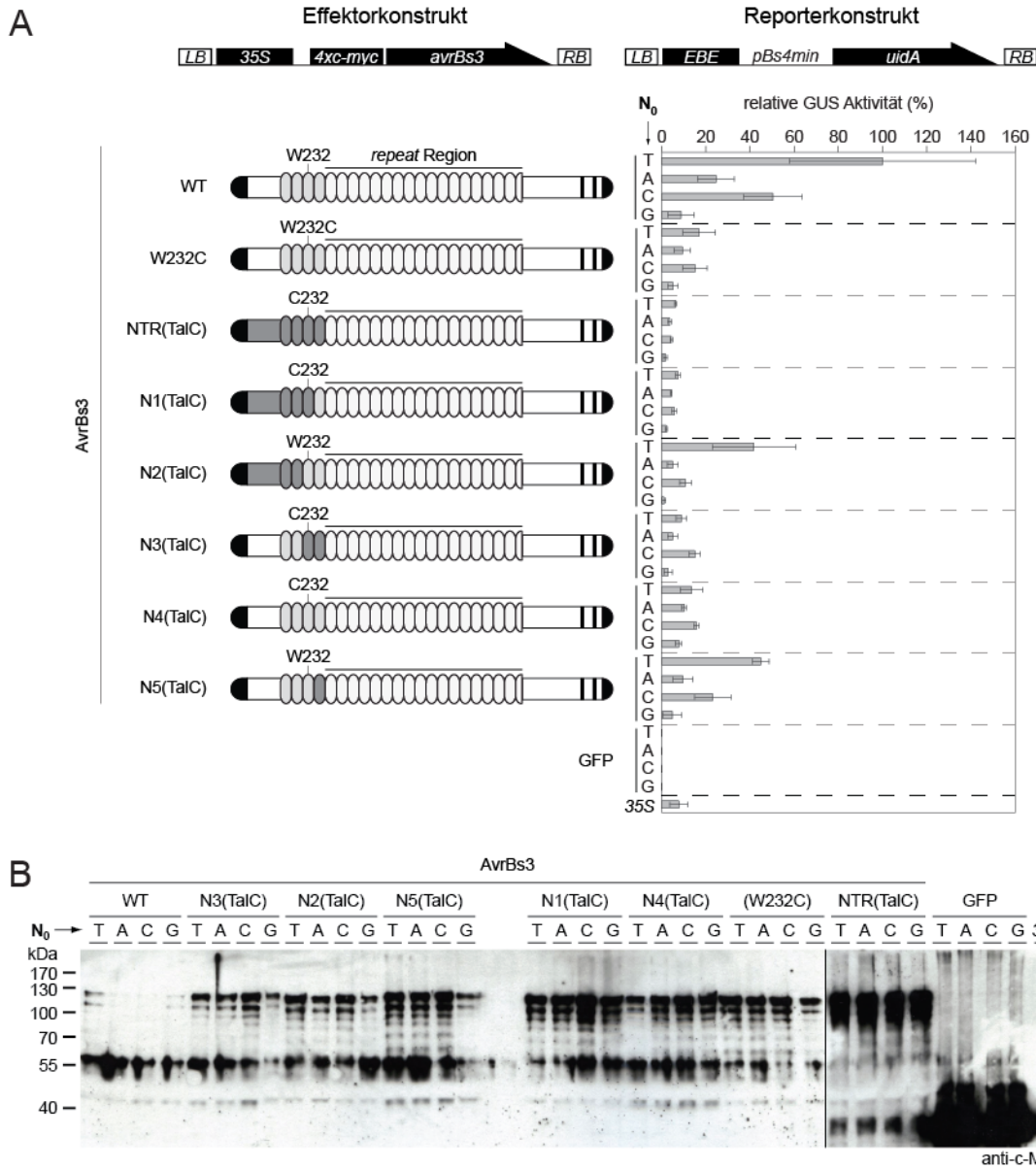


Abbildung 3.2.5: Die NTR von TalC ist inkompatibel mit der AvrBs3 repeat-Region.

(A) Relative GUS-Aktivitäten der AvrBs3-TalC-Chimere. Schematische Darstellung von verwendeten AvrBs3-TalC-Chimären mit korrespondierender relativer GUS-Aktivität. GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert und sind relativ zur GUS-Aktivität von AvrBs3(WT) in Kombination mit T₀-Reporterkonstrukt (100 %). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. **(B)** Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Derivate und GFP (-) mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.2.5. Die NTR und die *repeat*-Region von TAL-Effektoren kooperieren miteinander

Da die Verwendung der vollständigen TalC-NTR zum Aktivitätsverlust von AvrBs3 führt, stellt sich die Frage warum diese im TalC-Hintergrund funktional ist. Eine Hypothese ist, dass die NTR mit der *repeat*-Region kooperiert und die *repeat*-Region von AvrBs3 für eine Kooperation mit der TalC-NTR inkompatibel ist. Da die *repeat*-Region von TalC und AvrBs3 die gleiche Konformation einnehmen sollten, ist eventuell die RVD-Base-Komposition das (für eine Kompatibilität) entscheidende Kriterium. Ein Vergleich der RVD-Abfolge zwischen AvrBs3 und TalC zeigt auf, dass *repeat* 1 in AvrBs3 den RVD HD (HD1) und in TalC den RVD NS (NS1) besitzt. Die RVDs 2 und 3 (NG2 und NS3) sind in beiden Proteinen identisch (Abbildung 3.2.6 A). Um aufzuklären, ob die NTR mit der *repeat*-Region kooperiert und diese Kooperation von den RVDs abhängt, wurden AvrBs3-Derivate erstellt bei denen der RVD in 1. *repeat* von HD1 zu NS1 verändert wurde (dAvrBs3-HD1 und dAvrBs3-NS1; Abbildung 3.2.6). Zur Veränderung der RVD-Abfolge wurde die *repeat*-Region von AvrBs3 mittels Hax3-basierten "Golden TALE technology" assembling kit konstruiert (Geißler *et al.* 2011). Auf diese Weise generierte AvrBs3-Derivate werden im folgenden Verlauf der Arbeit als dAvrBs3 (*designer* AvrBs3) bezeichnet. Die modifizierte dAvrBs3 *repeat*-Region wurde mit AvrBs3-NTR(WT), AvrBs3-NTR(W232C) und TalC-NTR kombiniert und die Aktivität dieser Derivate in Abhängigkeit von N_0 mittels GUS-Reporteranalyse untersucht. Es zeigte sich, dass dAvrBs3-NS1 im Gegensatz zu dAvrBs3-HD1 eine T_0 -unabhängige Aktivität besaß (Abbildung 3.2.6 B). Zudem wurde die Aktivität von dAvrBs3-NS1 durch eine W232C Substitution nicht beeinflusst. Die Kombination von dAvrBs3-NS1 mit der TalC-NTR führte im Gegensatz zu dAvrBs3-HD1, zu keinem vollkommenen Funktionsverlust (Abbildung 3.2.6 B). Die Proteinsynthese aller 4xc-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.6 C). Zusammenfassend zeigte sich, dass die NTR und die *repeat*-Region von TALEs miteinander kooperieren, wobei die Substitution von HD1 zu NS1 im dAvrBs3-Hintergrund verstärkt Mutationen an N_0 der DNA-Zielsequenz und Aminosäureaustausche in der NTR toleriert.

A

repeat	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
TalC	NS	NG	NS	HD	NI	NG	NN	NG	HD	NI	NN	N*	NI	NN	HD	NG	NI	NN	N*	HD	NN	NG
AvrBs3	HD	NG	NS	NG	NI	NI	NI	HD	HD	NG	NS	NS	HD	HD	HD	NG	HD	NG				

RVD1

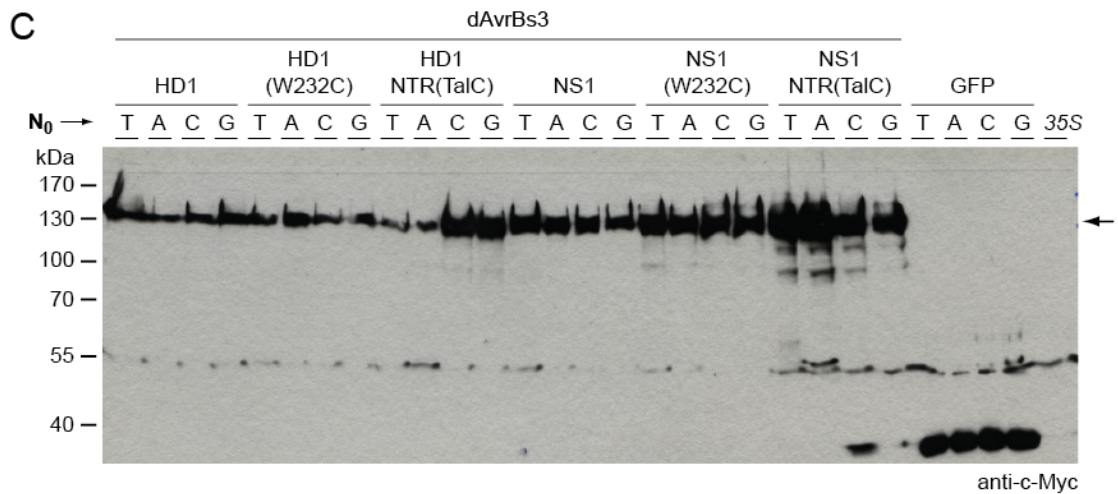
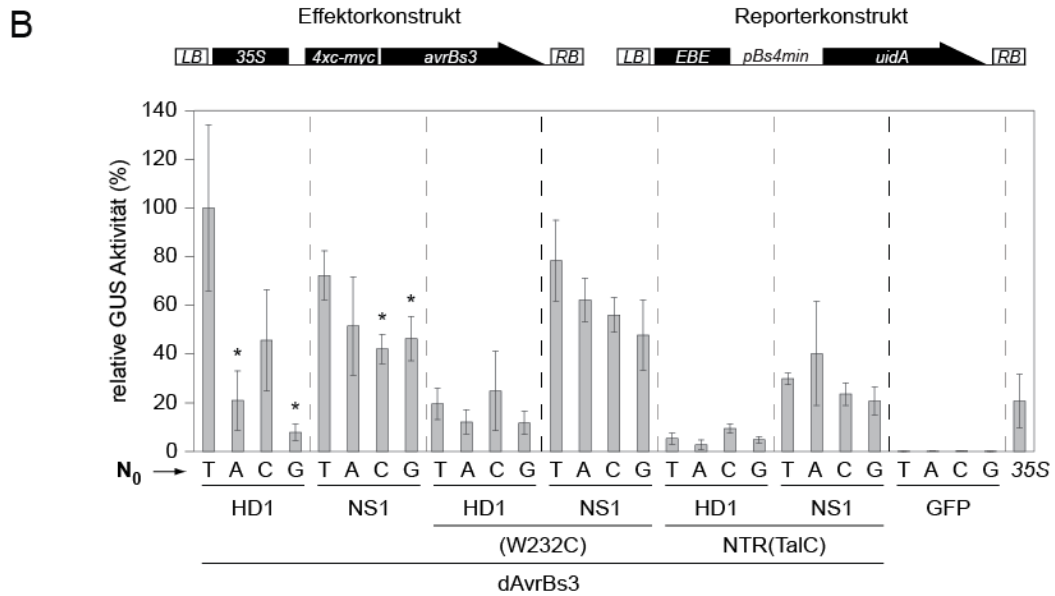


Abbildung 3.2.6: Die NTR und die repeat-Region von TALEs kooperieren miteinander.

(A) Vergleich der RVD-Abfolge von AvrBs3 und TalC. (B) Relative GUS-Aktivitäten der dAvrBs3-Derivate in Abhängigkeit von RVD1 und N₀. Schematische Darstellung von verwendeten Effektor- und Reporterkonstrukten. GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert und sind relativ zur GUS-Aktivität von dAvrBs3(WT) in Kombination mit T₀ Reporterkonstrukt (100%). GFP und 35S:uidA (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p*-value: * *p*<0,05). GUS-Reportergeranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. (C) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten AvrBs3-Derivate und GFP mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Eine Tryptophan-Cystein-Substitution in *repeat* -1 von AvrBs3 ist kompatibel mit der *repeat*-Region, wenn diese mit einem NS-*repeat* beginnt (dAvrBs3-NS1(W232C); Abbildung 3.2.6 B). Es stellt sich die Frage, ob die Kompatibilität zwischen der AvrBs3-NS1-*repeat*-Region und der NTR ausschließlich für W232 und C232 zutrifft oder ob andere Aminosäuren an Position 232 ebenfalls toleriert werden. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern R236 für die AvrBs3-Aktivität notwendig ist, wenn die *repeat*-Region mit dem RVD NS1 beginnt. Um diese Fragestellungen zu untersuchen,

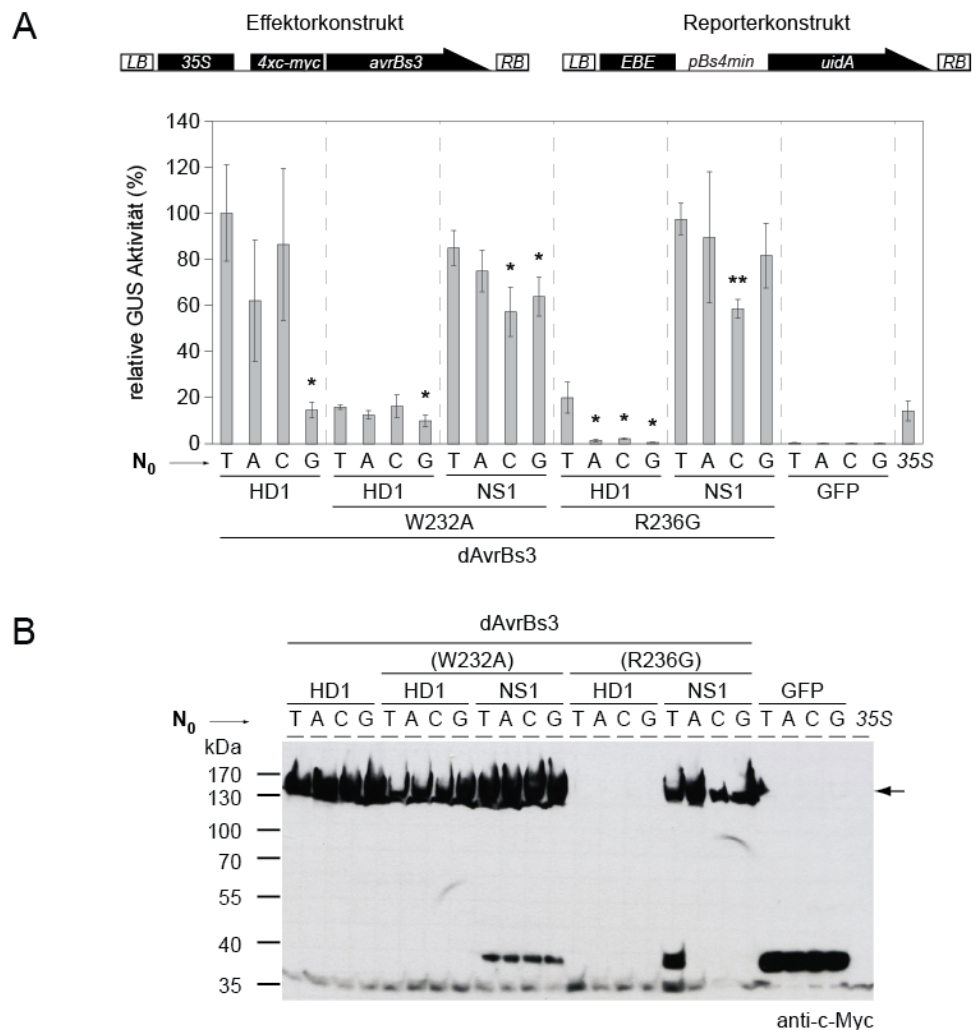


Abbildung 3.2.7: Die Aktivität von AvrBs3 mit NS-*repeat* an Position 1 ist unabhängig von W232 und R236.

(A) Relative GUS-Aktivitäten der dAvrBs3-Derivate in Abhängigkeit von RVD1 und N₀. GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert und sind relativ zur GUS-Aktivität von dAvrBs3(WT) in Kombination mit T₀-Reporterkonstrukt (100%). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-values*: * *p*<0,05; ** *p*<0,01). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. **(C)** Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate und GFP mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

wurde dAvrBs3-NS1 mit den AvrBs3-NTRs W232A und R236G kombiniert und die Aktivität dieser Derivate in Abhängigkeit von N_0 mittels GUS-Reporteranalyse untersucht (Abbildung 3.2.7 A). Es zeigte sich, dass dAvrBs3-NS1 eine T_0 -unabhängige Aktivität besaß, wenngleich W232 zu Alanin (W232A) oder R236 zu Glycin (R236G) ausgetauscht wurde. Demzufolge scheinen W232, R236 und T_0 für die AvrBs3-Aktivität nicht erforderlich zu sein, wenn dessen *repeat*-Region mit einem NS-*repeat* beginnt (dAvrBs3-NS1). Bis auf AvrBs3(R236G) wurde die Proteinsynthese aller AvrBs3-Derivate mittels Western Blot nachgewiesen. Über den Einfluss einer R236G-Substitution auf die dAvrBs3-HD1-Aktivität konnte keine Aussage getroffen werden.

3.2.6. Der RVD in *repeat 1* von AvrBs3 beeinflusst die T_0 -Spezifität

Der Einfluss des RVD an Position 1 (RVD1) auf die T_0 -Spezifität von AvrBs3 war unerwartet und widersprach den bis dato bekannten Daten und Publikationen. Hierbei stellte sich die Frage, ob weitere RVDs an Position 1 die T_0 -Spezifität von AvrBs3 beeinflussen oder ob dieses Phänomen lediglich für den RVD1 NS1 zutrifft. Um den Einfluss weiterer RVDs auf die T_0 -Spezifität zu analysieren wurden dAvrBs3-Derivate generiert bei denen der RVD HD1 zu anderen charakterisierten RVDs (NK1, NH1, NN1, NG1 und NI1) verändert wurde. Die für eine Aktivitätsanalyse nötigen Reporterkonstrukte wurden (ausgehend von $EBE_{AvrBs3}(N_0)$) an Position 1 der DNA-Zielsequenz den verwendeten RVDs in *repeat 1* (RVD1) angepasst (Abbildung 3.2.8 A und B; siehe 7.7). Die Aktivität der AvrBs3-Derivate in Kombination mit den jeweiligen Reporterkonstrukten in Abhängigkeit von N_0 wurde mittels GUS-Reporteranalyse untersucht. Es zeigte sich, dass ausschließlich AvrBs3-Derivate mit HD1 eine starke T_0 -Abhängigkeit aufwiesen, während die Aktivitäten der restlichen dAvrBs3-Derivate relativ unabhängig von N_0 waren (Abbildung 3.2.8 C und D). Eine Ausnahme stellt hierbei dAvrBs3-NS1 dar, welches in Kombination mit dem Reporterkonstrukten $EBE_{AvrBs3}(N_0T_1)$ durchweg eine schwache Aktivität aufwies. Vermutlich besitzt der RVD NS (spezifisch für alle Basen) „gegenüber“ eines Thymins eine Konformation, die nachteilig für die TALE-DNA-Interaktion ist, wenn diese sich an Position 1 der *repeat*-Region befindet. In den meisten Fällen führte die Kombination der dAvrBs3-Derivate und Reporterkonstrukten mit T_0 zu den höchsten Aktivitäten. Hierbei scheint T_0 besonders relevant für die AvrBs3-Aktivität zu sein, wenn die *repeat*-Region mit dem RVD HD1 beginnt (Abbildung 3.2.8 C und D). Diese Besonderheit wird

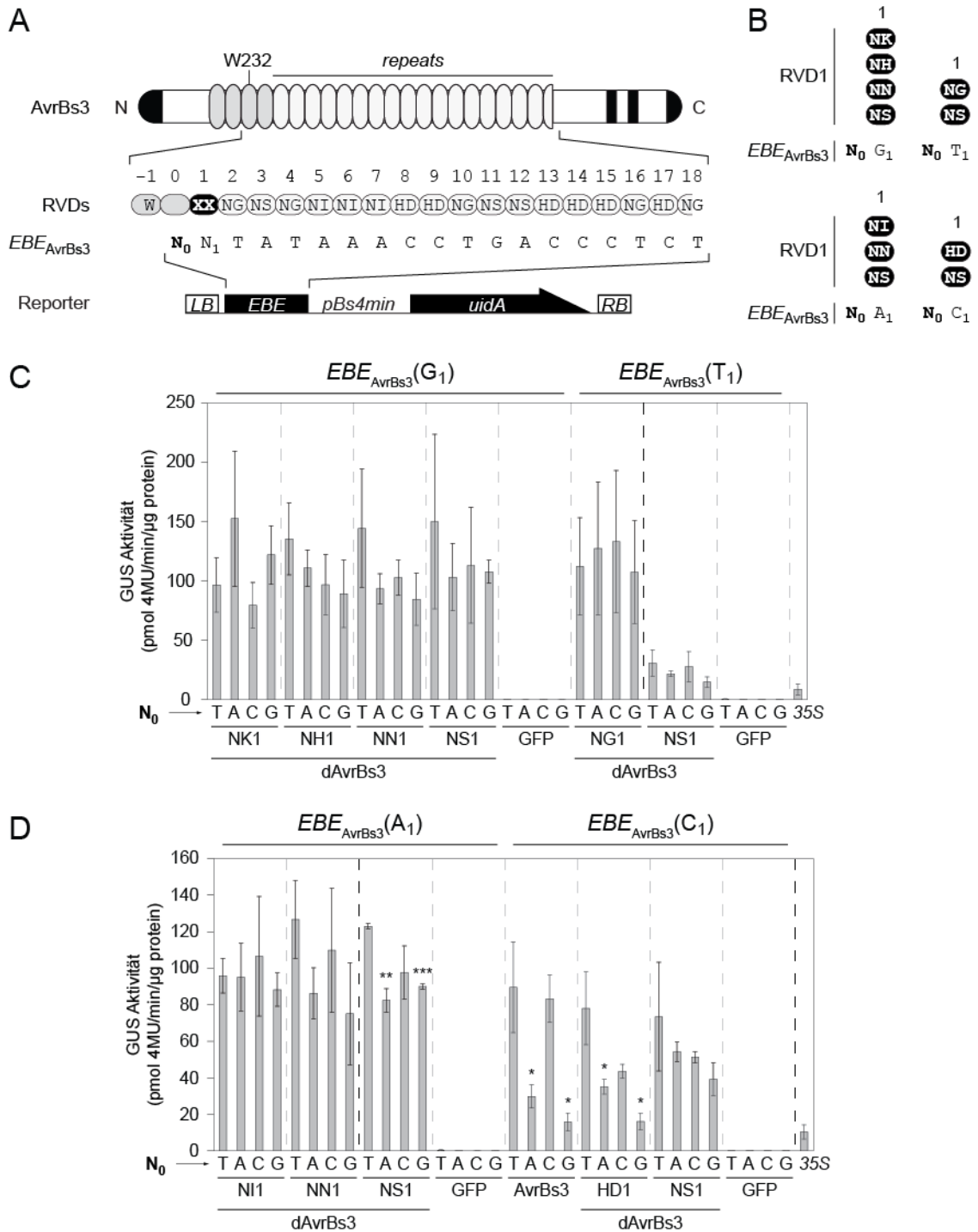


Abbildung 3.2.8: Der RVD im ersten *repeat* von AvrBs3 beeinflusst die Spezifität für T₀ innerhalb der DNA-Zielsequenz von AvrBs3.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten dAvrBs3-Derivate und Reporterkonstrukte. (B) Übersicht über verwendete RVDs an Position 1 der dAvrBs3-repeats und der resultierenden Reporterkonstrukte. (C und D) GUS-Aktivitäten der dAvrBs3-Derivate in Abhängigkeit von RVD1 und N₀. GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. GFP und 35S:uidA (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-values*: * *p*<0,05; ** *p*<0,01; *** *p*<0,001). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

im weiteren Verlauf der Arbeit als „Rep1-Effekt“ bezeichnet. Die Proteinsynthese aller 4xc-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.9).

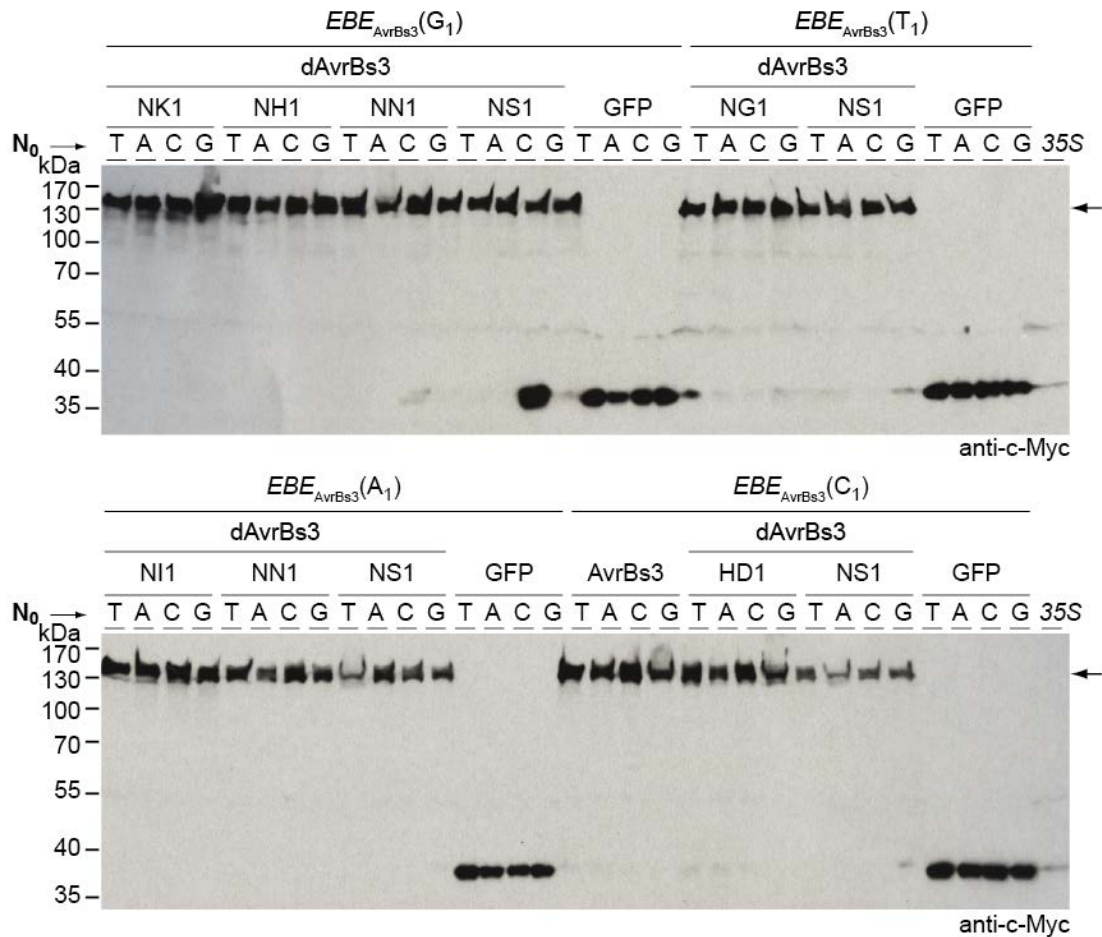


Abbildung 3.2.9: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3 RVD1-Substitutionsderivate.

Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis der 4xc-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate und GFP mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Western ist zugehörig zu der GUS-Reporteranalyse aus Abbildung 3-2-8. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

3.2.7. Spezifitätsanalyse des RVD HD1 innerhalb der AvrBs3-repeats

Der RVD HD wurde als starker *repeat* klassifiziert, der eine strikte Spezifität für Cytosin vermittelt (Cong *et al.* 2012; Streubel *et al.* 2012). In der Konsensussequenz der durch AvrBs3-gebundenen DNA-Zielsequenzen aus *C. annuum* befindet sich ein Adenin an Position 1 „gegenüber“ eines HD *repeats* (HD1). Es stellte sich die Frage, ob der RVD

HD, wenn dieser sich an Position 1 der AvrBs3 *repeat*-Region befindet, eine verminderte Spezifität vermittelt und deshalb eine erhöhte Abhängigkeit von W232

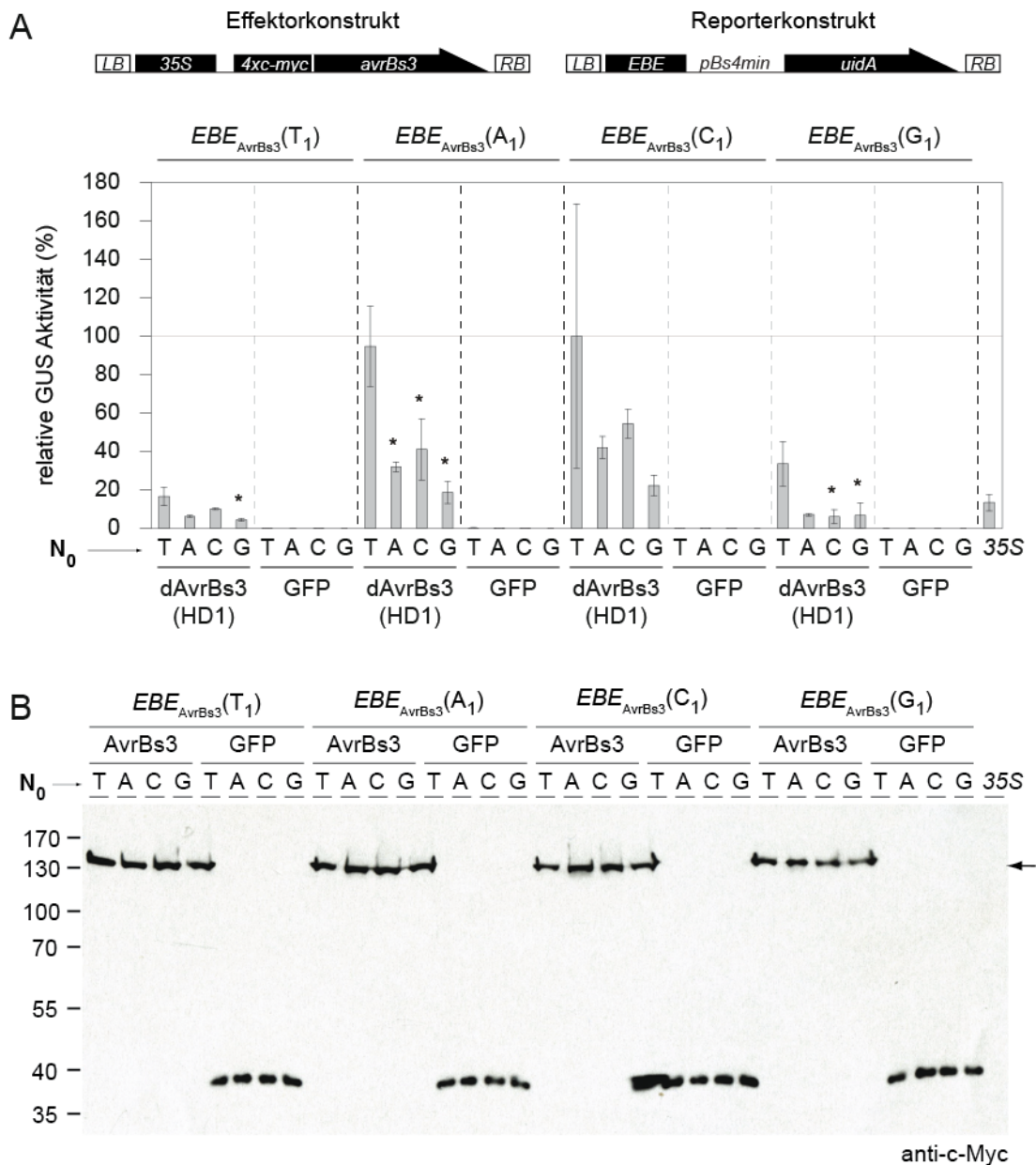


Abbildung 3.2.10: Der HD-repeat an Position 1 der AvrBs3-repeat-Region ist spezifisch für C₁ und toleriert A₁.

(A) Relative GUS-Aktivitäten von dAvrBs3 in Kombination mit permutierten Reporterkonstrukten (N₀N₁). Die GUS-Aktivität wurde drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert und ist relativ zur GUS-Aktivität von dAvrBs3(WT) in Kombination mit T₀C₁-Reporterkonstrukt (100%). GFP und 35S:*uidA* (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p*-values: * *p*<0,05). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. **(C)** Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis von 4xc-Myc-markierten dAvrBs3 und GFP mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Pfeile kennzeichnen die erwartete Proteingröße. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

sowie T_0 besteht. Demzufolge könnte die Aktivität von dAvrBs3-HD1 unabhängig von N_1 sein. Um die Spezifität von HD1 im AvrBs3-Hintergrund in Abhängigkeit von N_0 und N_1 zu analysieren, wurde die Aktivität von dAvrBs3-HD1 in Kombination mit allen möglichen Varianten der DNA-Zielsequenz (N_0N_1) mittels GUS-Reporteranalyse ermittelt (Abbildung 3.2.10 A). Zwar besaß dAvrBs3-HD1 vergleichbare Aktivitäten mit den Reporterkonstrukten $EBE_{AvrBs3}(N_0A_1)$ und $EBE_{AvrBs3}(N_0C_1)$, jedoch führte die Kombination mit den Reporterkonstrukten $EBE_{AvrBs3}(N_0T_1)$ und $EBE_{AvrBs3}(N_0G_1)$ zu einer starken Reduktion der Aktivität (Abbildung 3.2.10 A). Die T_0 -Abhängigkeit von AvrBs3 blieb dabei unverändert mit der Hierarchie für N_0 von $T_0 > C_0 > A_0 > G_0$ (Abbildung 3.2.10 A). Es scheint als ob der RVD HD, wenn sich dieser an Position 1 der *repeat*-Region befindet seine strikte Spezifität für Cytosin verliert und zusätzlich die Anwesenheit von Adenin toleriert (C_1 und A_1). Basen die zu einer sterischen Störung führen, werden jedoch nicht toleriert (T_1 und G_1). Die Aktivität von TALEs mit der RVD-Base-Kombination HD1- C_1 scheint im besonderen Maß von W232 und T_0 abhängig zu sein („Rep1-Effekt“). Die Proteinsynthese der 4xc-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.10 B).

3.2.8. Die T_0 -Abhängigkeit und der „Rep1-Effekt“ werden von der RVD-Komposition beeinflusst

Der „Rep1-Effekt“ steht sowohl im Widerspruch zu publizierten Daten als auch zu der starken Konservierung von W232 und T_0 in natürlichen TAL-Effektoren sowie deren DNA-Zielsequenzen. Eine mögliche Hypothese ist, dass weitere Faktoren existieren, die zu einer T_0 -Unabhängigkeit von TALEs beitragen und dass diese Parameter zufällig auf AvrBs3 zutreffen. Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten beschäftigte sich mit der T_0 -Spezifität von TALEs. Hierbei wiesen TALE-Derivate eine T_0 -Abhängigkeit auf auch wenn sich kein HD-*repeat* an Position 1 befand (Boch *et al.* 2009; Römer *et al.* 2010; Lamb *et al.* 2013). Da neben der NTR auch die CTR hoch konserviert ist, stellte sich die Frage, ob die RVD-Komposition den „Rep1-Effekt“ sowie die T_0 -Abhängigkeit beeinflusst. Dazu wurden drei artifizielle TAL-Effektoren mit jeweils 17,5 *repeats* aber unterschiedlicher RVD-Komposition (ARTrep18-1, ARTrep18-2 und ARTrep18-3) sowie deren korrespondierenden Reporterkonstrukte generiert ($EBE_{ARTrep18-1}$, $EBE_{ARTrep18-2}$ und $EBE_{ARTrep18-3}$ fusioniert an *pBs4min* und *uidA*; Abbildung 3.2.11 A; siehe 7.7). Die Aktivität der artifiziellen TALE-Derivate wurde in Abhängigkeit von N_0 mittels GUS-Reporteranalyse unter der Verwendung entsprechender

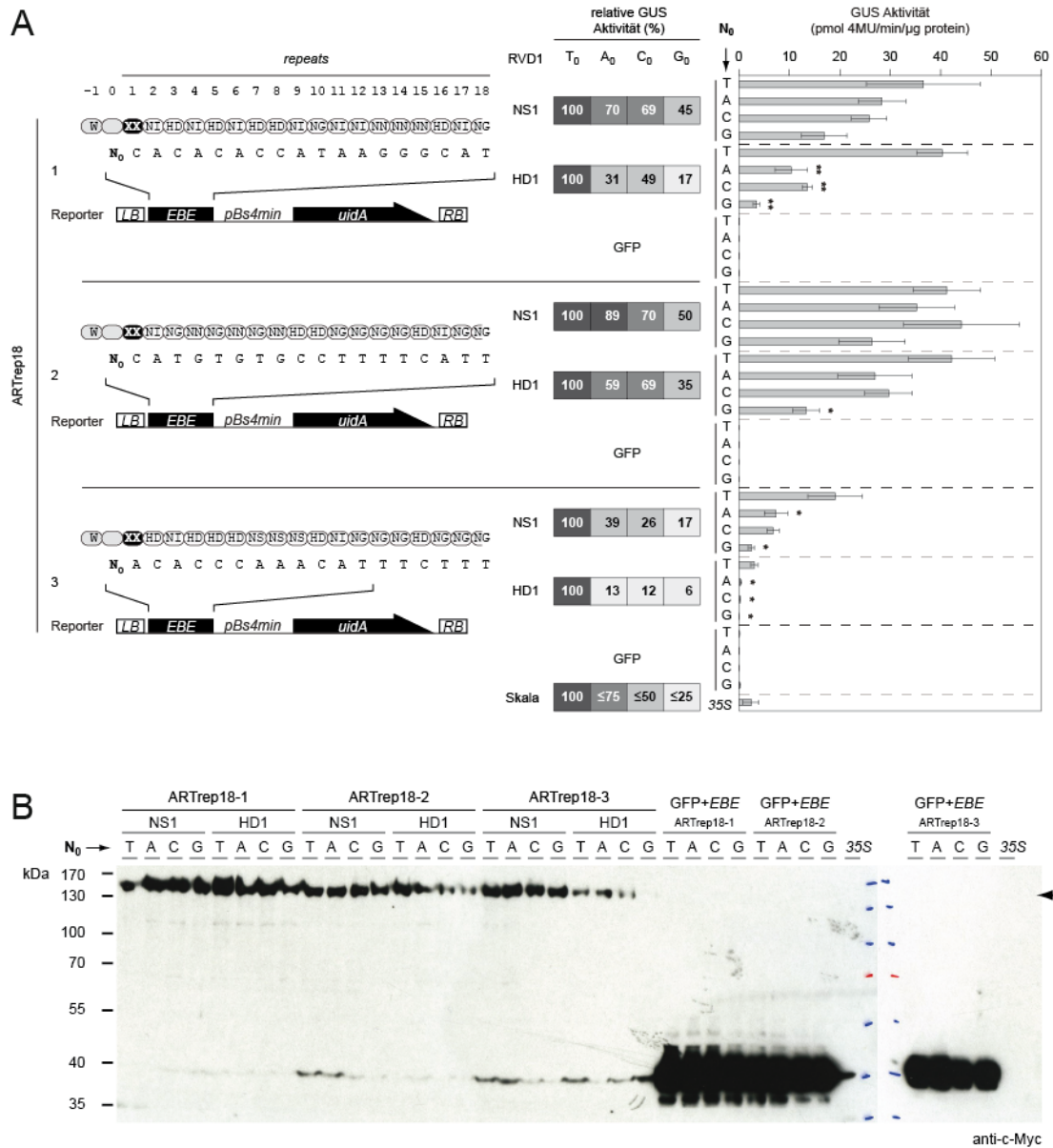


Abbildung 3.2.11: Die T₀-Abhängigkeit der Aktivität von TAL-Effektoren wird von der RVD-Komposition beeinflusst.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Effektor- und Reporterkonstrukte, sowie deren relativen und absoluten GUS-Aktivitäten (ARTrep18-Derivate) in Abhängigkeit von N₀. GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. GFP und 35S:uidA (35S) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-values*: * *p*<0,05; ** *p*<0,01). Relative GUS-Aktivitäten setzen sich aus Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten zusammen. Die Farbskala dient der Visualisierung von GUS-Aktivitäten einzelner ARTrep18-Derivate in Abhängigkeit von N₀. GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. (B) Gezeigt ist der Proteinsynthesenachweis von 4xc-Myc-markierten ARTrep18-Derivaten und GFP mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Der Pfeil kennzeichnet die erwarteten Proteingrößen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Reporterkonstrukte untersucht. ARTrep18-1 und ARTrep18-2 besaßen vergleichbar hohe Aktivitäten, im Gegensatz dazu wies ARTrep18-3 eine geringere Aktivität auf (Abbildung 3.2.11 A). Alle artifiziellen TALEs zeigten eine T_0 -Abhängigkeit, die stärker ausgeprägt war, wenn die *repeat*-Region mit einem HD-*repeat* beginnt. In allen Fällen führte die Kombination der TALE-HD1-Derivate mit den entsprechenden Reportern *EBE(G₀)* zur geringsten Aktivität. Zudem war auffällig, dass die T_0 -Abhängigkeit bei sehr aktiven TALEs generell reduziert zu sein scheint (z.B.: ARTrep18-2). Andererseits besaß der verhältnismäßig schwache ARTrep18-3-NS1 eine T_0 -Abhängigkeit obwohl dessen *repeat*-Region mit einem NS-*repeat* begann. Die Proteinsynthese aller 4xc-Myc-markierten TALE-Derivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.11 B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T_0 -Abhängigkeit und Stärke des „Rep1-Effekts“ von TALEs durch die RVD-Komposition beeinflusst wird.

3.2.9. Verringerung der *repeat*-Anzahl erhöht die T_0 -Abhängigkeit der AvrBs3-Aktivität

Ein weiterer Faktor, der möglicherweise Einfluss auf die T_0 -Abhängigkeit und den „Rep1-Effekt“ nimmt, könnte die *repeat*-Anzahl eines TALEs sein. Es wurde beispielsweise für das AvrBs3-Homolog Hax3 (11,5 *repeats*, RVD1 = NI) gezeigt, dass dessen Aktivität absolut T_0 -abhängig ist (Boch *et al.* 2009). Die Aktivität von dAvrBs3-NI1 hingegen war T_0 -unabhängig (Abbildung 3.2.8 D). Um Auswirkungen der *repeat*-Anzahl auf die T_0 -Abhängigkeit und den „Rep1-Effekt“ eines TALEs aufzudecken, wurden dAvrBs3-Derivate mit 9,5 bis 13,5 *repeats* und HD1 bzw. NS1 erstellt und deren Aktivität in Abhängigkeit von N_0 mittels GUS-Reporteranalyse untersucht (Abbildung 3.2.12). Obwohl dAvrBs3-NS1 (17,5 *repeats*) eine Präferenz für T_0 besaß, gab es keinen signifikanten Unterschied der Aktivität mit unterschiedlichen Basen an Position 0 der DNA-Zielsequenz. Hingegen zeigte dAvrBs3-HD1 (17,5 *repeats*) stets eine signifikante Abhängigkeit von N_0 mit der Hierarchie $T_0 > C_0 > A_0 > G_0$ („Rep1-Effekt“; Abbildung 3.2.12 B). Die dAvrBs3-Derivate mit 13,5 und 12,5 *repeats* wiesen eine höhere Aktivität als dAvrBs3 mit 17,5 *repeats* auf, während die Derivate mit 11,5 *repeats* ähnliche Aktivitäten besaßen, deren Aktivitäten jedoch sowohl mit HD1 als auch NS1 T_0 -abhängig waren (Abbildung 3.2.12 B). Die dAvrBs3-Derivate mit 10,5 und 9,5 *repeats* führten lediglich zu einer schwachen bzw. keiner Induktion des Reporterkonstrukts. Dies deutet darauf hin, dass der „Rep1-Effekt“ auch

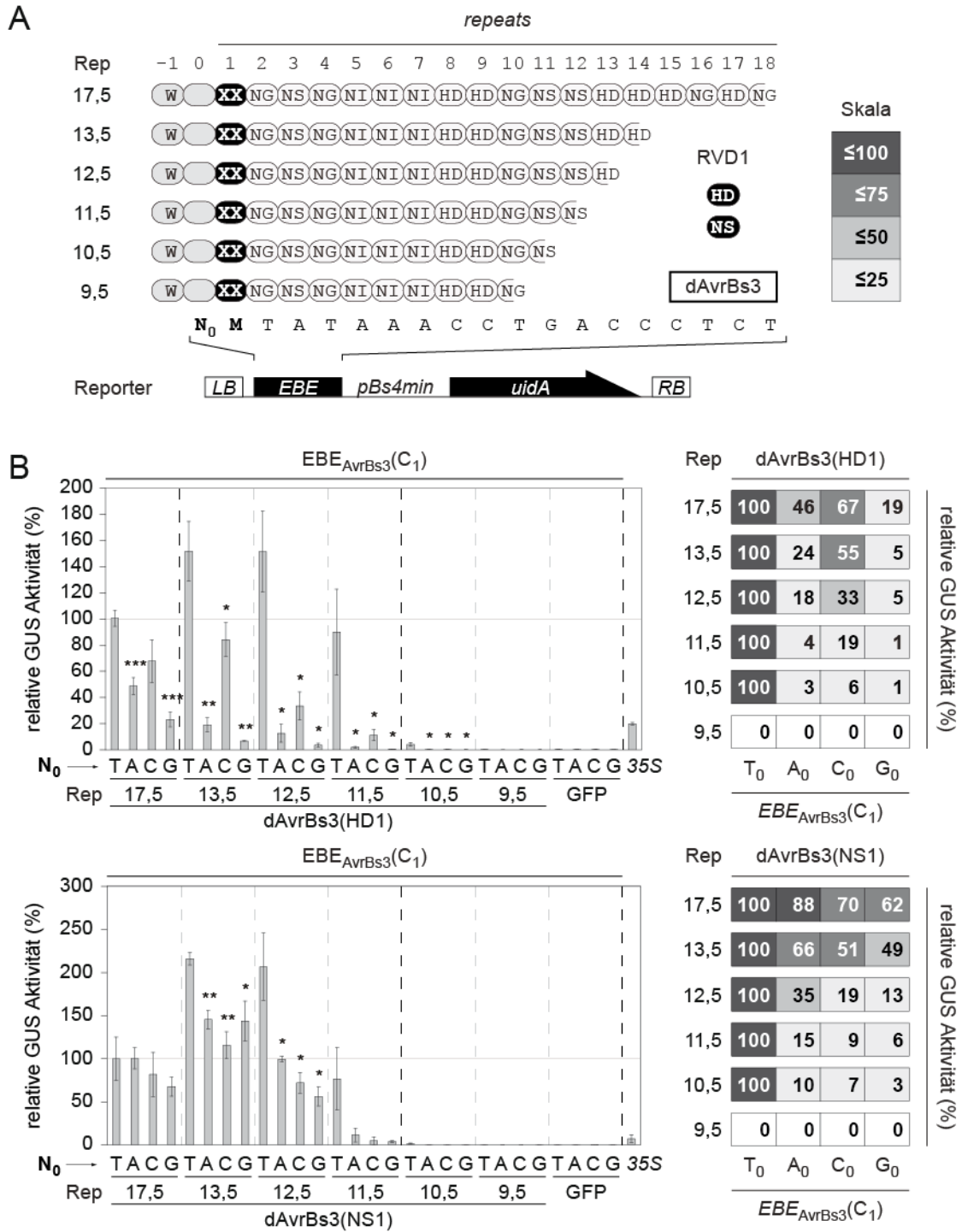


Abbildung 3.2.12: Die T₀-Abhängigkeit von AvrBs3 nimmt mit geringerer *repeat*-Anzahl zu.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten dAvrBs3-Derivate und Reporterkonstrukte. (B) Gezeigt sind die relativen GUS-Aktivitäten der verkürzten dAvrBs3-Derivate in Abhängigkeit von N₀. Rechts sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten relativ zur Aktivität des jeweiligen AvrBs3-Derivates mit dem T₀-Reporterkonstrukt dargestellt. Die Farbskala dient der Visualisierung von GUS-Aktivitäten. GFP und 35S:*uidA* (35S) dienen als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Die GUS-Aktivitäten wurden drei Tage nach Inokulation der Effektor- und Reporterkonstrukte in *N. benthamiana* analysiert. Sterne kennzeichnen die durch t-Test ermittelte Signifikanz zwischen den Aktivitätsunterschieden (*p-values*: * *p*<0,05; ** *p*<0,01; *** *p*<0,001). GUS-Reporteranalyse wurde ohne P19 durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

bei TALEs mit weniger als 17,5 *repeats* vorhanden, jedoch schwächer ausgeprägt ist. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die Verringerung der *repeat*-Anzahl die T₀-Abhängigkeit von AvrBs3 verstärkt (Abbildung 3.2.12 B). Die Proteinsynthese aller 4x-c-Myc-markierten AvrBs3-Derivate wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.2.13).

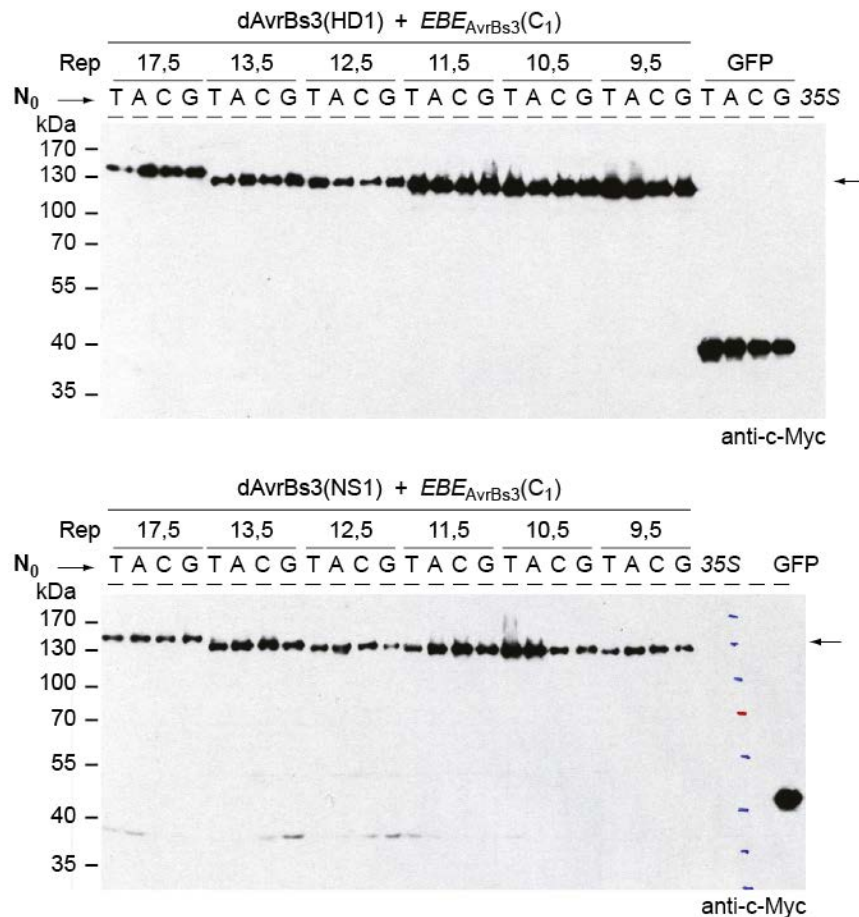


Abbildung 3.2.13: Proteinsynthesenachweis der AvrBs3 *repeat*-Deletionsderivate.

Der Proteinsynthesenachweis der 4x-c-Myc-markierten dAvrBs3-Derivate und GFP erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen c-Myc-Antikörpers und dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Detektionssystem. Der Western Blot ist zugehörig zu den jeweiligen GUS-Reportergenanalysen aus Abbildung 3-3-12. Pfeile kennzeichnen die erwarteten Proteingrößen.

4. Diskussion

4.1. Oligomerisierung von AvrBs3

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass AvrBs3 und die AvrBs3-Homologen PthA1-4 in der Lage sind zu Homo-Oligomere auszubilden (Gürlebeck *et al.* 2005; Domingues *et al.* 2010). Die molekularen Grundlagen dieser Interaktion waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese molekularen Grundlagen identifiziert und die biologische Relevanz der Oligomerisierung für die Funktion von AvrBs3 analysiert. Es wird angenommen, dass die an Hand von AvrBs3 generierten Daten in gleicher Weise für AvrBs3-Homologe bzw. TALEs gültig sind.

4.1.1. AvrBs3 bildet Proteinkomplexe über Disulfidbrücken

AvrBs3-Komplexe wurden *in vitro* durch Inkubation mit DTT zu Monomeren reduziert (Abbildung 3.1.1; Abbildung 3.1.2). Ob es sich bei diesen Komplexen um ein Dimer oder Oligomer handelt, wurde nicht ermittelt. Da die Substitution aller Cysteine bzw. der Cysteine der AvrBs3-*repeat*-Region zu einem Ausbleiben der Komplexbildung auch in Abwesenheit von DTT führte, erfolgt die AvrBs3-Oligomerisierung *in vitro* vermutlich über Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der *repeat*-Region. Dies bestätigt, dass die *repeat*-Region für die Dimerisation von AvrBs3 in Hefe und *in planta* notwendig ist (Gürlebeck *et al.* 2005). Eine autonome Oligomerisierung von Proteinen über Disulfidbrücken im vorherrschend reduzierenden Milieu des pflanzlichen Zytoplasmas ist unwahrscheinlich (Dietz 2003). Daher ist es fraglich, ob sich Disulfidbrücken-basierte AvrBs3-Komplexe im pflanzlichen Zytoplasma (gezeigt mittels Ko-Kernimport; (Gürlebeck *et al.* 2005)) bzw. im Zellkern von Hefe-Zellen (Hefe-Dihybrid-Studien; (Gürlebeck *et al.* 2005; Domingues *et al.* 2010)) von allein ausbilden oder Hilfsproteine benötigt werden. Disulfidbrücken-basierte Protein-Oligomere im pflanzlichen Zytoplasma sind bekannt. Beispielsweise bildet NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*) Disulfidbrücken-basierte Oligomere im Zytoplasma, die aktiv über Protein-S-nitrosylation gebildet werden (Tada *et al.* 2008). Eine S-nitrosylation von AvrBs3 *in planta* wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Letztendlich kann jedoch nicht

ausgeschlossen werden, dass die AvrBs3-Homo-Oligomerisierung in Hefe auf anderen Mechanismen als auf Disulfidbrücken beruht. Dies könnte in zukünftigen Experimenten, mittels der hier erstellten AvrBs3-Derivate getestet werden (z.B. Hefe-Dihybrid-Studien zwischen AvrBs3(WT) und AvrBs3(C30S/A)_{Rep}).

4.1.2. Aktivitätsverlust der Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate

Die Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate besaßen keine Aktivität *in planta* (AvrBs3(C30S)_{Rep}, AvrBs3(C30A)_{Rep}; Abbildung 3.1.3; Abbildung 3.1.4; Abbildung 3.1.6; Abbildung 3.1.7). Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass der Aktivitätsverlust dieser Derivate mit einem Verlust der spezifischen DNA-Bindung *in planta* einhergeht. Die *in planta* Kompetitionsanalyse stützt diese Vermutung, da AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} (im Gegensatz zu AvrBs3-ΔAD) nicht mit AvrBs3(WT) um dessen DNA-Zielsequenz zu konkurrieren (Abbildung 3.1.9 B). Zudem lokalisieren AvrBs3(C30S)_{Rep} sowie AvrBs3(C30A)_{Rep} nachweislich im Zellkern (Abbildung 3.1.8). Dennoch bleibt die Frage offen, warum die Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate eine (wenn auch reduzierte) spezifische DNA-Bindung *in vitro* aufwiesen (Abbildung 3.1.2 C). Es wurde gezeigt, dass die komplette NTR von AvrBs3 für die vollständige Aktivität als auch DNA-Bindeaffinität notwendig ist (Abbildung 3.1.12; Abbildung 3.1.14). Dies stimmt mit der Hypothese mehrerer Publikationen überein, dass die DNA-Bindung von TALEs mit der NTR beginnt und von 5' nach 3' über die *repeat*-Region erfolgt (Gao *et al.* 2012; Mali *et al.* 2013; Meckler *et al.* 2013). Auch AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep} binden möglicherweise DNA über die NTR. Dies könnte den geringen Einfluss der Cystein-Substitutionen in den *repeats* von AvrBs3 auf dessen DNA-Bindeaffinität erklären (Abbildung 3.1.2 C). Im Übergang von der DNA-freien zur DNA-gebundenen Form eines TALEs erfährt die *repeat*-Region eine strukturelle Kompression, welche die spezifische Interaktion zwischen RVDs und gegenüberliegenden Basen erst ermöglicht (Murakami *et al.* 2010; Deng *et al.* 2012). Wie in Abbildung 4.1.1 illustriert, befinden sich die Cysteine (C30) in jedem äußeren, *repeat*-verbindenden *loop*. Strukturanalysen von TALE-DNA-Komplexen zeigen, dass dieser Bereich der *repeat*-Region (AS 26 bis 1 des folgenden *repeats*) in seiner Struktur variabel ist und somit vermutlich zur Flexibilität dieser Domäne beiträgt (Deng *et al.* 2014). Die Substitution der Cysteine könnte die strukturelle Integrität der äußeren *loops* beeinflussen, zu einer verminderten Flexibilität bzw. Kompressionsfähigkeit der *repeat*-Region führen und damit die spezifische DNA-Bindung aller *repeats* negativ

beeinflussen bzw. verhindern. Möglicherweise bewirken die (C30S)_{Rep}- bzw. (C30A)_{Rep}-Substitutionen eine geringfügig veränderte Kompressionsfähigkeit und damit verbundene Fehlpositionierung der RVD-Loops, welche sich mit fortlaufender *repeat*-Anzahl zu größeren Verlagerungen dieser summiert. Demzufolge könnten die N-terminal gelegenen *repeats*, trotz Cystein-Substitution, spezifische Kontakte zu „gegenüberliegenden“ Basen ausbilden, während weiter C-terminal gelegene *repeats* aufgrund der zunehmenden Fehlpositionierung nicht mehr dazu fähig sind. Das in EMSA-Studien zur Kompetition verwendete mutierte DNA-Fragment besitzt ausschließlich Mutationen im 5'-Bereich der UPA-Box (*ubm2*, Abbildung 3.1.1 B). Demnach könnten auch AvrBs3(C30S)_{Rep} sowie AvrBs3(C30A)_{Rep} zwischen WT und mutierten DNA-Fragmenten differenzieren. Dies könnte eine Erklärung für die etwas reduzierte DNA-Bindenspezifität der Cystein-substituierten AvrBs3-Derivate *in vitro* darstellen (Abbildung 3.1.2 C). Die spezifische DNA-Bindung dieser Derivate wäre demnach nicht über die gesamte DNA-Zielsequenz gewährleistet und würde zu einer Titration der Bindeereignisse im pflanzlichen Genom führen, was wiederum das Ausbleiben der transkriptionellen Induktion von Zielgenen verursacht.

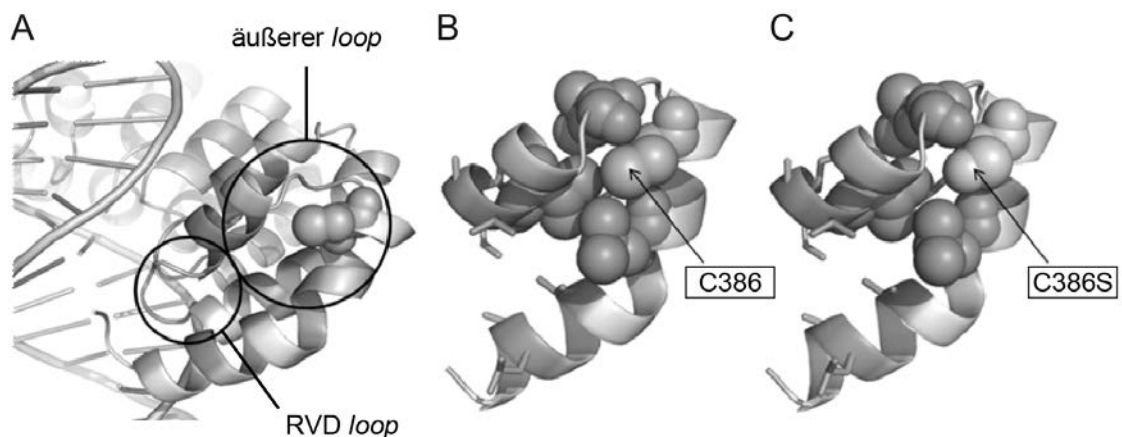


Abbildung 4.1.1: Strukturmodell der AvrBs3-repeats.

(A) Ausschnitt der DNA-gebundenen *repeat*-Region von DNA-gebundenem PthXo1 (Mak *et al.* 2012). RVD-loop mit exponierter Aminosäure (Position 13) für die Ausbildung spezifischer Kontakte zur gegenüberliegenden Base der DNA. Äußerer loop verbindet benachbarte *repeats*. Das Cystein ist im *space-filling* Modell dargestellt. (B und C) Strukturvorhersage für die AvrBs3 *repeat*-Region WT (B) und (C30S)_{Rep} (C). Ausschnitt des äußeren loops von AvrBs3 *repeat*3 mit *space-filling* Modell der Aminosäuren C386 bzw. C386S im Kontext benachbarter Aminosäuren. Strukturvorhersage wurde mit Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) durchgeführt. Die Abbildung wurde verändert nach Felix List.

4.1.3. Funktionale Relevanz der AvrBs3-Oligomerisation

Strukturelle Daten von TALE-DNA-Komplexen belegen, dass ein TALE-Molekül mit einem Molekül doppelsträngiger DNA interagiert (Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012). In dieser Arbeit durchgeführte EMSA-Studien zeigten, dass die Oligomerisierung von AvrBs3 dessen DNA-Bindung *in vitro* inhibiert (Abbildung 3.1.1 C). Für die spezifische Interaktion von TALEs mit doppelsträngiger DNA scheint eine Oligomerisierung also unnötig zu sein. Für AvrBs3 wurde per Fluoreszenzanalyse gezeigt, dass es als Dimer in den pflanzlichen Zellkern transportiert werden kann und folglich Dimere im pflanzlichen Zytoplasma ausbildet (Ko-Import von GFP-markierten AvrBs3- Δ NLS durch unmarkiertes AvrBs3(WT); (Gürlebeck *et al.* 2005)). Im Rahmen dieser Arbeit, konnte ein Ko-Kernimport von AvrBs3-Dimeren *in planta* mittels GUS-Reporteranalyse jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 3.1.11 B). Diese Methode ist allerdings nur geeignet für den Nachweis eines Ko-Kernimports von Heterodimeren aus TALE-Derivaten mit unterschiedlichen DNA-Zielsequenzen (bzw. RVD-Komposition). Bei gleicher DNA-Bindenspezifität von „Fracht“ und „Transporter“ wird die Aktivität der „Fracht“ (AvrBs3-NLS-Deletionsderivate) entweder durch die Aktivität der „Transporter“ überdeckt (AvrBs3- Δ AD), oder dominant negativ unterdrückt (AvrBs3- Δ rep16; Abbildung 3.1.11 B). Frühere Arbeiten zeigten, dass AvrBs3- Δ rep16 (trotz ausbleibender Transkriptionsinduktion) mit vergleichbarer Affinität wie AvrBs3(WT) an die UPA-Box bindet (Römer *et al.* 2007). Die Koexpression des artifiziellen TALEs 14-2 („Transporter“ mit unterschiedlicher DNA-Bindenspezifität) mit den AvrBs3-NLS-Deletionsderivaten führte nicht zu einer erhöhten GUS-Aktivität und stützt die Vermutung, dass diese Derivate keine Heterodimere im Zytoplasma ausbilden (Abbildung 3.1.11 B). Ein Einfluss der RVD-Komposition auf die Bildung von TALE-Heterodimeren, kann nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise interagieren PthA1 (16,5 repeats) und PthA4 (17,5 repeats) trotz ähnlicher repeat-Anzahl nicht in Hefe-Dihybrid-Studien (Domingues *et al.* 2010). Eine Hetero-Oligomerisierung zwischen AvrBs3 und dem artifiziellen TALE 14-2 könnte in fortführenden Experimenten mittels GST pull-down *in vitro* bzw. Hefe-Dihybrid-Studien verifiziert werden. TALE-Proteinkomplexe müssten, wenn diese über Disulfidbrücken gebildet werden, sowohl aktiv im pflanzlichen Zytoplasma oxidiert und möglicherweise auch aktiv im pflanzlichen Zellkern reduziert werden. Ein Hinweis auf eine mögliche Reduktion von TALE-Homo-Oligomeren ist CsTDX (*Citrus sinensis tetratricopeptide repeat domain-containing thioredoxin*), ein Thioredoxin das als Interaktionspartner des TALEs PthA2 identifiziert wurde (Domingues *et al.* 2010). Eine Interaktion von AvrBs3 mit dem TDX-Homolog aus Paprika (CaTDX) konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung

3.1.10). Ob CsTDX in der Lage ist, mögliche Disulfidbrücken-verknüpfte PthA2-Proteinkomplexe zu reduzieren, müsste in Folgeexperimenten untersucht werden. Der Ko-Kernimport von AvrBs3-Derivaten ist das einzige Experiment, das auf eine Dimerisierung von TALEs im pflanzlichen Zytoplasma hindeutet (Gürlebeck *et al.* 2005). Bei der GUS-Reporteranalyse führte die Expression der AvrBs3-NLS-Deletionsderivate ohne „Transporter“ schon zu einer geringen Induktion des Reportergens (Aktivität der Derivate relativ zu AvrBs3(WT): AvrBs3- Δ N152- Δ NLS (2 %); AvrBs3- Δ NLS (5 %); Abbildung 3.1.11 B). Demzufolge könnten bereits geringe Mengen dieser Proteine trotz Deletion der Kernlokalisierungssignale in den pflanzlichen Zellkern gelangen. Dies könnte die in einer Publikation detektierte Kernlokalisierung von AvrBs3-NLS-Deletionsderivaten erklären (Gürlebeck *et al.* 2005). Bisher gibt es keine Hinweise auf eine biologische Funktion der Dimerisierung bzw. Homo-Oligomerisierung von AvrBs3. Es scheint naheliegend, dass es sich bei der Dimerisierung von TALEs im pflanzlichen Zytoplasma um ein Artefakt handelt. Dies ist aber auch mit den hier vorliegenden Daten nicht zweifelsfrei gezeigt.

4.2. Funktionale Bereiche der NTR und CTR von AvrBs3

Die NTR bzw. CTR von AvrBs3 und Homologen umfasst 288 bzw. 278 Aminosäuren und ist hoch konserviert. Der evolutionäre Erhalt dieser verhältnismäßig großen Proteindomänen deutet an, dass es sich hierbei um wichtige und funktionale Bereiche handelt.

4.2.1. Die N-terminale Region von AvrBs3 fördert die DNA-Bindeaffinität

Bis auf die AS 1-63 ist fast die komplette NTR für die vollständige *in planta*-Aktivität von AvrBs3 notwendig (Abbildung 3.1.12 B). Für AvrBs3 wurde beschrieben, dass die AS 1-50 das Sekretionssignal enthalten, welches zur *Agrobacterium*-vermittelten transienten Expression nicht notwendig ist (Szurek *et al.* 2002). Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie in Human-Zellen, bei der die NTR eines artifiziiellen TALEs systematisch verkürzt wurde (Zhang *et al.* 2011). Die Deletion der N-terminalen 152 AS von AvrBs3 führte zu einer starken Reduktion der Aktivität, die in der Reduktion der DNA-Bindeaffinität begründet liegt (Abbildung 3.1.12 B; Abbildung 3.1.14).

Fluoreszenz-Polarisations-Messungen bestätigten, dass die Deletion der N-terminalen 152 AS die DNA-Bindeaffinität von AvrBs3 um den Faktor 4 verringert (Kd: AvrBs3(WT) = $23,2 \pm 1,6$ nM; AvrBs3- Δ N152 = $99,2 \pm 7,5$ nM; (Schreiber *et al.* 2015)). Demzufolge, besitzt AvrBs3- Δ N152 keine WT-Aktivität. Strukturanalysen deckten auf, dass die zentrale *repeat*-Region um vier degenerierte *repeats* in der NTR fortgesetzt wird (*repeat* -3 bis *repeat* 0 = AS: 162-288; (Gao *et al.* 2012)). Weiterhin wurde gezeigt, dass die degenerierten *repeats* essentiell für die DNA-Bindung eines TALEs sind (Gao *et al.* 2012). Innerhalb der Aminosäuresequenz von AvrBs3- Δ N152 sind die vier degenerierten *repeats* enthalten, demzufolge scheint die DNA-Bindedomäne von TALEs über diese 4 degenerierten *repeats* hinauszugehen. Dabei handelt es sich möglicherweise nicht um eine strukturell zusammenhängende Domäne, da eine partielle Protease-Behandlung (Inkubation mit Trypsin) des artifiziellen TALEs dHax3 zu einer Spaltung der Peptidbindung an Position 148 in N-terminaler Richtung von *repeat* -3 führte (Gao *et al.* 2012). Welche Struktur der N-terminale Bereich (AS 64 - 147) einnimmt, ist nicht bekannt. Eine wichtige Rolle dieser Region bei der DNA-Bindung ist jedoch nachgewiesen (Schreiber *et al.* 2015). Strukturelle Informationen dieses Proteinbereichs, könnten Aufschluss über die Funktionsweise der NTR bei der DNA-Bindung von TALEs geben.

Gegenwärtig werden TALE-basierte Proteine als Werkzeuge zur DNA-Modifikation verwendet (z.B. TALE-Nukleasen; TALENs; (Doyle *et al.* 2013b)). Dabei ist es von Vorteil die TALE-DNA-Bindedomäne auf eine minimale Funktionseinheit zu reduzieren, um hohe DNA-Bindung bei möglichst geringer Proteingröße zu gewährleisten. Die meisten TALENs enthalten eine NTR, in der die N-terminalen 152 AS deletiert wurden (Δ N152). Der Einfluss der NTR auf die TALEN-Aktivität wurde zwar in mehreren Studien untersucht (Bedell *et al.* 2012; Sun *et al.* 2012; Ansai *et al.* 2013; Sun *et al.* 2013), allerdings konnte eine Aktivitätssteigerung durch eine vollständige NTR nur in einer dieser Studien dokumentiert werden (Ansay *et al.* 2013). Die Deletion der N-terminalen 152 AS führt zu höheren Expressionsraten *in planta* und einer erhöhten Stabilität von gereinigtem AvrBs3 (A. Sorgatz und U. Bonas; unveröffentlicht). Diese positiven Eigenschaften des N-terminal verkürzten TALE-Derivates (Δ N152) könnten die reduzierte DNA-Bindeaffinität kompensieren und somit einen effektiven Kompromiss zwischen Proteinelänge und DNA-Bindeaffinität für die Anwendung von TALEN darstellen. Zudem existieren Studien die andeuten, dass die Reduktion der DNA-Bindeaffinität von TALENs, zu einer Steigerung der DNA-Bindenspezifität führen ohne die generelle Aktivität zu beeinflussen (Guilinger *et al.* 2014). Demzufolge, können erhöhte DNA-Bindeaffinitäten auch nachteilig für die Anwendung von TALENs sein. Das derzeit effizienteste TALEN-Derivat besitzt, neben zusätzlichen

aktivitätssteigernden Substitutionen in der CTR (C55; Pro/His) und der *FokI* Nuklease-Domäne, 207 AS der NTR (Δ N71) und 63 AS der CTR (C63) (SunnyTALEN; (Sun *et al.* 2013)). Allerdings wurde der Einfluss dieser Optimierungen auf die Spezifität von TALENs nicht analysiert. In fortführenden Experimenten, könnte mittels isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) oder Fluoreszenz-Polarisations-Messung die minimale NTR mit vollständiger DNA-Bindeaffinität identifiziert und deren Verwendung in TALENs im Hinblick auf Aktivität und Spezifität analysiert werden.

4.2.2. Die C-terminale Region von AvrBs3 ist notwendig für die transkriptionelle Induktion

Die Analyse der AvrBs3-Deletionsderivate zeigte, dass der gesamte C-terminale Bereich für die vollständige Aktivität *in planta* nötig ist (Abbildung 3.1.12). Wie bereits bekannt, leistet die AD von AvrBs3 den größten Beitrag zur AvrBs3-vermittelten transkriptionellen Induktion *in planta* (AD; C248-C278; (Szurek *et al.* 2001; Marois *et al.* 2002; Geißler *et al.* 2011)). Die Deletion der AD führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität von AvrBs3 in GUS-Reporteranalysen (AvrBs3- Δ AD ca. 10 % WT-Aktivität; Abbildung 3.1.9). In dieser Arbeit analysierte C-terminalen AvrBs3-Deletionsderivate zeigten, dass die Länge der CTR bzw. die Positionierung der AD relativ zur DNA-gebundenen *repeat*-Region die Funktionalität der AD beeinflusst (Abbildung 3.1.12). Jede Deletion in der CTR hatte eine Reduktion der AvrBs3-Aktivität zufolge. Die Proteinsynthese der AvrBs3-Deletionsderivate *in planta*, mit einer CTR kleiner als 130 AS, war deutlich geringer als die *in planta* Expression aller anderen AvrBs3-Deletionsderivate (Abbildung 3.1.13). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die geringe Aktivität dieser Deletionsderivate in den geringen Proteinmengen begründet ist. Dennoch scheint die minimale CTR von 130 AS mit fusionierter NLS und AD ausreichend für die transkriptionelle Induktion durch AvrBs3 *in planta* zu sein. Die AS 1-130 der CTR könnten einen notwendigen *linker* zwischen *repeat*-Region und AD darstellen, der eine notwendige Positionierung der AD und damit verbundenen Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie gewährleistet. Eine weitere Hypothese ist, dass dieser Bereich als Interaktionsfläche für zusätzliche, funktionsrelevante Interaktionspartner dient. Hinweise auf letzteres geben Studien in denen gezeigt wurde, dass identifizierte Interaktionspartner von TALEs, die an der transkriptionellen Induktion beteiligt sein könnten, mit den *Leucine-rich repeats* (LRRs; C1-46) der CTR interagieren (Domingues *et al.* 2010; de Souza *et al.* 2012; Domingues *et al.* 2012;

Soprano *et al.* 2013). Des Weiteren konnte in einer Computer-basierten Studie (*molecular dynamics simulation*) eine stabile Interaktion zwischen dem TALE AvrXa5 und dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIA γ (V39E) (*xa5*) aus Reis simuliert werden (Dehury *et al.* 2015). Dabei wurden die AS des Bereiches C71-C87 der CTR von AvrXa5 als essentiell für die Interaktion mit *xa5* identifiziert (Dehury *et al.* 2015). Eine Interaktion zwischen der TALE-CTR und TFIIA γ könnte in Folgeexperimenten mittels GST *pull-down*, Koimmunpräzipitation *in planta* oder Hefe-Dihybrid-Studien analysiert werden.

Bisher wurde die TALE-vermittelte Transkriptionsinduktion von C-terminalen Deletionsderivaten lediglich in Humanzellen untersucht und führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Demnach besaßen TALE-Deletionsderivate mit einer Fusion der VP16 Aktivierungsdomäne an die C17- und C95-CTR vergleichbare Aktivitäten wie TALE-Derivate mit einer VP16 Fusion an die komplette CTR (Miller *et al.* 2011; Mussolino *et al.* 2011). Die natürliche AD von TALEs (TALE-AD) besitzt jedoch nur eine sehr schwache Aktivität in Humanzellen verglichen mit der VP16 AD (Geißler *et al.* 2011). Die VP16 AD weist wiederum nur eine schwache Aktivität *in planta* auf (Szurek *et al.* 2001; Marois *et al.* 2002). Dies lässt vermuten, dass sich die Wirkungsweisen der beiden ADs unterscheiden und dass sich die Aktivitätsmuster der TALE-Deletionsderivate in Humanzellen (VP16) nicht direkt mit denen *in planta* (TALE-AD) vergleichen lassen.

4.3. T₀-Koordinierung in DNA-Zielsequenzen von TALEs

Die modulare DNA-Bindedomäne von TALEs ermöglicht es beliebige DNA-Zielsequenzen zu binden. Eine Einschränkung für diese Flexibilität stellt im Allgemeinen lediglich das Thymin an Position null der DNA-Zielsequenz (T₀) dar, dessen Koordinierung vermutlich durch die Aminosäure Tryptophan an Position 232 (W232) in der NTR erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an Hand von AvrBs3 untersucht inwiefern die Aktivität von TALEs tatsächlich von T₀ abhängig ist und welche Faktoren diese Abhängigkeit beeinflussen. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die Spezifität für T₀ durch W232-Substitutionen in der NTR von AvrBs3 verändert werden kann. Die diesbezüglich an Hand von AvrBs3 generierten Daten sollten in gleicher Weise für AvrBs3-Homologe bzw. TALEs gültig sein. Zudem wurde für die Diskussion in diesem Abschnitt davon ausgegangen, dass die Aktivität der

analysierten AvrBs3- bzw. TALE-Derivate direkt mit deren DNA-Bindeaffinität korreliert. Die Berechtigung für diese Annahme stützt sich auf zwei Kernpunkten. (i) Die Korrelation zwischen DNA-Bindeaffinität und Aktivität eines TALEs konnte experimentell bestätigt werden (Meckler *et al.* 2013). (ii) Der nachweisliche Einfluss von Chromatinstatus sowie DNA-Methylierung (5meC) auf die TALE-Aktivität, kann bei der GUS-Reportergenanalyse unter der Verwendung eines artifiziellen Reporterkonstrukts (T-DNA) vernachlässigt werden (Bultmann *et al.* 2012; Valton *et al.* 2012; Kubik and Summerer 2015). Zur Interpretation der Daten wird daher angenommen, dass eine hohe TALE-Aktivität, zugleich einer hohen DNA-Bindeaffinität des TALEs entspricht.

4.3.1. T₀-Abhängigkeit und “Rep1-Effekt“ von TALEs

Nicht in jedem Fall ist das konservierte T₀ in DNA-Zielsequenzen essentiell für die vollständige Aktivität von TALEs (Abbildung 3.2.6; Abbildung 3.2.7; Abbildung 3.2.8; Abbildung 3.2.11). So zeigte sich, dass die T₀-Abhängigkeit eines TALEs von dessen RVD-Komposition beeinflusst wird und zunimmt wenn sich die *repeat*-Anzahl verringert oder RVD-Base-Fehlpaarungen auftreten (Abbildung 3.2.1; Abbildung 3.2.11; Abbildung 3.2.12). Vermutlich sind TALEs weniger T₀-abhängig, wenn diese eine höhere Aktivität (bzw. DNA-Bindeaffinität) besitzen (Abbildung 3.2.11). Die RVD-Komposition eines TALEs beeinflusst, selbst in Kombination mit einer *mismatch*-freien DNA-Zielsequenz, dessen DNA-Bindeaffinität und Aktivität (Streubel *et al.* 2012; Meckler *et al.* 2013). Demzufolge führt eine ausgeglichene RVD-Komposition zur erhöhten DNA-Bindeaffinität und somit möglicherweise gleichzeitig zu einer verringerten T₀-Abhängigkeit eines TALEs (Abbildung 3.2.11). RVD-Base-Fehlpaarungen stören die TALE-DNA-Interaktion und senken die Aktivität (bzw. DNA-Bindeaffinität) eines TALEs, wodurch wiederum die T₀-Abhängigkeit verstärkt werden könnte (Abbildung 3.2.1). Computer-basierte Simulationen (*molecular dynamics simulations*) von TALE-DNA-Komplexen geben den Anschein, dass die größte DNA-Bindeaffinität aus den Wasserstoffbrückenbindungen (eine direkte und drei H₂O-vermittelte) zwischen der Phosphatgruppe des DNA-Rückgrats und den AS 14-17 (GGKQ) jedes einzelnen *repeats* resultiert (*oxyanion clip*; (Wicky *et al.* 2013); Abbildung 1.2.4 B und C). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der *repeat*-Anzahl ebenfalls zu einer Reduktion der DNA-Bindeaffinität eines TAL-Effektors führt, was folglich wieder eine erhöhte T₀-Abhängigkeit verursacht

(Abbildung 3.2.12). Dabei stellt sich die Frage, warum AvrBs3-Derivate mit beispielsweise 13,5 oder 12,5 *repeats* höhere Aktivitäten mit T₀-Reporterkonstrukten aufwiesen als AvrBs3-Derivate mit 17,5 *repeats* (Abbildung 3.2.12). Möglicherweise bewirkt die geringere Anzahl von *repeats* eine kompaktere DNA-Bindedomäne und damit verbunden eine effektivere Zielfindung im pflanzlichen Genom. Dadurch könnte eine reduzierte DNA-Bindeaffinität zumindest in Kombination mit T₀-Reporterkonstrukten in der Summe kompensiert werden. Grundlegend scheint zu gelten, dass die Aktivität von TALEs mit hoher DNA-Bindeaffinität weniger von T₀ Abhängig ist. Der „Rep1-Effekt“ stellt eine Ausnahme dieser Regel dar und zeigt, dass T₀ an Bedeutung zunimmt sobald eine Interaktion zwischen dem RVD HD1 und der Base C₁ ausgebildet werden muss (Abbildung 3.2.8). Vergleichbares wurde für W232 gezeigt, das nicht erforderlich zu sein scheint, wenn die *repeat*-Region mit dem RVD NS1 beginnt (Abbildung 3.2.6 und Abbildung 3.2.7). Möglicherweise trägt die Interaktion zwischen T₀ und W232 zur TALE-DNA-Komplexbildung bei und kompensiert reduzierte DNA-Bindeaffinitäten eines TALEs. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Schlussfolgerung, dass es eine Hierarchie von Eigenschaften gibt, die zu einem T₀-unabhängigen TALE führen können: (i) *repeat*-Anzahl (ca. 17,5 *repeats*); (ii) RVD-Komposition (ausgeglichen, erhöhte DNA-Bindeaffinität) und (iii) Kein HD1 („Rep1-Effekt“; Abbildung 3.2.8; Abbildung 3.2.11; Abbildung 3.2.12).

4.3.2. Die Bedeutung von T₀ für natürlichen DNA-Zielsequenzen und für die biotechnologische Anwendung von TALEs

In der natürlichen Situation sind sowohl T₀ als auch W232 in DNA-Zielsequenzen bzw. TALEs konserviert und wahrscheinlich wichtig für deren Aktivität. Natürliche DNA-Zielsequenzen von TALEs enthalten in der Regel *mismatches*, wodurch die generelle DNA-Bindeaffinität gesenkt und damit die T₀-Abhängigkeit (bzw. W232-Abhängigkeit) verstärkt wird (Abbildung 3.2.1). Des Weiteren ist die Proteinmenge an TALEs in der Pflanzenzelle bei T3S-vermittelter Translokation mittels *Xanthomonas* wesentlich geringer als bei einer transienten 35S-Promotor-gesteuerten Expression. Demzufolge ist die biologische Funktion von TALEs wahrscheinlich weitgehend abhängig von W232 und T₀ in korrespondierenden DNA-Zielsequenzen. Trotzdem können Ausnahmen auftreten, in denen natürliche TALEs unter gewissen Voraussetzungen (mindestens 17,5 *repeats*; eine ausgeglichene RVD-Komposition; kein HD1) Zielgene auch T₀-unabhängig induzieren können (z.B.: TalC; (Yu *et al.* 2011)).

Einflüsse auf die T_0 -Abhängigkeit von TALEs sind allerdings beim Design und bei *off-target*-Vorhersagen artifizierender TALE-basierter DNA-Bindeproteine zu beachten. Diese sind in der Regel derart gestaltet, dass die RVD-Komposition eine *mismatch*-freie Bindung der erwünschten DNA-Zielsequenz gewährleistet. Zudem werden TALE-basierte DNA-Bindeproteine überwiegend in größeren Mengen verwendet (konstitutive Expression). Dementsprechend ist es denkbar, dass die bisher angenommene strikte T_0 -Spezifität von TALEs nicht ausnahmslos zutreffend ist und aus diesem Grund differenzierter betrachtet werden muss. Im Umkehrschluss könnte mit der gezielten Verwendung von HD-*repeats* an Position 1 der *repeat*-Region die Spezifität eines TALEs erhöht werden (gesteigerte Spezifität für T_0C_1 innerhalb der DNA-Zielsequenz). Um den Einfluss von RVDs an Position 1 auf die T_0 -Spezifität verlässlich vorhersagen zu können, müsste eine Vielzahl artifizierender TALEs diesbezüglich analysiert werden. So könnte dieser Einfluss in fortführenden Experimenten mittels SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) im großen Maßstab aufgedeckt werden (Miller *et al.* 2011; Miller *et al.* 2015).

4.3.3. W232 und T_0 unterstützen die Interaktion zwischen der *repeat*-Region und der DNA-Zielsequenz

Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen T_0 und W232 die spezifische DNA-Bindung von TALEs begünstigen. Dies führt zu dem Modell, dass die spezifische TALE-DNA-Interaktion in zwei Schritten erfolgt. Dem Suchvorgang (Scannen) durch das Gleiten des TALEs mit einer lockeren Konformation der *repeat*-Region entlang der DNA und der Bindung der spezifischen DNA-Zielsequenz unter Kompression der *repeat*-Region (Abbildung 4.3.1). Während dieses Scanvorgangs halten die *repeats* eventuell über die, durch die AS Lysin (K16) und Glutamin (Q17) geformte, positiv geladene „Rinne“ einen lockeren Kontakt zum negativ-geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat des kodierenden DNA-Strangs (Deng *et al.* 2012; Deng *et al.* 2014). Die kompakte Konformation der *repeat*-Region in DNA-gebundener Form kann wahrscheinlich erst eingenommen werden, wenn die spezifischen RVD-Base-Interaktionen diese aktiv stabilisieren (starke RVDs) und passiv durch nicht vorhandene sterische Störungen ermöglichen (schwache RVDs). In diversen Publikationen konnte dargelegt werden, dass die DNA-Bindung von TALEs in der NTR beginnt und sich von 5' nach 3' über die *repeat*-Region fortsetzt (Gao *et al.* 2012; Mali *et al.* 2013; Meckler *et al.* 2013). Dementsprechend würde die W232- T_0 -Interaktion den

ersten spezifischen Kontakt zwischen TALE und DNA-Zielsequenz darstellen, der vermutlich den folgenden *repeats* dazu verhilft in die kompakte DNA-gebundene Form überzugehen (Abbildung 4.3.1). Dieser positive Beitrag der W232-T₀-Interaktion beim Übergang vom Suchvorgang zur spezifischen DNA-Bindung scheint insbesondere erforderlich zu sein, wenn ein HD1-C₁-Kontakt ausgebildet werden muss. Eine

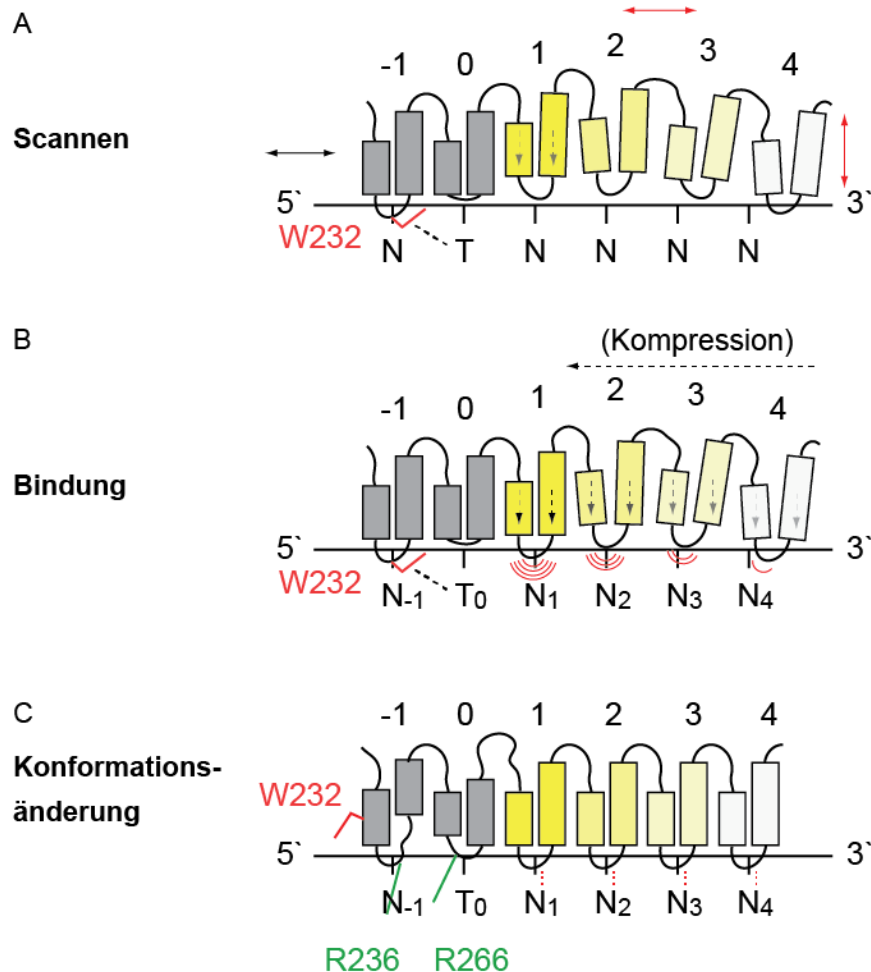


Abbildung 4.3.1: Modell der T₀-Koordinierung von TALE-Effektoren.

Die *repeats* von TALE-Effektoren sind entlang des Zucker-Phosphat-Rückgrats koordiniert. Degenerierte *repeat* (grau) und *repeats* der *repeat*-Region (gelb bzw. hellgelb) sind in den jeweiligen Abbildungen (A-C) dargestellt. **(A)** TALE-Effektoren besitzen eine generelle Affinität zu DNA. Während des Suchvorgangs verschieben sich die *repeats* lateral und vertikal aufgrund von sterischen Störungen, die durch RVDs und nicht-passenden Basen verursacht werden. Die lockere Koordinierung der *repeats* an das Zucker-Phosphat-Rückgrat des kodierenden Strangs ermöglicht es TALEs an der DNA entlangzugleiten. **(B)** Wenn die DNA-Zielsequenz erreicht ist, begünstigt die W232-T₀-Interaktion die Positionierung der ersten *repeats* und erlaubt die Ausbildung spezifischer Kontakte zwischen den RVDs und den korrespondierenden Basen. Diese spezifische Bindung ermöglicht es der *repeat*-Region zu komprimieren. Die für einen stabilen TALE-DNA-Komplex nötigen spezifischen RVD-Base-Interaktionen nehmen in ihrer Wichtigkeit von 5' nach 3' ab (gekennzeichnet durch rote Halbkreise). **(C)** Die Kompression der *repeat*-Region könnte möglicherweise zur Konformationsänderung der NTR führen, wobei R236 und R266 in die große Furche der DNA-Doppelhelix hinein exponiert werden.

mutmaßliche Erklärung dafür ist, dass die Aminogruppe des Cytosins, die vom RVD HD kontaktiert wird, eine größere Entfernung zum Zucker-Phosphat-Rückgrat aufweist als beispielsweise die Kontaktstellen N7 von Guanin bzw. Adenin oder die Methylgruppe von Thymin, die von anderen RVDs angesteuert werden (Abbildung 1.2.5; Abbildung 4.3.2). Womöglich verhilft die W232-T₀-Interaktion zu einer Positionierung des *repeat* 1, wodurch dieser näher an die Base 1 heran reicht. Weiterhin ist HD der einzige bekannte RVD der ein Wasserstoffatom von der Base akzeptiert, während andere RVDs Wasserstoffatome spenden bzw. über Van-der-Waals-Kräfte mit den Basen interagieren (Abbildung 4.3.2). Die W232-T₀-Interaktion könnte die Positionierung des RVD-loops von *repeat* 1 stabilisieren und somit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung verhelfen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der einzelne TALE-Moleküle bei der DNA-Bindung analysiert wurden (*single-molecule techniques*), führten die Beobachtungen ebenfalls zu einer zwei-Schritt-Hypothese der DNA-Bindung von TALEs (Cuculis *et al.* 2015). Weiterhin konnte ein Gleiten von TALEs entlang der DNA nachgewiesen werden (Cuculis *et al.* 2015). Wenn, wie bereits in 4.1.2 diskutiert, die Cystein-zu-Serin- bzw. Cystein-zu-

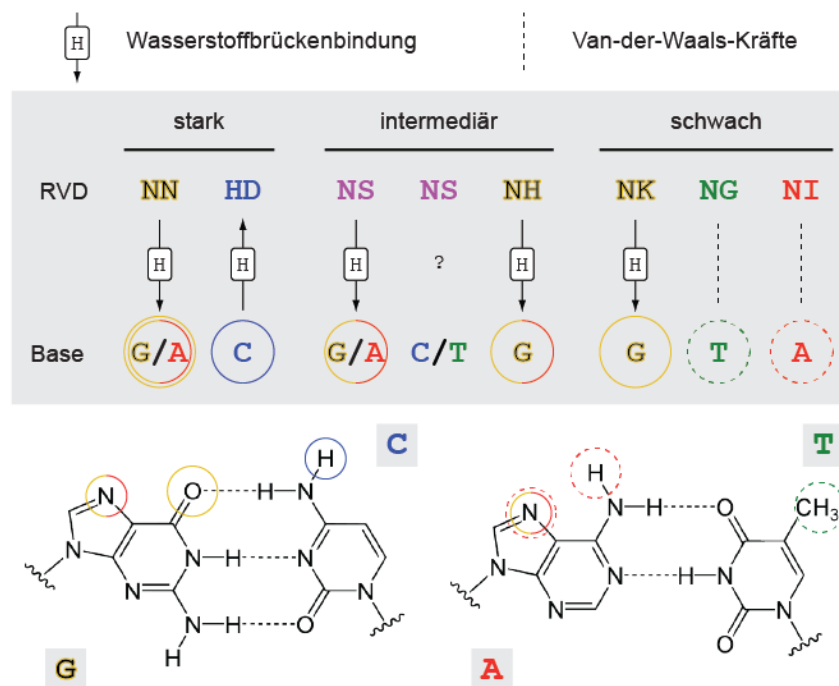


Abbildung 4.3.2: Klassifizierung, Mechanismus und Kontaktpunkte der RVD-Base-Interaktion.

Gezeigt ist die Klassifizierung der RVD-Base-Interaktion in stark, intermediär und schwach nach (Streubel *et al.* 2012). RVD-Base-Interaktionen sind entweder mit Pfeilen (für Wasserstoffbrückenbindungen) oder mit gestrichelten Linien (für Van-der-Waals-Wechselwirkungen) gekennzeichnet. Pfeilrichtungen zeigen die Orientierung zwischen Protonen-Donor und -Akzeptor. Spezifische Kontaktstellen der RVDs an den korrespondierenden Basen sind mit Kreisen dargestellt. Kreise stehen für Wasserstoffbrückenbindungen und gestrichelte Kreise für Van-der-Waals-Wechselwirkungen.

Alanin-Substitutionen in den *repeats* von AvrBs3 (AvrBs3(C30S)_{Rep} und AvrBs3(C30A)_{Rep}) die Kompressionsfähigkeit dieser Domäne aufheben, besitzen diese AvrBs3-Derivate möglicherweise lediglich die Fähigkeit zum Gleiten entlang der DNA. Eine Hypothese, die mittels *single-molecule techniques* in fortführenden Experimenten überprüft werden könnte. Die geringe Spezifität der Cystein-Substituierten AvrBs3-Derivate im 5' Bereich der UPA-Box (Abbildung 3.1.2 C) wird möglicherweise durch die W232-T₀-Interaktion gewährleistet.

4.3.4. Generierung T₀-unabhängiger TALE-NTRs

Für eine biotechnologische Anwendung der TALE-basierten DNA-Bindedomäne stellt die T₀-Spezifität eine einschränkende Bedingung dar. Diese Einschränkung konnte bereits durch evolutionär gerichtete Mutagenese des gesamten RVD-*loop*-ähnlichen Bereiches von *repeat -1* (W232 und benachbarte AS 230-234) aufgehoben werden (Lamb *et al.* 2013; Tsuji *et al.* 2013). Interessanterweise, erzielten diese Studien unterschiedliche Ergebnisse. Beispielsweise konnte eine G₀-spezifische NTR mit dem artifiziellen TAL-Effektor Avr15 (NI1; 14,5 *repeats*; *mismatch*-freies *EBE*) generiert werden (Lamb *et al.* 2013). Eine G₀-spezifische NTR wurde allerdings nicht bei der gerichteten Evolution mit dem artifiziellen TALE dHax3 (HD1; 11,5 *repeats*; *mismatch*-freies *EBE*) generiert bzw. beschrieben (Tsuji *et al.* 2013). Möglicherweise sind die geringe *repeat*-Anzahl und die Anwesenheit des RVDs HD in *repeat 1* die Gründe dafür dass unter Verwendung von dHax3 keine G₀-spezifische NTR generiert werden konnte (Tsuji *et al.* 2013). Ähnliches kann für W232-Substitutionen beobachtet werden. So wurden beispielsweise für W232-Substitutionen in AvrBs3 (HD1; 17,5 *repeats*; *mismatch*-freies *EBE*; Abbildung 3.2.2) dieselben Auswirkungen auf die N₀-Spezifität bzw. generelle Aktivität dokumentiert wie in einer unabhängigen Studie an Hand des artifiziellen TALEs dHax3 (HD1; 11,5 *repeats*; *mismatch*-freies *EBE*; (Tsuji *et al.* 2013)). In einer weiteren Studie unterschieden sich die Auswirkungen dieser W232-Substitutionen auf die T₀-Abhängigkeit bzw. Generelle Aktivität für die TALEs PthXo1 (NN1; 23,5 *repeats*; *EBE* mit 4 *mismatches*) und TAL868 (NI1; 14,5 *repeats*; *mismatch*-freies *EBE*)(Doyle *et al.* 2013a). Die NTR von TALEs fördert die Interaktion zwischen der *repeat*-Region und der DNA-Zielsequenz. Das Zusammenspiel von W232 und T₀ scheint hierbei die effizienteste Kombination zu sein, die eine Aktivität weitestgehend unabhängig von dem RVD des ersten *repeats* gewährleistet. Diese Annahme wird durch die Konservierung von W232 und T₀ in TALEs bzw. DNA-Zielsequenzen

gestützt. Insbesondere die Ausbildung einer HD1-C₁-Interaktion scheint auf W232 und T₀ angewiesen zu sein (Abbildung 3.2.6; Abbildung 3.2.7; Abbildung 3.2.8). Eine neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass eine Mutagenese-basierte Änderung der T₀-Spezifität von TALEs verschiedene RVDs in *repeat* 1 berücksichtigen muss.

4.3.5. Koordinierung von T₀ (W232 vs. R266)

Die T₀-Koordinierung von TALEs umfasst zwei voneinander abweichende Theorien, welche auf unterschiedlichen Strukturen von TALE-DNA-Komplexen basieren. Dabei handelt es sich um die Röntgen-Kristallstruktur von DNA-gebundenen PthXo1 (Mak *et al.* 2012) und DNA-gebundenen AvrBs3 (Stella *et al.* 2013). In beiden Strukturen wird die Phosphat-Gruppe von T₀ durch die *repeats* 0 und 1 koordiniert (Mak *et al.* 2012; Stella *et al.* 2013). Jedoch wird die Base (T₀) in PthXo1 von W232 (Mak *et al.* 2012) und in AvrBs3 von R266 (Stella *et al.* 2013) kontaktiert. Zusätzlich kontaktierte eine weitere Aminosäure (R236) in AvrBs3 die Base an Position -1 (ebenfalls ein Thymin). Die R266G-Substitution in AvrBs3 führte zu einer leicht verringerten Aktivität, hierbei blieb die Spezifität für T₀ allerdings unverändert (Abbildung 3.2.4). Im Gegensatz dazu bewirkten die W232-Substitution eine deutliche Reduktion der AvrBs3-Aktivität (Abbildung 3.2.2). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass W232 für die Koordinierung von T₀ verantwortlich ist. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass Änderungen der T₀-Spezifität durch die Substitution von W232 und benachbarter AS erreicht wurde (Lamb *et al.* 2013; Tsuji *et al.* 2013). TALEs wurden als sehr flexible Proteine beschrieben, deren *repeat*-Region im Zuge der DNA-Bindung eine Kompression erfahren (Murakami *et al.* 2010; Deng *et al.* 2012; Wan *et al.* 2013; Wicky *et al.* 2013; Deng *et al.* 2014). Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der alternativen Struktur der NTR von AvrBs3 (Stella *et al.* 2013) um eine stabile Konformation eines TALEs im DNA-gebundenen Zustand handelt (Abbildung 4.3.1 C). Um die Details der TALE-DNA-Interaktion zu entschlüsseln, bedarf es jedoch weiterer struktureller Analysen.

4.4. Perspektiven

Die Funktionsweise der spezifischen DNA-Bindung von TALEs ist in den letzten Jahren ausgiebig untersucht worden. Dies betrifft sowohl die Eingrenzung der DNA-Bindedomäne als auch die Ausschöpfung der DNA-Bindeeigenschaften durch die Analyse sämtlicher Aminosäurekombinationen im Bereich der RVDs (Gao *et al.* 2012; Yang *et al.* 2014; Juillerat *et al.* 2015; Miller *et al.* 2015; Schreiber *et al.* 2015). Des Weiteren wurden TALEs bereits vielseitig angewendet und werden auch in Zukunft vermehrt als Werkzeug im Rahmen von *genome editing*, Genregulation und synthetischer Biologie ihre Anwendung finden. Hierbei werden Kombinationen von TALE-basierten DNA-Bindedomänen mit funktionalen Domänen unterschiedlicher Funktion weiter optimiert. Im Gegensatz dazu ist über den Mechanismus der TALE-vermittelten Transkriptionsinitiation *in planta* relativ wenig bekannt. Bisher wurden eine Reihe von TALE-Interaktionspartnern aus Orange (*Citrus sinensis*) identifiziert, die eine Funktion bei der Proteinfaltung, mRNA-Stabilisierung, RNA-Prozessierung und DNA-Reparatur besitzen, jedoch konnte die TALE-vermittelte Transkriptionsinduktion anhand dieser Interaktionspartner nicht vollständig aufgedeckt werden (Domingues *et al.* 2010; de Souza *et al.* 2012; Domingues *et al.* 2012; Soprano *et al.* 2013). Zudem gibt es Hinweise auf die Beteiligung der generellen Transkriptionsmaschinerie bei der TALE-vermittelten Transkriptionsinduktion, diese wurden aber bisher experimentell nicht bestätigt (TFIIA γ , (Gu *et al.* 2009b)). Ein Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise von TALEs wird die Identifizierung von beteiligten Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sein. Zusätzlich zur funktionalen Analyse und Anwendung von dTALEs wird die Identifizierung neuer natürlicher Zielgene weitere Einblicke in die *Xanthomonas*-Pflanzen-Interaktion ermöglichen

5. Referenzen

Ansai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Ariga, H., Uemura, N., Takahashi, R. and Kinoshita, M. (2013). "Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases." *Genetics* **193**(3): 739-749.

Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. and Yang, B. (2010). "Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os11N3*." *Plant Cell* **22**(11): 3864-3876.

Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug, R. G., 2nd, Tan, W., Penheiter, S. G., Ma, A. C., Leung, A. Y., Fahrenkrug, S. C., Carlson, D. F., Voytas, D. F., Clark, K. J., Essner, J. J. and Ekker, S. C. (2012). "In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system." *Nature* **491**(7422): 114-118.

Blount, B. A., Weenink, T., Vasylechko, S. and Ellis, T. (2012). "Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology." *PLoS One* **7**(3): e33279.

Boch, J. and Bonas, U. (2010). "*Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function." *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 419-436.

Boch, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2014). "TAL effectors-pathogen strategies and plant resistance engineering." *New Phytol.* **204**(4): 823-832.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* **326**(5959): 1509-1512.

Bonas, U., Stall, R. E. and Staskawicz, B. (1989). "Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Mol. Gen. Genet.* **218**(1): 127-136.

Briggs, A. W., Rios, X., Chari, R., Yang, L., Zhang, F., Mali, P. and Church, G. M. (2012). "Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers." *Nucleic Acids Res.* **40**(15): e117.

Bultmann, S., Morbitzer, R., Schmidt, C. S., Thanisch, K., Spada, F., Elsaesser, J., Lahaye, T. and Leonhardt, H. (2012). "Targeted transcriptional activation of silent *oct4* pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers." *Nucleic Acids Res.* **40**(12): 5368-5377.

Büttner, D. and Bonas, U. (2010). "Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors." *FEMS Microbiol. Rev.* **34**(2): 107-133.

Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res.* **39**(12): e82.

Cernadas, R. A., Doyle, E. L., Nino-Liu, D. O., Wilkins, K. E., Bancroft, T., Wang, L., Schmidt, C. L., Caldo, R., Yang, B., White, F. F., Nettleton, D., Wise, R. P. and Bogdanove, A. J. (2014). "Code-assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene." *PLoS Pathog.* **10**(2): e1003972.

Cong, L., Zhou, R., Kuo, Y. C., Cunniff, M. and Zhang, F. (2012). "Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains." *Nat. Commun.* **3**: 968.

Cuculis, L., Abil, Z., Zhao, H. and Schroeder, C. M. (2015). "Direct observation of TALE protein dynamics reveals a two-state search mechanism." *Nat. Commun.* **6**: 7277.

Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J. E. (2014). "Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense." *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 487-511.

de Lange, O., Binder, A. and Lahaye, T. (2014). "From dead leaf, to new life: TAL effectors as tools for synthetic biology." *Plant J.* **78**(5): 753-771.

de Souza, T. A., Soprano, A. S., de Lira, N. P., Quaresma, A. J., Pauletti, B. A., Paes Leme, A. F. and Benedetti, C. E. (2012). "The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA." *PLoS One* **7**(2): e32305.

Dehury, B., Maharana, J., Sahoo, B. R., Sahu, J., Sen, P., Modi, M. K. and Barooah, M. (2015). "Molecular recognition of avirulence protein (avrxa5) by eukaryotic transcription factor xa5 of rice (*Oryza sativa* L.): insights from molecular dynamics simulations." *J. Mol. Graph. Model.* **57**: 49-61.

Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J. K., Shi, Y. and Yan, N. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* **335**(6069): 720-723.

Deng, D., Yan, C., Wu, J., Pan, X. and Yan, N. (2014). "Revisiting the TALE repeat." *Protein Cell* **5**(4): 297-306.

Dietz, K. J. (2003). "Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells." *Int. Rev. Cytol.* **228**: 141-193.

Dodds, P. N. and Rathjen, J. P. (2010). "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions." *Nat. Rev. Genet.* **11**(8): 539-548.

Domingues, M. N., Campos, B. M., de Oliveira, M. L., de Mello, U. Q. and Benedetti, C. E. (2012). "TAL effectors target the C-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) by inhibiting the prolyl-isomerase activity of a CTD-associated cyclophilin." *PLoS One* **7**(7): e41553.

Domingues, M. N., De Souza, T. A., Cernadas, R. A., de Oliveira, M. L., Docena, C., Farah, C. S. and Benedetti, C. E. (2010). "The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair." *Mol. Plant. Pathol.* **11**(5): 663-675.

Doyle, E. L., Hummel, A. W., Demorest, Z. L., Starker, C. G., Voytas, D. F., Bradley, P. and Bogdanove, A. J. (2013a). "TAL effector specificity for base 0 of the DNA target is altered in a complex, effector- and assay-dependent manner by substitutions for the tryptophan in cryptic repeat -1." *PLoS One* **8**(12): e82120.

Doyle, E. L., Stoddard, B. L., Voytas, D. F. and Bogdanove, A. J. (2013b). "TAL effectors: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins." *Trends Cell Biol.* **23**(8): 390-398.

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R. and Marillonnet, S. (2009). "Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes." *PLoS One* **4**(5): e5553.

Engler, C., Kandzia, R. and Marillonnet, S. (2008). "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability." *PLoS One* **3**(11): e3647.

Gao, H., Wu, X., Chai, J. and Han, Z. (2012). "Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region." *Cell Res.* **22**(12): 1716-1720.

Geißler, R., Scholze, H., Hahn, S., Streubel, J., Bonas, U., Behrens, S. E. and Boch, J. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* **6**(5): e19509.

Gu, K., Tian, D., Qiu, C. and Yin, Z. (2009a). "Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on OsTFIIAgamma5 for the activation of Xa27 transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *Mol. Plant Pathol.* **10**(6): 829-835.

Gu, K., Tian, D., Qiu, C. and Yin, Z. (2009b). "Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on OsTFIIAgamma5 for the activation of Xa27 transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *Mol Plant Pathol* **10**(6): 829-835.

- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G. L., White, F. F. and Yin, Z. (2005). "R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice." *Nature* **435**(7045): 1122-1125.
- Guilinger, J. P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K. and Liu, D. R. (2014). "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity." *Nat. Methods* **11**(4): 429-435.
- Gürlebeck, D., Szurek, B. and Bonas, U. (2005). "Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import." *Plant J.* **42**(2): 175-187.
- Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W. B., Yang, B., White, F. F., Wang, N. and Jones, J. B. (2014). "*Lateral organ boundaries 1* is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**(4): E521-529.
- Hummel, A. W., Doyle, E. L. and Bogdanove, A. J. (2012). "Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak." *New Phytol.* **195**(4): 883-893.
- Iyer-Pascuzzi, A. S., Jiang, H., Huang, L. and McCouch, S. R. (2008). "Genetic and functional characterization of the rice bacterial blight disease resistance gene *xa5*." *Phytopathology* **98**(3): 289-295.
- Iyer, A. S. and McCouch, S. R. (2004). "The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance." *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**(12): 1348-1354.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Juillerat, A., Pessereau, C., Dubois, G., Guyot, V., Marechal, A., Valton, J., Daboussi, F., Poirrot, L., Duclert, A. and Duchateau, P. (2015). "Optimized tuning of TALEN specificity using non-conventional RVDs." *Sci. Rep.* **5**: 8150.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." *Cell* **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kay, S., Boch, J. and Bonas, U. (2005). "Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture." *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**(8): 838-848.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U. (2007). "A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator." *Science* **318**(5850): 648-651.

- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R. and Bonas, U. (2009). "Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 Δ rep16." *Plant J.* **59**(6): 859-871.
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., Kim, S., Lee, C., Jeong, E., Chung, E., Kim, D., Lee, M. S., Go, E. M., Song, H. J., Kim, H., Cho, N., Bang, D. and Kim, J. S. (2013). "A library of TAL effector nucleases spanning the human genome." *Nat. Biotechnol.* **31**(3): 251-258.
- Knoop, V., Staskawicz, B. and 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**(22): 7142-7150.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). "The promoter of TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector." *Mol. Gen. Genet.* **204**(3): 383-396.
- Kubik, G. and Summerer, D. (2015). "Achieving single-nucleotide resolution of 5-methylcytosine detection with TALEs." *ChemBioChem* **16**(2): 228-231.
- Lamb, B. M., Mercer, A. C. and Barbas, C. F., 3rd (2013). "Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases." *Nucleic Acids Res.* **41**(21): 9779-9785.
- Li, Z., Zou, L., Ye, G., Xiong, L., Ji, Z., Zakria, M., Hong, N., Wang, G. and Chen, G. (2014). "A potential disease susceptibility gene *CsLOB* of citrus is targeted by a major virulence effector PthA of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*." *Mol. Plant* **7**(5): 912-915.
- Liu, W., Liu, J., Triplett, L., Leach, J. E. and Wang, G. L. (2014). "Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens." *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**: 213-241.
- Mak, A. N., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. and Stoddard, B. L. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." *Science* **335**(6069): 716-719.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. and Church, G. M. (2013). "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering." *Nat. Biotechnol.* **31**(9): 833-838.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2002). "The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host." *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**(7): 637-646.

- Meckler, J. F., Bhakta, M. S., Kim, M. S., Ovadia, R., Habrian, C. H., Zykovich, A., Yu, A., Lockwood, S. H., Morbitzer, R., Elsaesser, J., Lahaye, T., Segal, D. J. and Baldwin, E. P. (2013). "Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects." *Nucleic Acids Res.* **41**(7): 4118-4128.
- 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. and Rebar, E. J. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat. Biotechnol.* **29**(2): 143-148.
- Miller, J. C., Zhang, L., Xia, D. F., Campo, J. J., Ankoudinova, I. V., Guschin, D. Y., Babiarez, J. E., Meng, X., Hinkley, S. J., Lam, S. C., Paschon, D. E., Vincent, A. I., Dulay, G. P., Barlow, K. A., Shivak, D. A., Leung, E., Kim, J. D., Amora, R., Urnov, F. D., Gregory, P. D. and Rebar, E. J. (2015). "Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire." *Nat. Methods* **12**(5): 465-471.
- Morbitzer, R., Elsaesser, J., Hausner, J. and Lahaye, T. (2011). "Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning." *Nucleic Acids Res.* **39**(13): 5790-5799.
- Moscou, M. J. and Bogdanove, A. J. (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* **326**(5959): 1501.
- Murakami, M. T., Sforca, M. L., Neves, J. L., Paiva, J. H., Domingues, M. N., Pereira, A. L., Zeri, A. C. and 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**(16): 3386-3395.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T. and Cathomen, T. (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." *Nucleic Acids Res.* **39**(21): 9283-9293.
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T. and Erbs, G. (2013). "MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants." *Front. Plant Sci.* **4**: 139.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci.* **4**(11): 2411-2423.
- Pereira, A. L., Carazzolle, M. F., Abe, V. Y., de Oliveira, M. L., Domingues, M. N., Silva, J. C., Cernadas, R. A. and Benedetti, C. E. (2014). "Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response." *BMC Genomics* **15**: 157.
- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D. and Joung, J. K. (2012). "FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing." *Nat. Biotechnol.* **30**(5): 460-465.

- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. and Lahaye, T. (2007). "Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene." *Science* **318**(5850): 645-648.
- Römer, P., Recht, S., Strauss, T., Elsaesser, J., Schornack, S., Boch, J., Wang, S. and 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**(4): 1048-1057.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2009). "Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper *Bs3* alleles." *Plant Physiol.* **150**(4): 1697-1712.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Honing, K. and Hornung, V. (2013). "A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes." *Nat. Biotechnol.* **31**(1): 76-81.
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Baulcombe, D., Ganal, M., Baker, B., Bonas, U. and Lahaye, T. (2004). "The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3." *Plant J.* **37**(1): 46-60.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T. and Lahaye, T. (2006). "Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins." *J. Plant Physiol.* **163**(3): 256-272.
- Schreiber, T. and Bonas, U. (2014). "Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero." *Nucleic Acids Res.* **42**(11): 7160-7169.
- Schreiber, T., Sorgatz, A., List, F., Blüher, D., Thieme, S., Wilmanns, M. and Bonas, U. (2015). "Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3." *PLoS One* **10**(3): e0120214.
- Soprano, A. S., Abe, V. Y., Smetana, J. H. and Benedetti, C. E. (2013). "Citrus MAF1, a repressor of RNA polymerase III, binds the *Xanthomonas citri* canker elicitor PthA4 and suppresses citrus canker development." *Plant Physiol.* **163**(1): 232-242.
- Stella, S., Molina, R., Yefimenko, I., Prieto, J., Silva, G., Bertonati, C., Juillerat, A., Duchateau, P. and Montoya, G. (2013). "Structure of the AvrBs3-DNA complex provides new insights into the initial thymine-recognition mechanism." *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **69**(Pt 9): 1707-1716.

- Strauss, T., van Poecke, R. M., Strauss, A., Römer, P., Minsavage, G. V., Singh, S., Wolf, C., Kim, S., Lee, H. A., Yeom, S. I., Parniske, M., Stall, R. E., Jones, J. B., Choi, D., Prins, M. and Lahaye, T. (2012). "RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**(47): 19480-19485.
- Streubel, J., Blucher, C., Landgraf, A. and Boch, J. (2012). "TAL effector RVD specificities and efficiencies." *Nat. Biotechnol.* **30**(7): 593-595.
- Streubel, J., Pesce, C., Hutin, M., Koebnik, R., Boch, J. and Szurek, B. (2013). "Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *New Phytol.* **200**(3): 808-819.
- Sugio, A., Yang, B., Zhu, T. and White, F. F. (2007). "Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIA γ 1* and *OsTFX1* during bacterial blight of rice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(25): 10720-10725.
- Sun, N., Bao, Z., Xiong, X. and Zhao, H. (2013). "SunnyTALEN: a second-generation TALEN system for human genome editing." *Biotechnol. Bioeng.* **111**(4): 683-691.
- Sun, N., Liang, J., Abil, Z. and Zhao, H. (2012). "Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease." *Mol. Biosyst.* **8**(4): 1255-1263.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A. and Bonas, U. (2010). "Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase." *New Phytol.* **187**(4): 1058-1074.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. and Van den Ackerveken, G. (2001). "Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper." *Plant J.* **26**(5): 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. and Bonas, U. (2002). "Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell." *Mol. Microbiol.* **46**(1): 13-23.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. and Dong, X. (2008). "Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins." *Science* **321**(5891): 952-956.
- Tian, D., Wang, J., Zeng, X., Gu, K., Qiu, C., Yang, X., Zhou, Z., Goh, M., Luo, Y., Murata-Hori, M., White, F. F. and Yin, Z. (2014). "The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum." *Plant Cell* **26**(1): 497-515.

- Tsuji, S., Futaki, S. and Imanishi, M. (2013). "Creating a TALE protein with unbiased 5'-T binding." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**(1): 262-265.
- Valton, J., Dupuy, A., Daboussi, F., Thomas, S., Marechal, A., Macmaster, R., Melliand, K., Juillerat, A. and Duchateau, P. (2012). "Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation." *J. Biol. Chem.* **287**(46): 38427-38432.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U. (1996). "Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell." *Cell* **87**(7): 1307-1316.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. and Schell, J. (1974). "Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability." *Nature* **252**(5479): 169-170.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." *Plant J.* **33**(5): 949-956.
- Wan, H., Hu, J. P., Li, K. S., Tian, X. H. and Chang, S. (2013). "Molecular dynamics simulations of DNA-free and DNA-bound TAL effectors." *PLoS One* **8**(10): e76045.
- Wang, C., Zhang, X., Fan, Y., Gao, Y., Zhu, Q., Zheng, C., Qin, T., Li, Y., Che, J., Zhang, M., Yang, B., Liu, Y. and Zhao, K. (2014). "XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice." *Mol. Plant* **8**(2): 290-302.
- Weber, E., Gruetzner, R., Werner, S., Engler, C. and Marillonnet, S. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." *PLoS One* **6**(5): e19722.
- Wicky, B. I., Stenta, M. and Dal Peraro, M. (2013). "TAL effectors specificity stems from negative discrimination." *PLoS One* **8**(11): e80261.
- Yang, B., Sugio, A. and White, F. F. (2006). "Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(27): 10503-10508.
- Yang, J., Zhang, Y., Yuan, P., Zhou, Y., Cai, C., Ren, Q., Wen, D., Chu, C., Qi, H. and Wei, W. (2014). "Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition." *Cell Res.* **24**(5): 628-631.
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., Feng, J., Verdier, V. and 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**(9): 1102-1113.

Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C. and 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 Cell Physiol* **50**(5): 947-955.

Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C. and Wang, S. (2010). "The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution." *Plant Cell* **22**(9): 3164-3176.

Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G. M. and Arlotta, P. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." *Nat Biotechnol* **29**(2): 149-153.

Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J. S., Huang, S., Liu, S., Vera Cruz, C., Frommer, W. B., White, F. F. and Yang, B. (2015). "Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice." *Plant J* **82**(4): 632-643.

Zipfel, C. (2008). "Pattern-recognition receptors in plant innate immunity." *Curr Opin Immunol* **20**(1): 10-16.

Zipfel, C. (2014). "Plant pattern-recognition receptors." *Trends Immunol* **35**(7): 345-351.

6. Publikationen

de Lange, O., **Schreiber, T.**, Schandry, N., Radeck, J., Braun, K. H., Koszinowski, J., Heuer, H., Strauß, A. and Lahaye, T. (2013). "Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease." *New Phytol*, **199**(3): 773–786.

Schreiber, T. and Bonas U. (2014). "Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero." *Nucleic Acids Res.* **42**(11): 7160-7169.

Schreiber, T., Sorgatz, A., List, F., Blüher, D., Thieme, S., Wilmanns, M. and Bonas, U. (2015). "Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3." *PLoS One* **10**(3): e0120214

7. Anhang

7.1. HR-Phänotypen der Cystein-Substituierten AvrBs3-Derivate

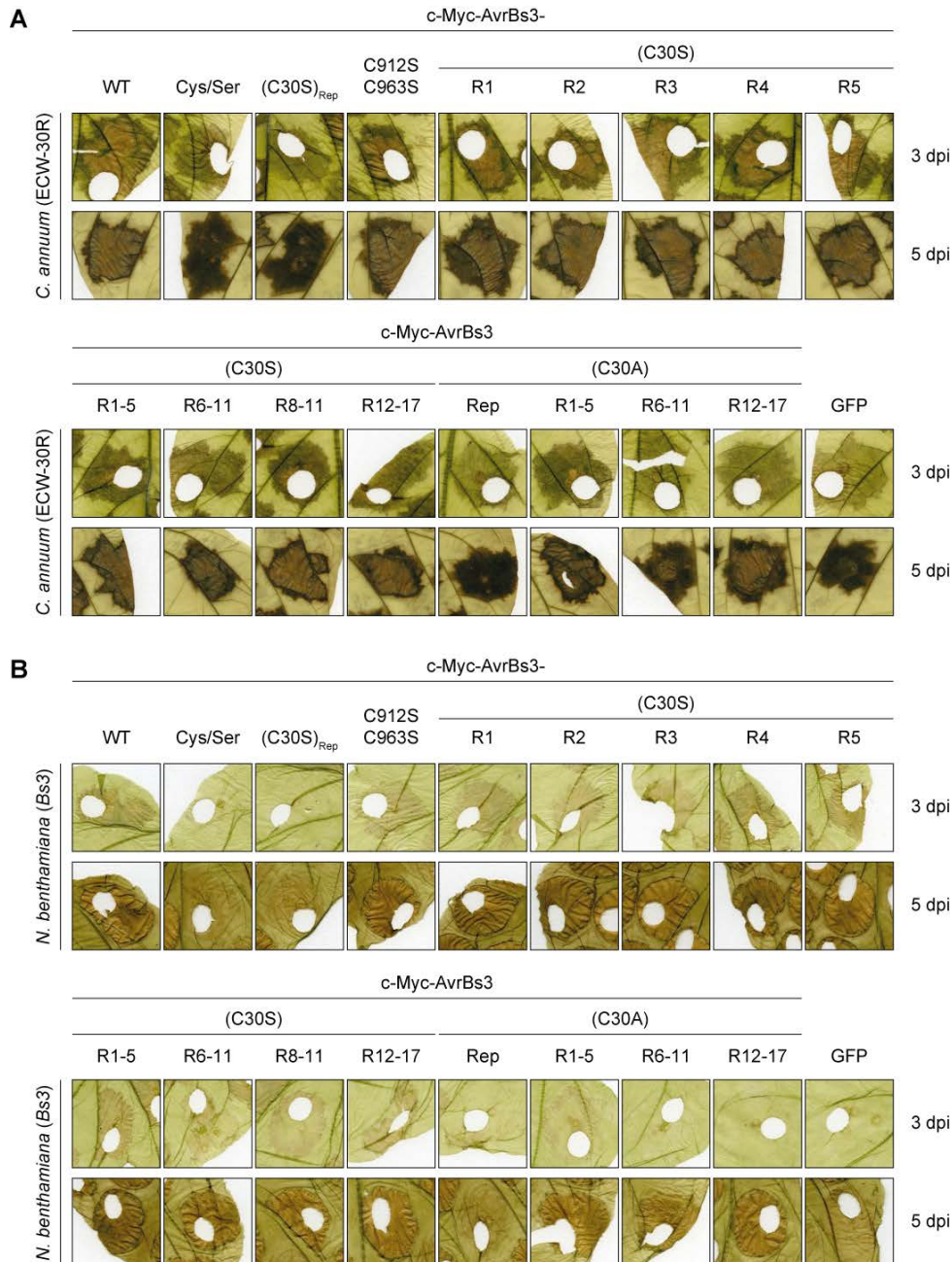


Abbildung 7.1.1: Die Cysteine in den repeats sind essentiell für die AvrBs3-vermittelte Induktion der hypersensitiven Reaktion (HR).

Agrobacterium-vermittelte transiente Expression von *avrBs3*-Mutanten in *C. annuum* (ECW-30R) (**A**) und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana* (**B**). AvrBs3(WT) und GFP dienen als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle. Blätter wurden drei bzw. fünf Tage nach Inokulation geerntet (3 dpi, 5 dpi) und zur besseren Visualisierung der HR in Ethanol gebleicht. Löcher entstanden durch Blattmaterial-Entnahme für den Proteinsynthesenachweis in Abbildung 3.1.3 C. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

7.2. HR-Phänotypen der N- und C-terminalen AvrBs3-Deletionsderivate

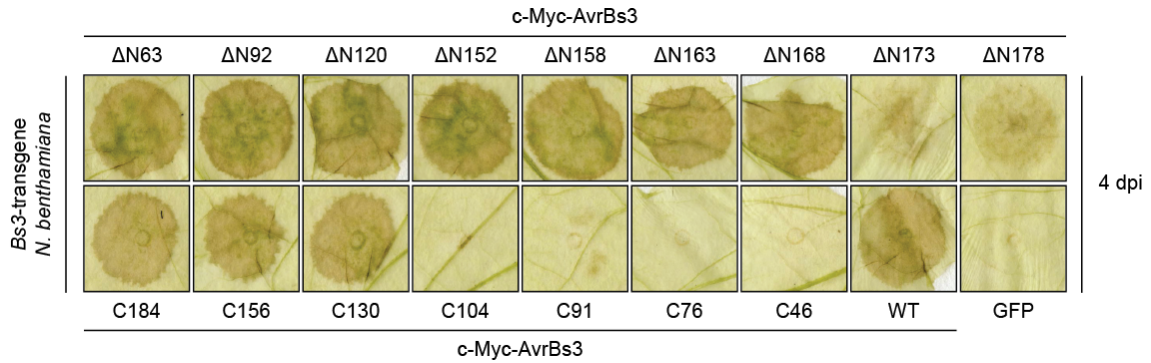


Abbildung 7.2.1: HR-Phänotypen der AvrBs3-Deletionsderivate

Agrobacterium-vermittelte transiente Expression von *avrBs3*-deletionsmutanten in *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*. *AvrBs3*(WT) und GFP dienten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle. Blätter wurden vier Tage nach Inokulation geerntet (4 dpi) und zur besseren Visualisierung der HR in Ethanol gebleicht. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

7.3. Alignment CsTDX und CaTDX

CsTDX	1	-MSDS----VKHFEAMKSN-----LSTED-----
CaTDX	1	MMDDDKLEDLKHFVHLCKNDPSILKPSLSFFRNFLFESLGARIPSPVVKSEKGEEHLDE
Konsensus	1	mM D kledvKHF m Ndpsillkpslsffrnflfleslgarippspl tE geeehldE
CsTDX	20	-DDDIVESDIELNDTDMEPDNDPSQKMGDPSVEVTEEMRDAANMTKLKAVDLISEGKLE
CaTDX	61	LDEDIIESDVELDDTDTVEPDNDPQQMGDSSSEVTDENRDAAQISKAKALDAISEGKLN
Konsensus	61	LDdDIvESDiELD TD mEPDNDP Q MGD S EVTeE RDAAnmtK KAvD ISEGL
CsTDX	79	DAIGQLTEAImLNPTSAILYAARAGVYVKLNKPNAAIRDAYVALETNPDSAKGYKIRGMA
CaTDX	121	EAINHLTEAImLNPSAAILYATRANVFVKLKKPNAAIRDADAALKVNPDPAKGYKVRGMA
Konsensus	121	dAI LTEAImLNpTsAILYA RA VyVKL KPNAAIRDA AL NPDSAKGYKiRGMA
CsTDX	139	RARLGQWEAANDLHVASKLDYDEEIGMALKKVEPNARRIQEHRKRYERLRKERELKNFE
CaTDX	181	RAMLGLWKEAASDLRIASMDIDEDEIAETLKKVEPNAHKIEEHCRKYRRLREEKRLKIE
Konsensus	181	RA LG W EAA DLhvAS lDyDEEIG LKKVEPNarrI EH RRY RLR Er Lk E
CsTDX	199	RERQRKQAGA-----DREALSGLRDGQVMGIHSASEFETKLNAAATR
CaTDX	241	HDRKRRQAEAKAAYEKSKKKEQQSEHEASDPASASDSNEGKIVGIHSSVELETKLNAAASA
Konsensus	241	reR RkQA AkaayekskkkekqqseheasD e S dG vmGIHS SE ETKLNAAAT
CsTDX	240	ALRLVILYFTATWCGPCRFISPLFTNLASKYTKVVFVKVDIDEARDVATRWNIGSVPTFF
CaTDX	301	ASRLAILYFTATWCGPCRFISPLFTSLPGKYPKVAFLKADIDEARDVASRWNVSSVPAFF
Konsensus	301	A RL ILYFTATWCGPCRFISP fT L KY KV FLK DIDEARDVATRWNi SVP FF
CsTDX	300	FIKNGKEVDKVVGADKSALEKRIAQAAGQ
CaTDX	361	FIKDGKEVDKVVGADKNSLEKRIAQYGG-
Konsensus	361	FIK GKEVDkVVGADK LERKIAQ aGq

aktives Zentrum

7.4. Alignment NTR AvrBs3 und TalC

TalC	1	MDPIRPRAPSPAREVLPGPQPD	RVQPTADRGVSA	PAGS	PLDGLPARRTMSRTRLPSPPAP
AvrBs3	1	MDPIRSRTSPAREVLPGPQPD	GVQPTADRGVSP	PAGG	PLDGLPARRTMSRTRLPSPPAP
Konsensus	1	MDPIR R PSPAREVLPGPQPD	VQPTADRGVS	PAG	PLDGLPARRTMSRTRLPSPPAP
<hr/>					
TalC	61	LPAFSAGSFSDLLRQFDPSL	LDTSLFDSMEAVG	TPHTEAAPAE	GDEVQSaLRAADDPPPT
AvrBs3	61	SPAFSAGSFSDLLRQFDPSL	FNFTSLFDSL	EPFGAHHTEAAT	GEWDEVQSGLRAADAPPPT
Konsensus	61	PAFSAGSFSDLLRQFDPSL	TSLFDSmP	G HTEAA	aE DEVQSaLRAAD PPPT
<hr/>					
TalC	121	VRVAVTAA-----	QVDLRTLGY	SQQQ	-EKIKPNVRSTVAQHH
AvrBs3	121	MRVAVTAARPPRAKPAPRRRAA	QPSDASPAAQVDLRTLGY	SQQQQE	EKIKPKVRSTVAQHH
Konsensus	121	VRVAVTAARpprakpapr	rrraaqpsdas	paaQVDLRTLGY	SQQQqEKIKP VRSTVAQHH
					repeat -3
<hr/>					
TalC	157	EALVGHGFTHAHIVALSR	HPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHE	D	IVGVGKQCSGARALEA
AvrBs3	181	EALVGHGFTHAHIVALSQ	HPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHE	A	IVGVGKQWSGARALEA
Konsensus	181	EALVGHGFTHAHIVAL	SPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHE		IVGVGKQ SGARALEA
		repeat -2			repeat -1
<hr/>					
TalC	217	LLTVAGELRGPPLQLDTGQL	VKIAKRGGVTAVEAVHAS	RNALTGAPLNLT	PAQVVAIASN
AvrBs3	241	LLTVAGELRGPPLQLDTGQL	LKIAKRGGVTAVEAVHAW	RNALTGAPLNLT	PEQVVAIASH
Konsensus	241	LLTVAGELRGPPLQLDTGQL	VKIAKRGGVTAVEAVHA	RNALTGAPLNLT	P QVVAIAS
		repeat 0			repeat 1
<hr/>					
TalC	277	SGGKQALETVQRLLPVLCQAHG			298
AvrBs3	301	DGGKQALETVQRLLPVLCQAHG			322
Konsensus	301	GKGQALETVQRLLPVLCQAHG			

7.6. AvrBs3 GG-Module

7.6.1. Komplette kodierende Sequenz von *avrBs3*

TATGGATCCCATTCGTTTCGCGCACACCAAGTCCTGCCCGGAGCTTCTGCCCGGACCCCAACCCGATGGGGTTTCAGCC
GACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGGCCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGGGCGGACGATGTCCCGGAC
CCGGCTGCCATCTCCCCCTGCCCCCTCACCTGCGTTCCTCGGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTCAGTTCGATCC
GTCACTTTTTAATACATCGCTTTTGGATTTCATTGCCTCCCTTCGGCGCTCACCATACAGAGGCTGCCACAGGCGAGTG
GGATGAGGTGCAATCGGGTCTGCGGGCAGCCGACCCCCCACCACCATGCGCGTGGCTGTCACTGCCCGCGCGCC
GCCGCGCGCAAGCCGGCGCCGCGACGACGTGTGCGCAACCCTCCGACGCTTCGCCCGGCCGCGCAGGTGGATCTACG
CAGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGC
ACTGGTTCGGCCATAGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCCGCTGT
CAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGAGCGATCGTTGGCGTCCGGCAAACAGTGGTCCGG
CGCAGCGCTCTGGAGGCCCTTGTCAAGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTTCCACCCTTACAGTTGGACACAGGCCAACT
TCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGCGGTGACCGCAGTGGAGGCGATGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCC
CCT**GAACT**GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCG
GCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAA
GCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGC
CATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGG
CCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTT
GCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGC
GCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGC
CAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGAC
CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGT
GCTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA
GACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCA
CGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCA
GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTG
CCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGG
TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGT
GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGC
CCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCG
GCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAA
GCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGC
CATCGCCAGCAATGGCGGGCGGAGGCCGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCATGG
CCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGCTGTT
GCCGGTGTGTGCCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGGCGGAGGCCGGC
GCTGGAG**AGCA**TTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTT
GGCCTGCCTCGGCGGACGTCTGCGCTGGATGCAGTGA AAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAAGAAC
CAATCGCCGATTTCCGAACGCACATCCCATCGCTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGTGGTTTTTTTCCA
GTGCCACTCCACCCAGCGCAAGCATTGATGACGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGCACGGGTTGTTACAGCT
CTTTCGAGAGTGGGCGTACCCGAACTCGAAGCCCGCAGTGGAAACGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCGTAT
CCTCCAGGCATCAGGGATGAAAAGGGCCAAACCGTCCCCTACTTCAACTCAAACGCCGATCAGGCGTCTTTGCATGC
AT**TCGC**CGATTTCGCTGGAGCGTACCTTGATGCGCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCAGACGCGGGCAAGCAGCCG
TAAACGGTCCCGATCGGATCGTGTGTCACCGTCCCTCCGCACAGCAATCGTTCGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCG
CGATGCGCTGCATTTGCCCTCAGTTGGAGGGTAAAAAGCCCGGTACCAGTATCGGGGGCGGCTCCCGGATCTTGG
TACGCCACGCGTGGCGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTATGCGGGAACAAGATGAGGACCCCTTCGACGGGCGAGC
GGATGATTTCCCGCATTCAACGAAGAGGAGCTCGCATGGTTGATGGAGCTATTGCCTCAG**TGAAGCTT**

repeat-Region

GG-Überhänge

Kodierende Sequenz *avrBs3*

7.6.2. Module der verkürzten NTR

GG-Überhänge

BsaI-site

ΔN63

TTTGGTCTCATATGCGGTTCTCGGCGGGCAGCTTCAGTGACCTGTTACGTTCAGTTCGATCCGTCACTTTTTAATACAT
CGCTTTTTGATTCATTGCCTCCCTTCGGCGCTCACCATACAGAGGCTGCCACAGGCGAGTGGGATGAGGTGCAATCCG
GTCTGCGGGCAGCCGACGCCCCCACCACCATGCGCGTGGCTGTCACTGCCGCGCGGCCGCCGCGCCCAAGCCGG
CGCCGCGACGAGTGTGCGCAACCCTCCGACGCTTCGCCGCGCGCGCAGGTGGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCC
AGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTTCGGCCATGGGT
TTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGA
TCGACGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGG
CCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAAC
GTGGCGCGCTGACCCGAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAAGTGGAGCCAAA

ΔN92

TTTGGTCTCATATGTTTCGGCGCTCACCATACAGAGGCTGCCACAGGCGAGTGGGATGAGGTGCAATCGGGTCTGCGGG
CAGCCGACGCCCCCACCACCATGCGCGTGGCTGTCACTGCCGCGCGGCCGCCGCGCCCAAGCCGGCGCCGCGAC
GACGTGCTGCGCAACCCTCCGACGCTTCGCCGCGCGCGCAGGTGGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAAC
AGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTTCGGCCATGGGTTCACACAG
CGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGT
TGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCA
CGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGGC
TGACCCGAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAAGTGGAGCCAAA

ΔN120

TTTGGTCTCATATGACCATGCGCGTGGCTGTCACTGCCGCGCGGCCGCCGCGCCCAAGCCGGCGCCGCGACGACGTG
CTGCGCAACCCTCCGACGCTTCGCCGCGCGCGCAGGTGGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGA
AGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTTCGGCCATGGGTTCACACGCGCACA
TCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAG
AGCGCACACAGGAGCGATCGTTGGCGTTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGG
CGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGGCTGACCC
CAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAAGTGGAGCCAAA

ΔN152

TTTGGTCTCATATGTTGGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTT
CGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTTCGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACC
CGCAGCGTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCG
TTGGCGTTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCAC
CGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGGCTGACCCGAGTGGAGGCAGTGCATGCAT
GGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAAGTGGAGCCAAA

ΔN158

TTTGGTCTCATATGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGC
ACCACGAGGCACTGGTTCGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGA
CCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTTCGGCAAAC
AGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACA
CAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGGCTGACCCGAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGA
CGGGTCCCCCTGAAGTGGAGCCAAA

ΔN163

TTTGGTCTCATATGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACCTGG
TCGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGT
ATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCAC
GCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCA
AGATTGCAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGA
ACTGAGACAAA

ΔN168

TTTGGTCTCATATGCATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCATGGGTTTA
CACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG
CAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCT
TGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAACGTG
CGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACGAGACAAA

ΔN173

TTTGGTCTCATATGCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCG
TTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGG
CGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGG
GAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAACGTGGCGGCGTGACCGCAG
TGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACGAGACAAA

ΔN178

TTTGGTCTCATATGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCATGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAAC
ACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGCGA
TCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGT
CACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATG
CATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACGAGACAAA

7.6.3. Module der verkürzten CTR

C46

TTTGGTCTCAGCATTTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATGAGACC
AAA

C76

TTTGGTCTCAGCATTTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAG
AACCAATCGCCGATTCCCGAACGCACATCCCATCGGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTCGCGTGCTGGGTTTTTT
CCAGTTCGCTGAGACAAA

Anhang

C91

TTTGGTCTCAAGCAATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAAG
AACCAATCGCCGATTCCCGAACGCACATCCCATCGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTTCGCGTGCTGGGTTTTTT
CCAGTGCCACTCCACCCAGCGCAAGCATTGATGACGCCATGACGCAGTTTCGCTGAGACCAAA

C104

TTTGGTCTCAAGCAATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAAG
AACCAATCGCCGATTCCCGAACGCACATCCCATCGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTTCGCGTGCTGGGTTTTTT
CCAGTGCCACTCCACCCAGCGCAAGCATTGATGACGCCATGACGCAGTTTCGGGATGAGCAGGCACGGGTTGTTACA
GCTCTTTTCGCTTCGCTGAGACCAAA

C130

TTTGGTCTCAAGCAATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAAG
AACCAATCGCCGATTCCCGAACGCACATCCCATCGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTTCGCGTGCTGGGTTTTTT
CCAGTGCCACTCCACCCAGCGCAAGCATTGATGACGCCATGACGCAGTTTCGGGATGAGCAGGCACGGGTTGTTACA
GCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGAGTGGAACGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCG
TATCCTCCAGTTTCGCTGAGACCAAA

CTR2-C194

TTTGGTCTCAATCGCGATTTCGCTGGAGCGTGACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCAGACGCGGGCA
AGCAGCCGTAACGGTCCCAGATCGGATCGTGCTGTACCCGGTCCCTCCGCAAGTGTGAGACCAAA

CTR1-C156

TTTGGTCTCAAGCAATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC
CTTGGCCTGCCTCGGCGGACGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGCCGCACGCGCCGGCCTTGATCAAAAG
AACCAATCGCCGATTCCCGAACGCACATCCCATCGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGTTTCGCGTGCTGGGTTTTTT
CCAGTGCCACTCCACCCAGCGCAAGCATTGATGACGCCATGACGCAGTTTCGGGATGAGCAGGCACGGGTTGTTACA
GCTCTTTTCGAGAGTGGGCGTCACCGAACTCGAAGCCCGAGTGGAACGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGGACCG
TATCCTCCAGGCATCAGGGATGAAAAGGGCCAAACCGTCCCTACTTCAACTCAAACGCCGGATCAGGCGTCTTTGCA
TGCATTCGCTGAGACCAAA

CTR2ΔAD

TTTGGTCTCAATCGCGATTTCGCTGGAGCGTGACCTTGATGCGCCTAGCCCAATGCACGAGGGAGATCAGACGCGGGCA
AGCAGCCGTAACGGTCCCAGATCGGATCGTGCTGTACCCGGTCCCTCCGACAGCAATCGTTTCGAGGTGCGGTTCCC
GAACAGCGGATCGCTGCATTTGCCCTCAGTTGGAGGGTAAAACGCCCGGTACCAGTATCGGGGGCGGCCTCCC
GATCCTGGTACGCCACGGCTGCCGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGCGGTGAAGCTTTGAGACCAAA

SV40-NLS(für C46)

TTTGGTCTCTTTGAATTGCGGAATTAATTCCCGAGCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTCTGAATTGGGTACCGCCGGTGA
GAGACAAA

SV40-NLS(für C76-C156)

TTTGGTCTCTTCGCGGAATTAATTCCCGAGCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTCTGAATTGGGTACCGCCGGTGA
GAGACAAA

AD-Modul

TTTGGTCTCAAGTGAACAAGATGAGGACCCCTTCGCAGGGGCAGCGGATGATTTCCCGCATTCAACGAAGAGGAGCT
CGCATGGTTGATGGAGCTATTGCCTCAGTGAAGCTTAGAGACCTTT

7.6.4. GG-Module für die *avrBs3* repeat-Region

repeat-repeat

RVDs

6-repeat-Block-Überhang (BsaI)

einzel-repeat-Überhang (BpiI)

TGC - Cysteine (TCC - Serin; GCC - Alanin)

GAACCTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT
GTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGCTATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA
GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCAT
CGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCT
GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCC
GGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCT
GGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG
CAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG
GGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCT
GTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCTATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC
GGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGA
TGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCA
GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGC
GGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGC
GGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGTGG
CAAGCAGGCGCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGT
GGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCA
TGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCTATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCT
GTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA
GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT
CGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCAGGCCATGGCCT
GAGCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCC
GGTGCTGTGCAGGCCATGCCTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGCGCT
GGAGAGCA

7.7. Reporterkonstrukte

EBE_{AvrBs3}

N₀/N₁

Mismatches

CDS *uidA*

pGWB3 : pUPA20 - *EBE_{AvrBs3}* - *pBs4_{min}*

CACC**N**ATATAAACCTGACCCT**TT**TTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCCAAAATATCATCAATTGATCTCA
TCCATACAATTTATTTTTAATCGAATCTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT
CGATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG... CDS *uidA*

pGWB3 : *EBE_{AvrBs3}* - *pBs4_{min}*

CACC**NN**TATAAACCTGACCCTCTTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCCAAAATATCATCAATTGATCTCA
TCCATACAATTTATTTTTAATCGAATCTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT
CGATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG... CDS *uidA*

pGWB3 : *EBE_{ARTrep18-1}* - *pBs4_{min}*

CACC**N**CACACACCATAAGGGC**AT**TTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCCAAAATATCATCAATTGATCTCA
TCCATACAATTTATTTTTAATCGAATCTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT
CGATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG... CDS *uidA*

pGWB3 : *EBE_{ARTrep18-2}* - *pBs4_{min}*

CACC**N**CATGTGTGCCTTTTC**AT**TTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCCAAAATATCATCAATTGATCTCA
TCCATACAATTTATTTTTAATCGAATCTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT
CGATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG... CDS *uidA*

pGWB3 : *EBE_{ARTrep18-3}* - *pBs4_{min}*

CACC**N**ACACCCAAAC**AT**TTTCTTTCTTGTATATAACTTTGTCCAAAATATCATCAATTGATCTCATCCATA
CAATTTATTTTTAATCGAATCTAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTTCGATCT
AGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG... CDS *uidA*

Danksagung

Ulla, bei Ihnen bedanke ich mich für die Aufnahme in Ihrer Arbeitsgruppe. Ich danke Ihnen für das in mich gesetzte Vertrauen, die mir gegebenen Freiheiten, für Ihr Verständnis, Ihre Förderung und dafür, dass Sie mich stets zu Höchstleistungen angespornt haben. Weiterhin möchte ich mich bei Ihnen, Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel und Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Erstellung der Gutachten bedanken.

Jens, Dir danke ich für die vielen Hilfestellungen, die spannenden und teils lautstarken wissenschaftlichen Diskussionen im Büro sowie die geteilte Begeisterung für TALEs.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir im Laufe meiner Doktorarbeit geholfen haben. Besonders dankbar bin ich Robert, Heike, Johannes, Cornelius, Oli, Jana, Anika, Jule und Doreen für die Unterstützung bei technischen, theoretischen, praktischen und alltäglichen Problemen. Für die gemeinsame Bewältigung des täglichen Wahnsinns danke ich den 212-Insassen Anika, Heike, Anne, Tina, Caro, Chantal, Karo, Doreen und Marina. Es hat Spaß gemacht an eurer Seite zu arbeiten. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG-Bonas für die Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich danke auch Bianca, Carola, Marina und Hannelore ohne deren Hilfe an reibungsloses Arbeiten nicht zu denken gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.

Jana, ich danke Dir für die Geduld und Kraft die du mir während meiner Doktorarbeit entgegengebracht hast. Du warst mir eine große Stütze und hast mir vieles leichter gemacht.

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, den 19.06.2015

Lebenslauf

Name: Tom Schreiber
Anschrift: Paracelsustraße 2b in 06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 16.10.1981
Geburtsort: Cottbus
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1988 - 1994 Grundschule in Cottbus

1994 - 2001 Ludwig-Leichhardt-Gymnasium in Cottbus
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

2001 - 2003 Freiwillig länger dienende Wehrpflicht (FWDL); PzGrenBtl 52
Rotenburg an der Fulda (Juni - Dezember 2002 SFOR in Bosnien und
Herzegowina)

2003 - 2009 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2008 - 2009 Diplomarbeit im Fachbereich Genetik am Institut für Biologie der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg mit dem Thema: "Molekulare Charakterisierung von AvrBs3-
Homologen aus *Ralstonia Solanacearum*"
Abschluss: Diplom-Biologe

2010 - 2015 Promotionsarbeit im Fachbereich Genetik am Institut für Biologie der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg