

1. Einleitung

1.1. Pflanzliche Resistenzmechanismen

Pflanzen sind ständig Mikroorganismen ausgesetzt. Die Fähigkeit, Pathogene zu detektieren und sich davor zu schützen, ist deshalb ein lebensnotwendiger Mechanismus. Die Resistenz von Pflanzen gegen die meisten potentiell phytopathogenen Mikroorganismen, wird als Spezies- oder Nichtwirtsresistenz bezeichnet. Dieses, auch als Basisresistenz bezeichnete Prinzip, ist die vorherrschende Form der pflanzlichen Krankheitsresistenz und beschreibt allgemein die Unfähigkeit eines Mikroorganismus, Pflanzenarten zu besiedeln (Heath, 2000). Teil der Nichtwirtsresistenz sind membranständige Rezeptoren, die typische Pathogen-assoziierte Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie z. B. Flagellin erkennen (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2004). Dies führt zur Abwehr der Mehrzahl aller Mikroorganismen, bevor diese Zugang zum Wirtszellinneren erlangen (Abb. 1A).

Phytopathogene Bakterien können jedoch die PAMP-basierte Erkennung verhindern, z. B. durch Modifikation ihrer PAMPs (Gómez-Gómez *et al.*, 1999) oder durch Typ-III-Sekretion von Effektor-Proteinen ins Wirtszitoplasma (Nürnberger *et al.*, 2004). Typ-III-sekretierte Effektoren können mit den Mechanismen der Nichtwirtsresistenz interferieren und eine Abwehrreaktion einschränken (Abb. 1B, Abramovitch *et al.*, 2006; Janjusevic *et al.*, 2006). Einige Pflanzen-Kultivare besitzen wiederum Mechanismen, um Effektor-Proteine (auch bezeichnet als Avirulenz-Proteine, Avr) zu detektieren und eine Effektor-induzierte Resistenz auszulösen (Abb. 1C, Keen, 1990). Diese kultivarspezifische Erkennung von Pathogenen ist vom Effektor-kodierenden *Avr*-Gen und von einem korrespondierenden pflanzlichen Resistenz- (*R*-) Gen abhängig (Gen-für-Gen-Hypothese, Flor, 1942). Ein typisches Kennzeichen von Resistenzreaktionen ist die damit einhergehende hypersensitive Reaktion (HR, Greenberg 2005), ein schneller, lokaler Zelltod des infizierten Gewebes (Klement, 1963; Lam und Blumwald, 2002; van Doorn und Woltering, 2005). Weitere Merkmale sind die Anreicherung reaktiver Sauerstoff-Spezies (*oxidative burst*, Lam *et al.*, 2001) bzw. Stickstoff-Monoxid (Wendehenne *et al.*, 2004), Kallose-Ablagerungen, transkriptionelle Genaktivierung (Dixon und Harrison, 1990) und Phytoalexin-Akummulierung (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Greenberg und Yao, 2004). Außerdem können Pflanzen eine systemische Resistenz ausbilden (*systemic acquired resistance*, Durrant und Dong, 2004).

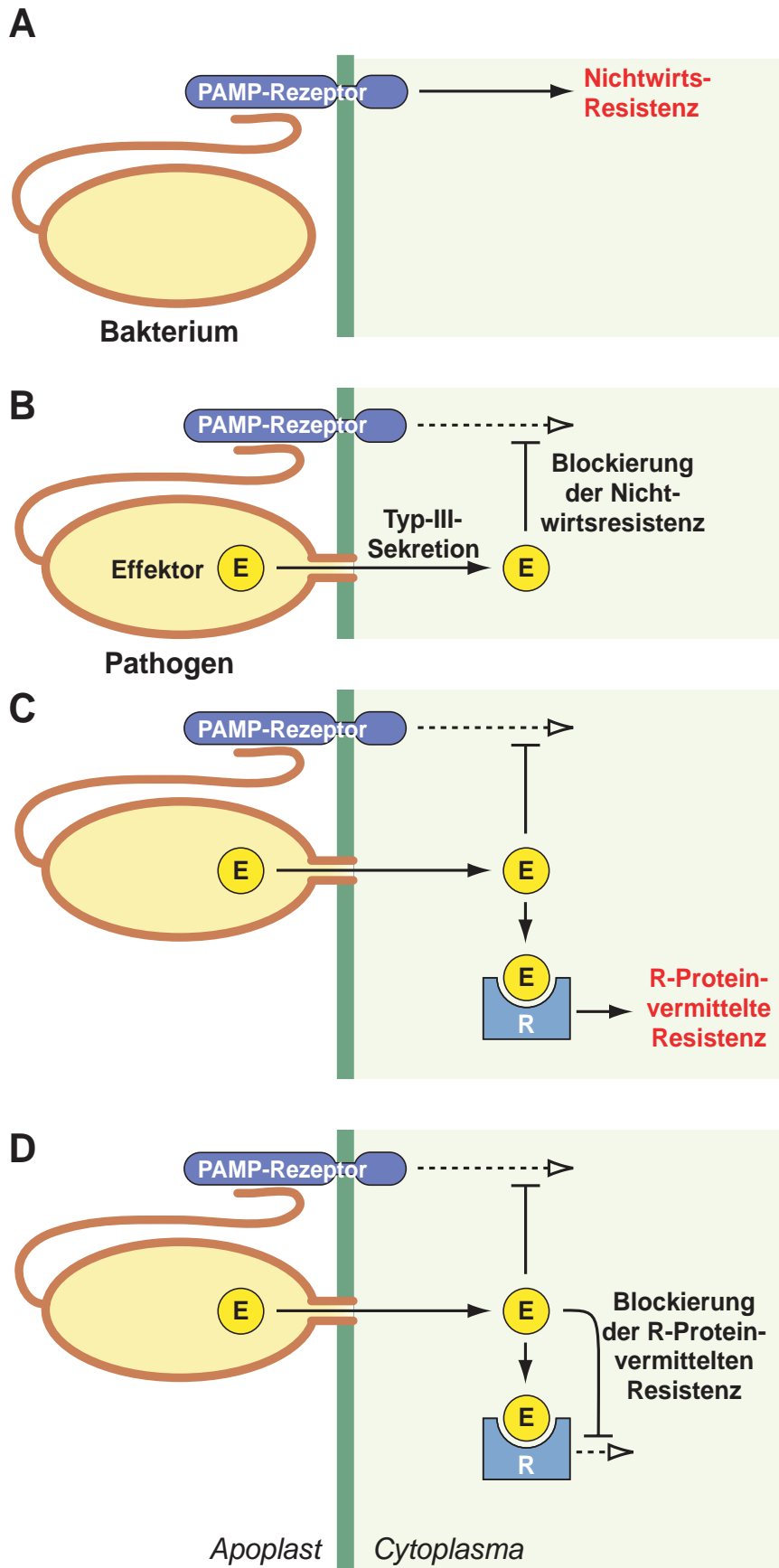


Abb. 1. Modell der Anpassung von bakteriellen Pathogenen an pflanzliche Resistenzmechanismen. (A) Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs, z. B. Flagellin) induzieren die Nichtwirtsresistenz. (B) Bakterielle Effektor-Proteine unterbinden die Nichtwirtsresistenz. (C) R-Proteine vermitteln Erkennung einzelner Effektor-Proteine. (D) Andere Effektor-Proteine verhindern die Auslösung einer Resistenz (R)-Protein-vermittelten Resistenzreaktion.

Einige bakterielle Effektor-Proteine blockieren die Ausbildung der HR. Bakterien besitzen dadurch weitere spezielle Anpassungsmechanismen zur Überwindung der pflanzlichen Resistenz (Abb. 1D, siehe z.B Jamir *et al.*, 2004).

1.2. Pflanzen-Pathogen-Interaktionen

Die Erforschung der Interaktionen zwischen Pathogen und Pflanze begann mit ökonomisch relevanten Wirtspflanzen und deren Pathogenen. Die ersten Untersuchungen beschrieben die Resistenz von Weizen gegen Weizenrost (Biffen, 1905). Untersuchungen an Flachs und Flachsrost führten zur Formulierung der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1971). Aufgrund der Zugänglichkeit gegenüber molekularen Techniken wurden das erste *avr*-Gen aus Bakterien isoliert (Staskawicz *et al.*, 1984). Die spätere Isolierung von *avr*-Genen (*avrPto*, Ronald *et al.*, 1992) und korrespondierenden *R*-Genen (*Pto*, Martin *et al.*, 1993) bestätigte die Gen-für-Gen-Hypothese. Aktuell sind bereits für alle Pathogen-Klassen (Viren, Bakterien, Pilze, Oomyceten, Nematoden und Insekten) *R*-Gene isoliert wurden (Bent *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Whitham *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1997; Milligan *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1998). Dagegen sind korrespondierende Avr-Proteine bisher nur aus Viren, Bakterien, Pilzen und Oomyceten bekannt.

Die Analyse von *R*-Genen zeigte, dass zwei Grundprinzipien der Pathogen-Perzeption durch R-Proteine existieren. Membranständige R-Proteine vermitteln die extrazelluläre Erkennung (z. B. Avr2 und Cf2, Rooney *et al.*, 2005). Die für die Mehrzahl der R-Proteine vorhergesagte intrazelluläre Lokalisation weist aber darauf hin, dass der Transfer von Avr-Proteinen in die Pflanzenzelle die Basis vieler Resistenzreaktionen ist (Bonas und Lahaye, 2002). Dieser Transfer kann bei phytopathogenen Bakterien z. B. über ein Typ-III-Sekretionssystem erfolgen (Hueck, 1998). Für pathogene Pilze und Oomyceten ist dagegen bisher nicht bekannt, wie die vom Pathogen meistens sekretierten Proteine ins Wirtszellinnere gelangen (Ellis *et al.*, 2006). Die HR-Induktion nach Expression von Avr-Proteinen in Zellen resistenter Pflanzen bestätigte jedoch die Hypothese der intrazellulären Erkennung (Van der Hoorn *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006).

1.3. Das bakterielle Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Das 1921 nahezu gleichzeitig in Südafrika (Doidge, 1921) und Amerika (Gardner und Kendrick, 1921) aus Tomaten isolierte Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) (Dye, 1978) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit von Paprika und

Tomate (Abb. 2A,B) und besonders ertragsschädigend in feuchten warmen Klimaten. *Xcv* dringt über Spaltöffnungen und Verwundungen ins Blatt ein und vermehrt sich im Apoplasten in anfälligen (suszeptiblen) Pflanzen. Im Gegensatz zu anderen *Xanthomonas*-Spezies (z.B. *X. campestris* pv. *campestris*) verbreitet sich *Xcv* nicht systemisch in der Pflanze, sondern bleibt auf die lokale Infektionsstelle begrenzt. Makroskopisch werden wässrige Läsionen (*watersoaked lesions*, WS, Abb. 2B,D) sichtbar, die später nekrotische Flecken auf Blättern und Früchten bilden (Abb. 2A,B). Dagegen zeigen resistente Kultivare keine sichtbaren Symptome. Bei Infiltration hoher *Xcv*-Titer kommt es jedoch zu einer HR des inokulierten Gewebeabschnitts innerhalb von zwei Tagen (Abb. 2C, Laborphänotyp).

Notwendig für die Ausprägung der Krankheitssymptome und auch für die Auslösung der HR ist ein durch die *Xanthomonas hrp*-Gene (hypersensitive Reaktion und Pathogenität) kodiertes Typ-III-Sekretionssystem, welches bakterielle Effektor-Proteine direkt ins Cytoplasma der Wirtszelle transloziert (Hueck, 1998; Büttner und Bonas, 2006)

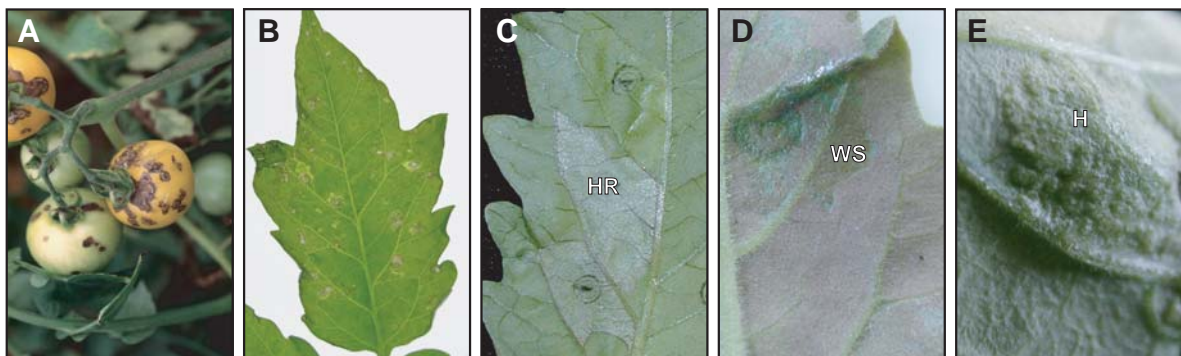


Abb. 2. Phänotypen der *Xanthomonas*-Tomate-Interaktion. Bakterielle Fleckenkrankheit auf Früchten (A) und Blättern (B). Laborphänotyp auf resistenten (C) und suszeptiblen (D) Tomaten-Kultivaren 72 h p.i., Hypersensitive Reaktion nach Infiltration eines avirulenten Stammes (HR) und beginnende wässrige Läsionen (WS) nach Infiltration eines virulenten Stammes. Hypertrophie (H) nach Infiltration eines AvrBs3-exprimierenden *Xcv*-Stammes in Tomate (E). Abb.2A reproduziert von <http://plaza.ufl.edu/jbjones/joneslab>

1.4. Die AvrBs3-Effektor-Familie

AvrBs3-ähnliche Proteine repräsentieren eine nach ihrem ersten Vertreter benannte Familie von bakteriellen Effektoren, die sich durch eine hohe Aminosäure (AS)-Sequenzidentität auszeichnen (Schornack *et al.*, 2006; Abb. 3A). Gene, die für Proteine dieses Typs kodieren, wurden bislang ausschliesslich in Xanthomonaden nachgewiesen, mit Ausnahme von *brg11* aus *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004). Zwei bereits gut charakterisierte Vertreter aus *Xcv* sind *avrBs3* und *avrBs4* (vormals *avrBs3-2*) (Bonas *et al.*, 1989; Bonas *et al.*, 1993). Weitere Sequenz-Homologe

von *avrBs3* wurden aus *X. campestris pv. armoraciae* isoliert (*hax2*, *hax3* und *hax4*, Abb. 3B, Kay *et al.*, 2005).

Im C-Terminus tragen alle von *avrBs3*-homologen Genen abgeleitete Proteine typische Motive eukaryotischer Transkriptionsaktivatoren, nukleäre Lokalisierungssignale (NLS), sowie eine saure Aktivierungsdomäne (AD, (Abb. 3A, Yang und Gabriel, 1995; Lahaye und Bonas, 2001). NLS-Sequenzen dirigieren AvrBs3 nach Typ-III-Sekretion Importin α -vermittelt in den Zellkern der Pflanze (Szurek *et al.*, 2002). Über die AD induziert AvrBs3 die Transkription von Genen, welche zur Ausbildung von phänotypisch sichtbarer

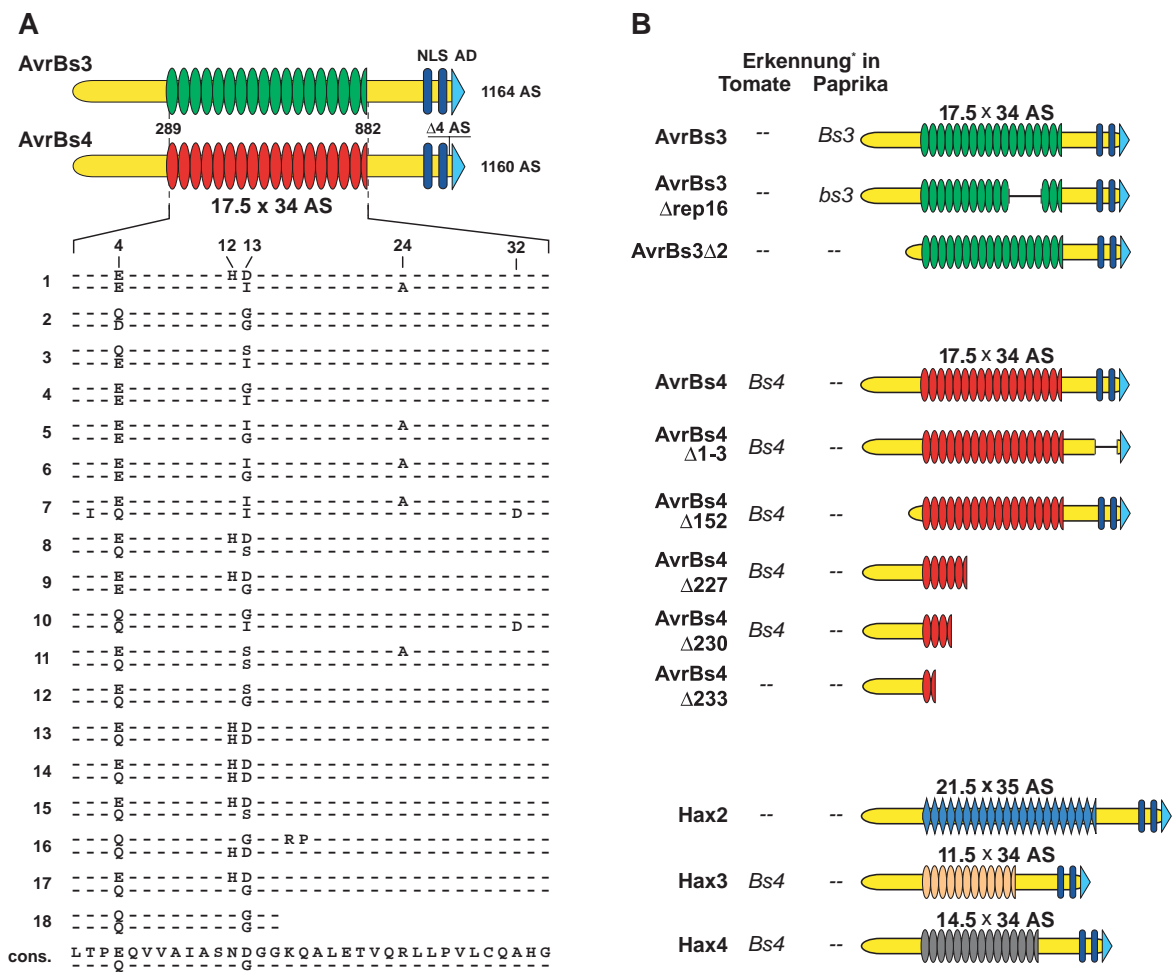


Abb. 3. Struktur AvrBs3-ähnlicher Proteine (A) Struktur- und Sequenzvergleich von AvrBs3 und AvrBs4. Beide Proteine sind zu 97% identisch in ihrer AS-Sequenz. Die zentrale Region besteht aus 17,5 nahezu identischen Repeats. Unterschiede befinden sich bis auf eine Deletion von 4 AS-Resten ($\Delta 4$ AS) ausschließlich in der Repeat-Region. AS-Unterschiede zwischen den nummerierten Repeats von AvrBs3 (jeweils obere Zeile) und AvrBs4 (jeweils untere Zeile) und innerhalb aller Repeats sind dargestellt. Die letzten beiden Zeilen enthalten die Konsensussequenz aller AvrBs3- bzw. AvrBs4-Einzelrepeats. -, identische AS-Reste, NLS, Kernlokalisierungssignale; AD, saure Aktivierungsdomäne (aus Schornack *et al.*, 2006, modifiziert). **(B)** Struktur relevanter AvrBs3-ähnliche Proteine (siehe Tabelle 1 für Referenzen) und von Deletionsderivaten. * Die R-Gen-Spezifität von *Xcv*-translozierten AvrBs3-ähnlichen Proteinen ist angegeben.

Symptome beitragen können (Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). Infiltriert man AvrBs3-exprimierende Xanthomonaden in Blätter susceptibler Paprika-, bzw. Tomaten-Pflanzen, so reagiert das infiltrierte Gewebe mit einer Hypertrophie des abaxialen Mesophylls (Abb. 2, Marois *et al.*, 2002). Andere AvrBs3-ähnliche Proteine induzieren ebenfalls Symptome in anfälligen Pflanzen, die auf unterschiedliche Weise zur Virulenz beitragen (z.B. Hyperplasie, verstärkte Aggressivität, verstärktes bakterielles Wachstum, ein Überblick findet sich bei Gürlebeck *et al.*, 2006). Für AvrBs4 konnte verbessertes bakterielles Wachstum, verbesserte Transmission und Läsionsbildung bisher nur unter Feldbedingungen, jedoch nicht im Labor nachgewiesen werden (Wichmann und Bergelson, 2004). In der Regel sind für die beobachteten Symptome C-terminale NLS und AD notwendig (Marois *et al.*, 2002). Ob dies auch für AvrBs4 zutrifft, wurde bisher nicht geprüft.

Weiterhin kennzeichnend für alle AvrBs3-ähnlichen Proteine ist eine zentrale Region von 5,5 (Avrxa5, Liang *et al.*, 2004) bis 28,5 (PthXo3, Yang und White, 2004) direkten, nahezu sequenzidentischen Wiederholungen aus je 34, oder seltener 35 AS-Resten (Brg11, Cunnac *et al.*, 2004 und Hax2), von denen einzelne hypervariabel sind (Abb. 3A,B). Analysen von AvrBs3-ähnlichen Proteinen mit Unterschieden ausschließlich in der Repeat-Region belegen eine Abhängigkeit des Spektrums induzierter pflanzlicher Gene von diesem Proteinabschnitt (Marois *et al.*, 2002). Für AvrXa7 wurde außerdem eine nicht spezifische DNA-Affinität nachgewiesen (Yang *et al.*, 2000). Deshalb könnte diese Region eine Bindung des Avr-Proteins an DNA-Abschnitte vermitteln.

1.5. AvrBs3-ähnliche Proteine als Avirulenzdeterminanten

Xcv-Stämme, die AvrBs3-ähnliche Proteine exprimieren, induzieren in resistenten Pflanzenlinien eine *R*-Gen-abhängige HR. Notwendig dafür ist ein N-terminal lokalisiertes Typ-III-Sekretionssignal. Die Deletion dieser Region (z.B. AvrBs3 Δ 2 und AvrBs4 Δ 152, Abb. 3B) führt zum Verlust der Erkennung in resistenten Pflanzen, weil das Avr-Protein nicht mehr in die Wirtszelle transloziert wird (Szurek *et al.*, 2001; Szurek *et al.*, 2002). AvrBs3 wird in Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) erkannt, die das korrespondierende *Bs3*-Resistenzgen tragen (Pierre *et al.*, 2000). Das 97% identische AvrBs4 induziert dagegen eine *Bs4*-vermittelte HR in Tomate (Abb. 3B, Ballvora *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist, dass bei *Xcv*-vermittelter Translokation keine Kreuzreaktion auftritt, d. h. *Xcv* (*avrBs3*) induziert keine *Bs4*-HR und *Xcv* (*avrBs4*) keine HR in *Bs3*-Paprika

(Schornack *et al.*, 2005). Da sich AvrBs3 und AvrBs4 bis auf vier AS-Reste nur im Bereich der Repeat-Region unterscheiden, muss dort die Spezifität der Avr-Aktivität liegen (Bonas *et al.*, 1993). Interessanterweise wird ein im Bereich der Repeat-Region deletiertes AvrBs3 Δ rep16-Derivat in *bs3*-, aber nicht in *Bs3*-Paprika erkannt (Abb. 3B, Herbers *et al.*, 1992). Die Repeat-Region von AvrBs3-ähnlichen Proteinen definiert also nicht nur die Ausbildung von Symptomen, sondern die Avr-Aktivität (Herbers *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998; White *et al.*, 2000).

Die AvrBs3-Repeats vermitteln, ähnlich wie Transkriptionsregulatoren, eine Dimerisierung. Dies deutet auf eine transkriptionelle Regulation von Pflanzen-Genen hin, die in kompatible und inkompatible Interaktionen involviert sind (Gürlebeck *et al.*, 2005). In Übereinstimmung mit ihrer Avr-Aktivität durch Transkriptionsaktivierung im Zellkern wurde für Vertreter der AvrBs3-Familie eine NLS-Abhängigkeit der HR-Induktion gezeigt (Szurek *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2005).

Eine Ausnahme von dieser NLS-Abhängigkeit der HR-Induktion ist das AvrBs3-ähnliche Protein AvrBs4. Die funktionsbasierte Suche nach *Xanthomonas*-Genen, die für eine HR in Tomate notwendig sind, identifizierte *avrBsP*, das für ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zur N-terminalen Hälfte von AvrBs3 kodiert (Canteros *et al.*, 1991). Allerdings war *avrBsP* kürzer als *avrBs3* und kodierte nicht für die C-terminalen NLS und AD-Motive. Später stellte sich heraus, dass *avrBsP* ein sequenzidentisches Fragment von *avrBs4* war. Da AvrBs4 auch ohne NLS und AD in Tomate erkannt wird (Bonas *et al.*, 1993), besitzt

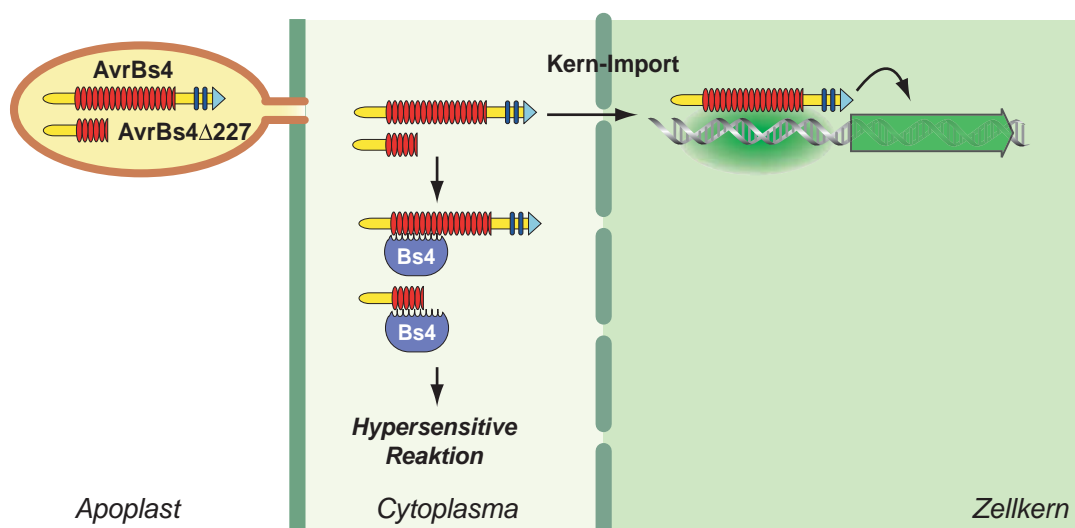


Abb. 4. Effekte von AvrBs4 in resistenten Pflanzen. (A) AvrBs4 wird nach Translokation durch das Typ-III-System ins Wirtscytoplasma wahrscheinlich Importin α -vermittelt in den Zellkern transportiert, wo es in Analogie zu anderen AvrBs3-ähnlichen Proteinen die Wirtsgen-Transkription beeinflusst. AvrBs4 und AvrBs4-Derivate ohne NLS und AD (AvrBs4 Δ 227) induzieren wahrscheinlich im Cytoplasma eine *Bs4*-vermittelte HR.

Tomate eine Erkennung im Cytoplasma, die von der anderer AvrBs3-ähnlichen Proteine abweicht (Abb. 4, Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001). Die Identifizierung des zugrunde liegenden *R*-Gens führte zur Isolierung von *Bs4*.

1.6. Resistenzgene gegen AvrBs3-ähnliche Proteine

Trotz der Kenntnis von mehr als 40 *avrBs3*-ähnlichen Genen aus *Xanthomonas* und *Ralstonia*, ist nur für elf ein korrespondierender *R*-Gen (-Lokus) in Pflanzen bekannt. Insgesamt sind bisher vier *R*-Gene (*Bs4*, *xa5*, *xa13* und *Xa27*) isoliert und charakterisiert worden (Tabelle 1). Obwohl alle die Erkennung eines spezifischen AvrBs3-ähnlichen Proteins vermitteln, kodieren sie für Proteine ohne Ähnlichkeit zueinander (Schornack *et al.*, 2006). *Xa27* aus Reis hat nur im Reis-Genom sequenzverwandte Gene und kodiert für ein Protein ohne Homologie zu bekannten Proteinen.

Tabelle 1. Pflanzliche Resistenzgene, die die Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine vermitteln.

R-Gen	Referenzen^a	Avr-Protein	Repeat-Anzahl	Pathogen^b	Referenz^c
Paprika					
<i>Bs3</i>	(Pierre <i>et al.</i> , 2000)	AvrBs3	17,5	<i>Xcv</i>	(Bonas <i>et al.</i> , 1989)
Tomate					
<i>Bs4</i>	(Ballvora <i>et al.</i> , 2001), (Schornack <i>et al.</i> , 2004)*	AvrBs4	17,5	<i>Xcv</i>	(Bonas <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bs4</i>		Hax3	11,5	<i>Xca</i>	(Kay <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bs4</i>		Hax4	14,5	<i>Xca</i>	(Kay <i>et al.</i> , 2005)
Reis					
<i>Xa3</i>	(Ezuka <i>et al.</i> , 1975; Ogawa, 1986 #5400; Yoshimura <i>et al.</i> , 1992)	AvrXa3	8,5	<i>Xoo</i>	(Li <i>et al.</i> , 2004; Lee <i>et al.</i> , 2005)
<i>xa5</i>	(Blair <i>et al.</i> , 2003; Iyer und McCouch, 2004)*, (Zhong <i>et al.</i> , 2003)	Avrxa5	5,5	<i>Xoo</i>	(Hopkins <i>et al.</i> , 1992; Bai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Xa7</i>	(Sidhu <i>et al.</i> , 1978; Porter <i>et al.</i> , 2003)	AvrXa7	25,5	<i>Xoo</i>	(Hopkins <i>et al.</i> , 1992; Vera Cruz <i>et al.</i> , 2000)
<i>Xa10</i>	(Yoshimura <i>et al.</i> , 1983; Yoshimura <i>et al.</i> , 1995; Xinghua <i>et al.</i> , 1996)	AvrXa10	15,5	<i>Xoo</i>	(Hopkins <i>et al.</i> , 1992; Zhu <i>et al.</i> , 1998)
<i>xa13</i> (<i>Os8N3</i>)	(Chu <i>et al.</i> , 2006)*, (Yang <i>et al.</i> , 2006)*	PthXo1	23,5	<i>Xoo</i>	(Yang und White, 2004)
<i>Xa27</i>	(Gu <i>et al.</i> , 2005)*	AvrXa27	16,5	<i>Xoo</i>	(Gu <i>et al.</i> , 2005)
Baumwolle					
<i>B1</i>	(Gabriel <i>et al.</i> , 1986; De Feyter <i>et al.</i> , 1993)	Avrb6	13,5	<i>Xcm</i>	(De Feyter und Gabriel, 1991; De Feyter <i>et al.</i> , 1993)

^a) Referenzen, die die genetische Kartierung und Isolierung (markiert durch *) von *R*-Genen beschreiben

^b) *Xcv*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*; *Xca*, *X. campestris* pv. *armoraciae*; *Xoo*, *X. oryzae* pv. *oryzae*; *Xcm*, *X. campestris* pv. *malvacearum*

^c) Referenzen, die die Isolierung und Charakterisierung der korrespondierenden *avr*-Gene beschreiben.

Unterschiede zwischen resistentem und suszeptiblem Allel liegen besonders im Promotorbereich. *Avrxa27* aus *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) induziert nur die Expression des *Xa27*-Allels aus resistenten Pflanzen (Gu *et al.*, 2005).

Bei der *xa13* (*Os8N3*)-vermittelten Resistenz erfolgt dagegen eine für das bakterielle Wachstum notwendige transkriptionelle Induktion des suszeptiblen *Xa13*-Allels durch *PthXo1* (entspricht *Avrxa13*) aus *Xoo*. Sequenzunterschiede im *xa13*-Promoter verhindern eine *xa13*-Aktivierung in resistenten Pflanzen (Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Als Untereinheit des Präinitiationskomplexes ist das von *xa5* kodierte Protein an der Regulation der Transkription in Reis beteiligt. Obwohl der Resistenzmechanismus noch ungeklärt ist, wird vermutet, dass *Avrxa5* aus *Xoo* durch Interaktion mit *xa5* die Transkription krankheitsfördernder Gene beeinflusst (Iyer und McCouch, 2004).

1.7. Das Resistenzgen *Bs4* aus Tomate kodiert für ein TIR-NB-LRR-Protein

AvrBs4-exprimierende *Xcv*-Stämme induzieren eine Resistenzreaktion in nahezu allen daraufhin untersuchten *Lycopersicon*-Linien (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001). Die Identifizierung phänotypisch abweichender, suszeptibler Linien ist jedoch zum Aufbau einer Kreuzungspopulation für eine kartengestützte Klonierung notwendig. Nur *L. pennellii* LA2963 zeigte einen von der schnellen HR abweichenden Phänotyp. *AvrBs4*-exprimierende *Xcv*-Stämme induzierten zwar auch hier eine nekroseähnliche Reaktion, diese war aber zeitlich verzögert (Schornack *et al.*, 2005). Dieser differenzielle Phänotyp bildete die Basis für die Isolierung des in Anlehnung an andere *Xcv*-Resistenzgene (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*, Hibberd *et al.*, 1987) als *Bs4* bezeichneten *R*-Gens aus Tomate (Ballvora *et al.*, 2001). *Bs4* kodiert für ein NB-LRR-Protein mit 54%-Sequenzidentität zum N-Protein aus Tabak (Whitham *et al.*, 1994) bzw. 57% zu Y-1 aus Kartoffel (Vidal *et al.*, 2002). Beide homologen Proteine vermitteln aber keine Resistenz gegen bakterielle *AvrBs3*-ähnliche Proteine, sondern gegen Viren. DNA-Hybridisierungen identifizierten neben *Bs4* keine weiteren hoch homologen Sequenzen im Tomaten-Genom (Schornack *et al.*, 2004).

Die *Bs4*-Erkennungsspezifität wurde durch Infiltration von *Xcv*-Stämmen mit verschiedenen *AvrBs4*-Derivaten in Tomate getestet. Nur *Xcv* (*avrBs4*) bzw. dessen NLS/AD-Deletionsderivat (*AvrBs4*Δ227, Abb. 3B), aber nicht *avrBs3*-exprimierende Xanthomonaden lösten eine HR aus. *AvrBs4*-Deletionsstudien zeigten, dass ein Derivat mit 3,5 Repeats (*AvrBs4*Δ230, Abb. 3B) noch eine HR induziert. Eine weitere Verkürzung

auf 1,5 Einzelrepeats (AvrBs4 Δ 233, Abb. 3B) führt zum Verlust der *Bs4*-spezifischen Erkennung (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001; Schornack *et al.*, 2004). Die Funktionalität von *Bs4* konnte auch durch *Agrobacterium*-vermittelte Koexpression mit *avrBs4*-Derivaten in *Nicotiana benthamiana* gezeigt werden, da auch in dieser Pflanze eine *Bs4*-HR induziert wurde (Schornack *et al.*, 2004).

Das TIR-NB-LRR-Protein *Bs4* gehört zur großen Familie intrazellulärer NB-LRR-Proteine mit zentraler Nukleotid-Bindestelle (NB) und C-terminalen Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (*leucine-rich repeats*, LRR; Abb. 5).

Innerhalb dieser Klasse wird aufgrund der unterschiedlichen N-Termini zwischen TIR-NB-LRR-Proteinen (enthalten einen TOLL/Interleukin-1 Rezeptor-ähnlichen N-Terminus) und NB-LRR-Proteinen ohne konservierte N-terminale Domäne unterschieden, die oft einen Leucin-Zipper oder eine putative *coiled-coil* (CC) Struktur tragen. Beide NB-LRR-Klassen lassen sich zusätzlich anhand spezifischer AS-Reste in der NB-Domäne unterscheiden (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000; Young, 2000).

Die zwischen Tieren und Pflanzen konservierte **TIR-Domäne** interagiert beim Toll-Protein aus *Drosophila* und bei Toll-ähnlichen Rezeptoren der Säugetiere mit Proteinen der Signalkaskade. Aufgrund der Konservierung in TIR-NB-LRR-Proteinen wird auch in Pflanzen eine Rolle bei der Signalweiterleitung angenommen. Interessanterweise ist die Funktion nahezu aller TIR-NB-LRR Proteine abhängig von *EDS1* (*enhanced disease susceptibility*), einem ursprünglich aus *Arabidopsis* isolierten Lipase-ähnlichen Protein (Falk *et al.*, 1999). Dagegen zeigen CC-NB-LRR Proteine keine generelle *EDS1*-

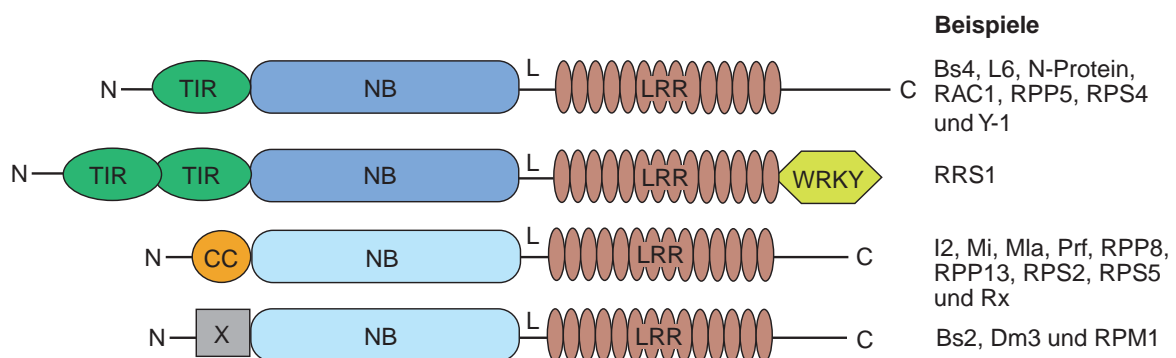


Abb. 5. Domänen-Struktur von NB-LRR-Proteinen. Beispiele für jede Strukturklasse sind rechts aufgeführt. *Bs4*, I2, Mi, und Prf aus Tomate; L6 aus Flachs; N aus Tabak; RAC1, RPP5, RPS4, RRS1, RPP8, RPP13, RPS2, RPS5 und RPM1 aus *Arabidopsis*; Y-1 und Rx aus Kartoffel; Mla aus Gerste; Dm3 aus Salat; *Bs2* aus Paprika. N, Amino-Terminus; TIR, Toll/interleukin-1 Rezeptor-ähnliche Domäne; CC, *Coiled-coil*-Domäne; X, Domäne ohne eindeutiges CC-Motiv; NB, Nukleotid-Bindestelle; L, Linker; LRR, Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine-rich repeats*); WRKY, Zink-Finger Transkriptionsfaktor-verwandte Domäne mit WRKY-AS-Motiv; C, Carboxyl-Terminus. (aus McHale *et al.*, 2006, modifiziert).

Abhängigkeit (Aarts *et al.*, 1998). Die TIR-Domäne könnte aber auch in die Erkennung des korrespondierenden Avr-Proteins involviert sein (Luck *et al.*, 2000). Das bei Bs4 und zahlreichen anderen TIR-NB-LRR-Proteinen vorhandene N-terminale Alanin-Polyserin-Motiv könnte eine Rolle bei der Protein-Stabilität spielen (Meyers *et al.*, 2003).

Die **NB-Domäne** enthält konservierte Motive: eine N-terminale AAA+ATPase (*extended ATPase with a variety of activities*, Neuwald *et al.*, 1999) und eine sich anschließende APAF-, R-Protein- und CED4-homologe Region (ARC, Van der Biezen und Jones, 1998a). Mutationen im konservierten ATPase-Motiv P-Loop führen zum Funktionsverlust (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Bendahmane *et al.*, 2002). Weiterhin weist die gesamte NB-Domäne Homologie zu STAND-ATPasen (*signal transduction ATPases with numerous domains*) auf, zu denen auch die tierischen NOD (*N-terminal oligomerisation domain*)-Proteine gehören (Leipe *et al.*, 2004; Albrecht und Takken, 2006; Takken *et al.*, 2006). STAND-ATPasen sind Nukleotridiphosphat-hydrolysierende Schalter, welche Signaltransduktionsprozesse durch Konformationsänderungen steuern (Leipe *et al.*, 2004). Biochemische Analysen der NB-LRR-Proteine I-2 und Mi-1 aus Tomate belegten eine ATP-Bindung und ATPase-Aktivität (Tameling *et al.*, 2002). Außerdem vermittelt die NB-Domäne zusammen mit der TIR-Domäne die von tierischen NOD-Proteinen bekannte Oligomerisierung des N-Proteins aus Tabak (Mestre und Baulcombe, 2006). Mutationen im Bereich der ARC-Region (z. B. im Methionin-Histidin-Aspartat-Motiv, MHD) führen zur Autoaktivierung einer HR in Abwesenheit des Elicitors (Bendahmane *et al.*, 2002; de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005; Howles *et al.*, 2005). Weitere autoaktivierende Mutationen wurden auch im Bereich des LRR identifiziert, was auf ein Zusammenwirken beider Domänen bei der Regulation der Signaltransduktion hindeutet (Bendahmane *et al.*, 2002).

Der **LRR** ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne in Prokaryonten und Eukaryonten (Kobe und Deisenhofer, 1995). Bei NB-LRR-Proteinen wird für diese Domäne die Interaktion mit dem Avr-Protein postuliert. Basierend auf der 3D-Struktur des Ribonuklease-Inhibitors des Schweins bildet der LRR eine hufeisenförmige 3D-Struktur aus, in deren konkaver Innenseite sich parallele β -Stränge befinden, die eine Interaktionsoberfläche darstellen könnten (Kobe und Deisenhofer, 1995). Im Bereich der β -Stränge wurden Lösungsmittel-orientierte AS-Reste identifiziert, die im intergenischen Sequenzvergleich hypervariabel sind und deshalb die Erkennungsspezifität des R-Proteins definieren könnten (Parniske *et al.*, 1997; Meyers *et al.*, 1998). Eine direkte Interaktion

zwischen der LRR-Domäne und einem Avr-Protein wurde bisher jedoch nur einmal gezeigt (Jia *et al.*, 2000)

Während CC-NB-LRR-Proteine einen eher kurzen AS-Abschnitt C-terminal vom LRR haben, weisen TIR-NB-LRR-Proteine größere C-terminale Nicht-LRR-Bereiche auf. Diese können durch ihre Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY-Transkriptionsfaktor-Motiv in RRS1, Deslandes *et al.*, 2002) oder anhand von konservierten AS-Motiven vom LRR abgegrenzt werden (Dodds *et al.*, 2001).

1.8. Modelle für den Funktionsmechanismus von NB-LRR-Proteinen

Die Vermittlung einer Resistenzreaktion ist die einzige bislang beschriebene Funktion pflanzlicher NB-LRR-Proteine (Dangl und Jones, 2001). NB-LRR-kodierende Gene repräsentieren eine der umfangreichsten Genfamilien in sequenzierten Pflanzengenomen (McHale *et al.*, 2006). Aktuelle Modelle postulieren direkte oder indirekte Interaktionen des NB-LRR-Proteins mit dem korrespondierenden Avr-Protein (Abb. 6, Dangl und McDowell, 2006). Im Rezeptor-Liganden-Modell interagiert das Avr-Protein als Ligand direkt mit dem NB-LRR-Protein (Gabriel und Rolfe, 1990; Keen, 1990). Eine mögliche Interaktionsoberfläche dafür bietet der LRR, über dessen hypervariable AS-Reste die Interaktionsspezifität vermittelt werden könnte. Bislang wurde eine direkte Avr-Interaktion mit drei NB-LRR-Proteinen demonstriert (Jia *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006). Der fehlende Nachweis einer direkten Interaktion anderer NB-LRR-Proteine mit ihren korrespondierenden Avr-Proteinen führte zur Beschreibung eines indirekten Interaktionsmodells. Das *guard*-Modell postuliert die Interaktion des Avr-Protein mit einem Zielprotein in der Pflanze (Pathogenitätsziel, Abb. 6B). NB-LRR-Proteine (Wächter, *guards*) erkennen Avr-bedingte Änderungen des Zielproteins und lösen eine Resistenzreaktion aus (Van der Biezen und Jones, 1998b; Dangl und Jones, 2001). *Arabidopsis* RPM1 detektiert z. B. die Phosphorylierung des RPM1-Interaktors 4 (RIN4) durch die *Pseudomonas*-Effektoren AvrB und AvrRpm1 (Mackey, 2003). Das *Arabidopsis*

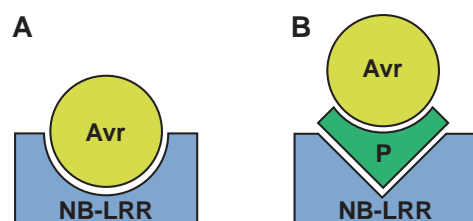


Abb. 6. Direktes und indirektes Erkennungsprinzip.

(A) Im Rezeptor-Liganden-Modell interagiert das Avr-Protein (Avr) direkt mit dem NB-LRR-Protein und induziert dadurch eine Resistenzreaktion. (B) Im *guard*-Modell interagiert das Avr-Protein mit einem Pathogenitätsziel-Protein (P), welches wiederum mit dem NB-LRR-Protein interagiert. Veränderungen des Zielproteins sind der Auslöser für eine NB-LRR-vermittelte Resistenzreaktion.

R-Protein RPS2 dagegen „prüft“ das Vorhandensein von RIN4 und induziert eine Resistenzreaktion nach *Pseudomonas* AvrRpt2-Protease-vermitteltem Abbau von RIN4 (Axtell *et al.*, 2003; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Andere NB-LRR-Protein-Analysen unterstützen dieses Modell (Krüger *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2003; Rooney *et al.*, 2005).

1.9. Ebenen der Regulation pflanzlicher Resistenz

Proteine, die zur Induktion von Zelltod führen können, müssen strenger Regulation durch die Pflanze unterliegen, um eine unkontrollierte Aktivierung zu verhindern. In Pflanzen wurden mehrere Regulationsebenen der NB-LRR-Aktivität gefunden.

Zahlreiche NB-LRR-kodierenden *R*-Gene sind konstitutiv niedrig exprimiert (Mindrinos *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1997; De Ilarduya und Kaloshian, 2001; Shen *et al.*, 2002; Goggin *et al.*, 2004; Paal *et al.*, 2004), andere *R*-Gene dagegen stark induziert (Yoshimura *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2004; Sobczak *et al.*, 2005). Neben der transkriptionellen Ebene erfolgt auch eine Regulation auf Proteinebene. So können NB-LRR-Proteine durch intramolekulare Interaktionen in inaktiver Konfiguration gehalten werden (Moffett *et al.*, 2002). Die Anwesenheit des Avr-Proteins aktiviert das NB-LRR-Protein, einhergehend mit einem Verlust der intramolekularen Interaktionen und ATP-Statusänderung (Schaltermodell der Regulation, Abb. 7A, Moffett *et al.*, 2002; Tameling *et al.*, 2002; Rathjen und Moffett, 2003). Außerdem resultieren Mutationen kritischer AS-Reste der intramolekularen Interaktionen oder der ATP-Bindung (z.B. MHD-Motiv der NB-Domäne, McHale *et al.*, 2006) in Autoaktivierung des NB-LRR-Proteins ohne Avr-Protein (Abb. 7B, Howles *et al.*, 2005). Eine Autoaktivierung wurde auch bei Überexpression einiger NB-LRR-Proteine beobachtet (Abb. 7C; Belkhadir *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Regulierung der NB-LRR-Aktivität ist die Stabilitätskontrolle des NB-LRR-Proteins. So lässt sich das CC-NB-LRR-Protein RPM1 nach Avr-Induktion nicht mehr nachweisen (Boyes *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 2005). Identifizierte RPM1-Interaktoren und Signalkomponenten der NB-LRR-vermittelten Resistenz geben weitere Hinweise auf einen solchen Mechanismus. Zwei RPM1-Interaktoren sind Ubiquitin-Ligasen, die in die Protein-Degradierung involviert ist. Beide RPM1-Interaktoren sind notwendig für die RPM1-vermittelte HR (Kawasaki *et al.*, 2005).

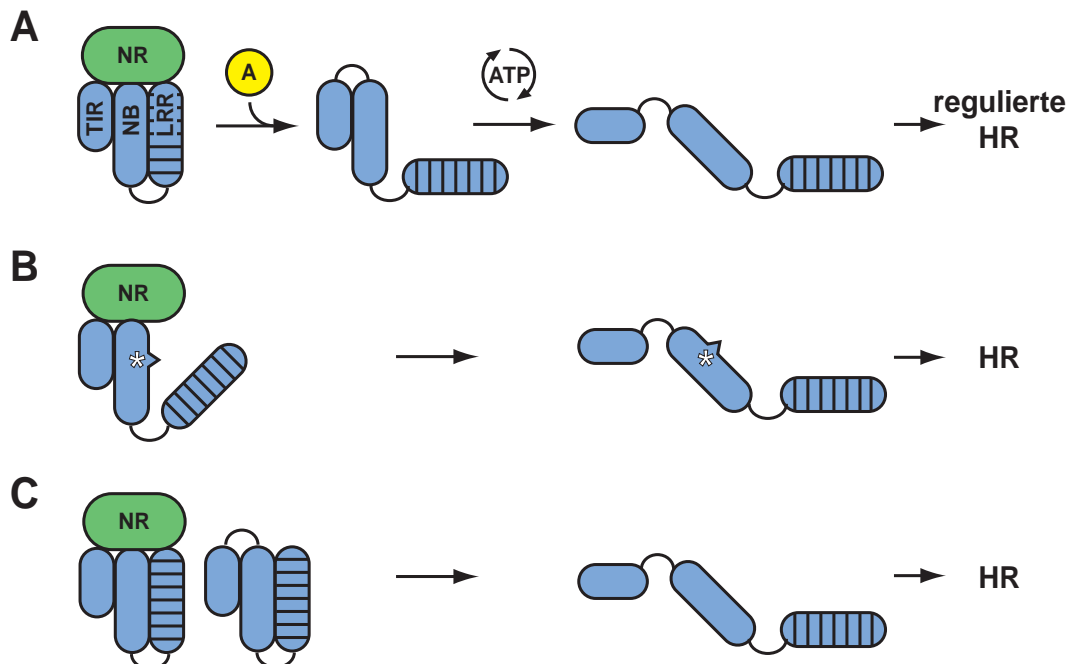


Abb. 7. Schalter-Modell der NB-LRR-Aktivierung. (A) Negative Regulatoren (NR) halten das NB-LRR-Protein im inaktiven Zustand. Das Avr-Protein (A) induziert die Auflösung intramolekularer Interaktionen zwischen NB- und LRR-Domäne. Die Auflösung von Interaktionen zwischen N-Terminus und NB-Domäne geht mit einer ATP-Statusänderung einher und resultiert in HR-Induktion. (B) Mutationen kritischer AS für intramolekulare Interaktionen oder ATP-Bindung (*) können zur Aktivierung führen. (C) Ebenso kann NB-LRR-Überexpression zur Ausitrierung negativer Regulatoren führen und dadurch HR auslösen. (nach Rathjen und Moffett, 2003 und)

Außerdem ist die Funktion zahlreicher NB-LRR-Proteine abhängig von *Rar1* (*required for Mla12 resistance*), *SGT1* (*suppressor of G-two allele of SKP1/suppressor of kinetochore protein1*) und Komponenten des COP9-Signalosoms (*constitutive photomorphogenic*). Die Funktion dieser Proteine wird unter anderem im regulierten Abbau von NB-LRR-Proteinen gesehen (Liu *et al.*, 2002; Muskett und Parker, 2003; Shirasu und Schulze-Lefert, 2003; Schulze-Lefert, 2004).

Ein Gegenspieler der NB-LRR-Destabilisierung könnte das in Proteinfaltung und Proteinstabilisierung involvierte Hsp90 (*heat shock protein 90*) sein. Hsp90 interagiert mit allen daraufhin getesteten NB-LRR-Proteinen und reduzierte *Hsp90*-Mengen führen zum NB-LRR-Funktionsverlust (Schulze-Lefert, 2004). Destabilisierende und stabilisierende Proteine könnten demnach ein fein abgestimmtes Gleichgewicht generieren, dessen Störung zur Auslösung einer Resistenzreaktion führt.

1.10. Zielstellung

Mittelpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung des *Bs4*-Gens aus Tomate auf transkriptioneller, bzw. des *Bs4*-Proteins auf posttranslationeller Ebene. Es sollte die molekulare Basis der *Bs4*-Erkennungsspezifität gegenüber *AvrBs4* und nahe verwandten Proteinen identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel war die funktionelle Analyse der *Bs4*-vermittelten Resistenz in artfremden, taxonomisch verwandten und nicht verwandten Spezies mittels *Agrobacterium*-vermittelter Expression.

Die Notwendigkeit bekannter Signalkomponenten im *Bs4*-Kontext war zu prüfen und etwaige neue Komponenten zu identifizieren. Beteiligte Proteine sollten über genetische und biochemische Ansätze näher charakterisiert werden.