

3. Diskussion

3.1. Die *Bs4*-vermittelte Erkennung von *AvrBs4* weicht vom generellen Erkennungsprinzip *AvrBs3*-ähnlicher Proteine ab

Die *AvrBs3*-ähnlichen Proteine *PthXo1* (entspricht *Avrxa13*), *AvrXa27*, *AvrBs3*, *AvrBs4* und das wahrscheinlich *AvrBs3*-ähnliche *Avrxa5* (Bai *et al.*, 2000) induzieren alle eine Resistenzreaktion in Pflanzenlinien mit den korrespondierenden *R*-Genen *xa5*, *xa13*, *Xa27*, *Bs3* und *Bs4*. Die Isolierung dieser *R*-Gene zeigte jedoch, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit der *Avr*-Proteine unterschiedliche Mechanismen der Erkennung angewandt werden. Das *R*-Protein der *xa5*-basierten Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* *pv.* *oryzae* (*Xoo*) ist eine Unterheit des transkriptionellen Präinitiationskomplexes (PIC) (Iyer und McCouch, 2004). Die durch *Avrxa5* kontrollierte und von dessen AD abhängige PIC-vermittelte Regulierung pathogenitätsfördernder Wirts-Gene ist wahrscheinlich in *xa5*-Linien nicht mehr möglich. Die *xa13*-vermittelte Resistenz in Reis folgt einem ähnlichen Prinzip. *PthXo1* induziert in suszeptiblen Reispflanzen über seine AD die Transkription von *Xa13*, einem für die Pollenentwicklung notwendigen Gen. Diese Induktion ist für das *Xoo*-Wachstum notwendig. In resistenten *xa13*-Linien erfolgt dagegen keine Induktion von *xa13* und *Xoo* kann sich nicht vermehren (Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Beide Mechanismen basieren also nicht auf der Wirkung eines Resistenzproteins, sondern auf einem Verlust der Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen. Dies wird unterstützt durch die vom dominanten Vererbungstyp nahezu aller *R*-Gene abweichende rezessive Vererbung der *xa5*- und *xa13*-vermittelten Resistenz.

Die *Xa27*-vermittelte Detektion von *AvrXa27* in Reis basiert auf einer Aktivierung des *Xa27*-Promotors. *AvrXa27* induziert über seine AD spezifisch das resistente *Xa27*-, aber nicht das suszeptible *xa27*-Allel. Beide Allele weisen signifikante Unterschiede in ihren Promotor-Sequenzen auf, die wahrscheinlich die Spezifität der Aktivierung vermitteln (Gu *et al.*, 2005).

Auch bei *AvrBs3* ist die AD notwendig für die *Bs3*-vermittelte HR in Paprika (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). Dies deutet auf eine dem *Xa27*-Mechanismus ähnliche *AvrBs3*-induzierte *Bs3*-Induktion hin. Allen genannten Resistenzmechanismen ist gemeinsam, dass die AD des *Avr*-Proteins notwendig ist für seine *Avr*-Aktivität.

Die AD-vermittelte Transkriptregulation ist aber auch die Grundlage bekannter Virulenz- oder virulenzähnlicher Effekte *AvrBs3*-ähnlicher Proteine in der Pflanze wie z. B.

Hypertrophie oder verstärktes bakterielles Wachstum und Läsionsbildung (Bai *et al.*, 2000; Marois *et al.*, 2002). Unlängst wurde ein AvrXa7-Derivat identifiziert, das keine Vir-Funktion mehr hat, jedoch weiterhin *Xa7*-spezifisch detektiert wurde (Yang *et al.*, 2005). Die Avr-Aktivität dieses Konstruktes hatte nur 40% der Aktivität von AvrXa7, d. h. der Verlust der Vir-Aktivität führte auch zum partiellen Verlust der Avr-Aktivität (Yang 2005). In Übereinstimmung damit zeigten frühere Arbeiten, in denen NLS- und AD-Deletionen von AvrXa7 getestet wurden, dass diese Deletionsderivate keine Avr-Aktivität haben (Yang *et al.*, 2000). Auch bei anderen untersuchten AvrBs3-ähnlichen Proteinen führen Deletionen der AD- oder NLS-Sequenzen sowohl zum Verlust der Erkennung, als auch messbarer Vir-Effekte wie z. B. AvrBs3-induzierter Hypertrophie (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). Die Erkennung von AvrBs3-ähnlichen Proteinen in resistenten Pflanzen ist also gekoppelt an ihre Vir-Aktivität (Lahaye und Bonas, 2001).

Im Gegensatz zu AvrBs3 induziert AvrBs4 keine im Labor messbaren Vir-Effekte. Aktuelle Daten belegen jedoch einen Beitrag von *avrBs4* zum bakteriellen Wachstum von *Xcv in planta*. Dieser Virulenzeffekt von AvrBs4 war jedoch nur in *avrBs2*-Mutanten detektierbar (Wichmann und Bergelson, 2004). Ob AvrBs4-Derivate ohne NLS und AD zum *Xcv*-Wachstum beitragen, wurde bisher nicht adressiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AvrBs4 in der Pflanzenzelle in subnukleären Foci akkumuliert. Dies könnte auf eine transkriptionelle Aktivität hinweisen (Taddei *et al.*, 2004). Das AvrBs4 Δ 227-Derivat, dem die AD fehlt, ist zwar auch im Zellkern nachweisbar, zeigt aber keine solchen Foci (Manuskript3, Abb. M3-1C). Die Tatsache, dass AvrBs4-Derivate aber auch ohne AD eine HR in *Bs4*-Tomaten induzieren, weist darauf hin, dass sich die *Bs4*-Erkennung durch ihre Unabhängigkeit von AD-bedingter Transkriptregulation von den anderen Erkennungsmechanismen unterscheidet.

Die Erkennungsspezifität von *Xa27*, *Bs3* sowie den bisher nicht isolierten R-Genen *Xa7* und *Xa10* wird durch die Repeat-Regionen von *avrXa27*, *avrBs3*, *avrXa7* und *avrXa10* definiert (Herbers *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2005), während die N- und C-Termini verschiedener AvrBs3-ähnlicher Proteine funktionell austauschbar sind und keinen Einfluß auf die Spezifität haben (Zhu *et al.*, 1998; Ballvora *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu vermittelt *Bs4* die Erkennung auch stark verkürzter AvrBs4-Derivate, denen ein Großteil der Repeat-Region fehlt. Außerdem

induziert neben AvrBs4 auch AvrBs3 bei Überexpression eine *Bs4*-spezifische HR, obwohl sich die Repeat-Regionen beider Proteine unterscheiden (Abb. M1-4, M1-9). Interessanterweise weist das AvrBs4 Δ 227-Derivat sogar eine stärkere Avr-Aktivität auf als AvrBs4 (Bonas *et al.*, 1993; Ballvora *et al.*, 2001). Ein Grund für diese verstärkte Aktivität könnte eine verbesserte Proteininstabilität von kürzeren Konstrukten sein (Abb. M3-1B). Die unterschiedlichen Proteinmengen von AvrBs4 und AvrBs4 Δ 227 nach Agroinfiltration machen deutlich, dass ein direkter Vergleich von Wildtyp und Derivaten ausschließlich anhand des Phänotyps nur bedingt möglich ist. Notwendig wäre neben dem Phänotyp auch die Quantifizierung der Proteinmengen über Epitop-spezifische Antikörper, da polyklonale Antisera eine veränderte Affinität zu verkürzten Derivaten haben könnten. Außerdem muß geprüft werden, ob sich die Derivate in ihrer subzellulären Lokalisierung unterscheiden. So wurde z.B. AvrBs4 nach Deletion der NLS-Motive zwar nur noch im Cytoplasma und nicht mehr im Zellkern detektiert, ein stärker verkürztes Derivat (AvrBs4 Δ 227 Δ 152) lokalisierte jedoch wieder in beiden Kompartimenten (Abb. M3-1).

3.2. Die Fähigkeit zur Erkennung von verkürztem AvrBs4 ist auf die Gattung *Lycopersicon* beschränkt

Die Fähigkeit zur Erkennung von AvrBs4 Δ 227 ist typisch für *Bs4* und ermöglicht die Charakterisierung von Pflanzenlinien hinsichtlich eines *Bs4*-Erkennungsmechanismus.

Die *Agrobacterium*-vermittelte gemeinsame Expression von *Bs4* und *avrBs4* Δ 227 zeigte, dass das *Bs4*-Protein nicht nur in Tomate, sondern auch in anderen Pflanzenarten funktionsfähig ist. Dies traf auch dann zu, wenn die Arten selbst keine Erkennung von AvrBs4 vermitteln. Sogar in Spinat (*Chenopodiaceae*) konnte die *Bs4*-Funktionalität gezeigt werden (Tabelle 2). Der Ausfall der *Bs4*-Funktion in einigen zu Tomate näher verwandten Arten (z. B. in Paprika und *S. nigrum*) könnte durch das Fehlen kritischer Komponenten der *Bs4*-Signalkaskade begründet sein.

Transiente *Agrobacterium*-Expressionsexperimente mit AvrBs4 Δ 227 führten nur in Tomate und anderen Arten der Gattung *Lycopersicon* zur HR-Induktion, jedoch in keiner anderen getesteten Spezies (Abb. 14, Tabelle 2). Dies deutet darauf hin, dass nur Tomaten ein funktionales *Bs4*-Gen besitzen. Obwohl sich *Lycopersicon* dadurch von den anderen getesteten *Solanum*-Arten abgrenzen lässt, ist es keine eigene taxonomische Gruppe mehr, sondern wurde in die Gattung *Solanum* integriert (Bohs und Olmstead, 1997). Grund dafür waren neuere Analysen, die zeigten, dass *Lycopersicon* keine monophyletische Gruppe ist,

weil einige Arten näher verwandt mit *Solanum* als mit anderen Arten der eigenen Gattung sind.

Die susceptible *L. pennellii* LA2963-Linie ist bisher die einzige näher analysierte Linie, die keine AvrBs4 Δ 227-Erkennung vermittelt (Ballvora *et al.*, 2001). Vergleichende Sequenzanalysen hatten in dieser Linie jedoch ein *Bs4*-Sequenzhomolog identifiziert (*bs4-pen2963*, Schornack *et al.*, 2004). Da dieses nach gemeinsamer Expression mit AvrBs4 Δ 227 in *N. benthamiana* eine HR induziert, handelt es sich hier um ein funktionsfähiges Allel (S. Schornack und T. Lahaye, unveröffentlicht). Der susceptible Charakter der *bs4*-Ursprungslinie *L. pennellii* LA2963 ist wahrscheinlich auf Unterschiede im Zeitverlauf der HR-Reaktion zurückzuführen. *L. pennellii* LA2963 reagierte auf *Xcv* (*avrBs4*) nicht mit einer schnellen HR-typischen Reaktion, sondern mit einer langsameren nekrotischen Reaktion (Daten nicht dargestellt). Dieser phänotypische Unterschied war ausreichend für die kartengestützte *Bs4*-Isolierung.

Weitere *Bs4*-homologe Sequenzen wurden in allen *Lycopersicon*-Arten detektiert, und alle induzieren bei *Agrobacterium*-vermittelte Expression mit *avrBs4* Δ 227 eine HR in *N. benthamiana* (K. Peter, S. Schornack, L. Rose & T. Lahaye, unveröffentlicht). Das Vorhandensein funktionaler *Bs4*-Sequenzen in allen getesteten Spezies mit *Bs4*-typischer Erkennung deutet daraufhin, dass die Erkennung von AvrBs4 Δ 227 stets durch *Bs4* vermittelt wird. In *S. demissum* wurden auch zwei *Bs4*-Homologe (*SdBs4H1* und *SdBs4H2*; Manuskript 2) gefunden, die jedoch Leserastermutationen aufwiesen. Die

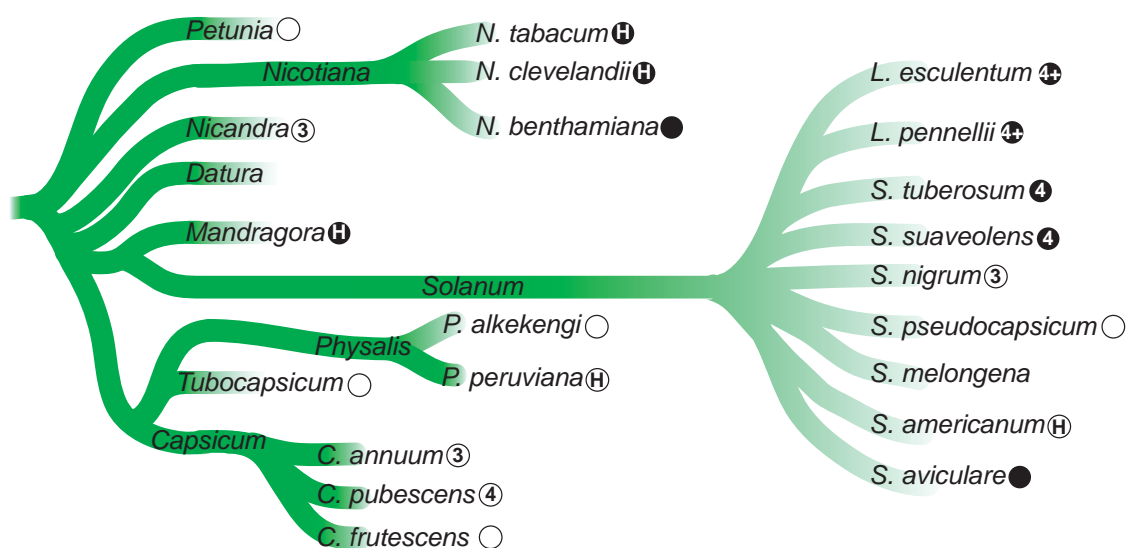


Abb. 14. Taxonomische Verbreitung der Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine und der Bs4-Funktionalität innerhalb der getesteten Nachtschattengewächse. Analytierte Gattungen und Arten sind im Kladogramm (nach Knapp, 2002, erweitert) dargestellt. Getestete Linien mit Erkennung von AvrBs3 (3), AvrBs4 (4), AvrBs4 Δ 227 (+) oder Hax3 (H) sind angegeben. Pflanzen ohne bzw. mit *Bs4*-Funktionalität (HR nach Koexpression mit *avrBs4* Δ 227) sind durch offene bzw. gefüllte Kreise markiert.

S. demissum-Linien zeigten auch keine HR bei *Agrobacterium*-vermittelter Expression von AvrBs4 Δ 227. Es könnte sich hier um inaktive *Bs4*-Homologe handeln.

Neben dem NLS-unabhängigen *Bs4*-Typ der Erkennung verkürzter Avr-Derivate existiert ein weiterer AvrBs4-Erkennungsmechanismus. In Kartoffel und *S. suaveolens* wird AvrBs4 NLS-abhängig detektiert. Ebenso war die Erkennung von AvrBs3 in den analysierten Arten stets abhängig von NLS-Sequenzen und entspricht damit dem *Bs3*-Erkennungstyp (Minsavage *et al.*, 1999; Ballvora *et al.*, 2001).

Rassen- bzw. Kultivarspezifische *R*-Gene geben nur einzelnen Genotypen einer Art die Fähigkeit zur Avr-Detektion. Ein Grund dafür ist die reduzierte biologische Fitness resistenter Genotypen (Dangl und Jones, 2001; Pink, 2002; Tian *et al.*, 2003). Sind ähnliche *R*-Gen-Sequenzen in mehreren Arten vorhanden, so weisen diese häufig eine abweichende Spezifität auf. Kartoffel *Rx* vermittelt z.B. Resistenz gegen PVX-Viren, während das homologe *Gpa2* aus Kartoffel ein Nematoden-Resistenzgen ist (Bendahmane *et al.*, 1999; Van der Vossen *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass mehrere Arten der Familie *Solanaceae* zumindestens bei *Agrobacterium*-vermittelter Expression eine AvrBs4- bzw. AvrBs3-Erkennung aufweisen, deutet daraufhin, dass diese Erkennungsmechanismen nicht kultivar-spezifisch sind (Tabelle 2; Abb. 8; Abb. 14). Verläuft die NLS-abhängige Erkennung von AvrBs4 oder AvrBs3 über eine AD-vermittelte transkriptionelle Induktion des *R*-Gens, so wäre ohne das Avr-Protein das *R*-Gen nicht exprimiert und deshalb kein Fitnessverlust vorhanden. Dies könnte ein Grund für das Vorhandensein dieses Erkennungsprinzips in vielen Pflanzenspezies sein.

3.3. Die *Bs4*-Erkennungsspezifität ist abhängig von der Avr-Menge

Bekannterweise neigen Antikörper neben der Reaktion mit dem spezifischen Antigen auch zu Kreuzreaktionen mit strukturell ähnlichen Antigenen, besonders, wenn diese in hohen Mengen vorhanden sind. Es ist deshalb erstaunlich, dass *Bs3* aus Paprika und *Bs4* aus Tomate in der Lage sind, zwischen den 97% identischen AvrBs3- und AvrBs4-Proteinen zu differenzieren (Ballvora *et al.*, 2001).

Infiltrationen von *avrBs3*- und *avrBs4*-exprimierenden *Xcv* und die *Agrobacterium*-vermittelte Expression beider *avr*-Gene haben jedoch gezeigt, dass *Bs4* auch AvrBs3-Erkennung vermitteln kann, wenn dieses in der Pflanze überexprimiert wird (Abb. M1-4,

Abb. M2-7). Dagegen induziert AvrBs4 selbst bei Überexpression in *Bs3*-Paprika keine HR (Abb. M2-7C), d. h. die Erkennungsspezifitäten von *Bs3* und *Bs4* werden auf unterschiedliche Weise definiert. Auch die *R*-Gene *B4*, *b7* und *Bln* aus Baumwolle zeigen außer mit ihren korrespondierenden Avr-Proteinen keine HR-Aktivität gegenüber anderen überexprimierten *avrBs3*-ähnlichen Genen (De Feyter *et al.*, 1998). *Bs4* ist demnach bisher eine Ausnahme, da es zusätzlich in der Lage ist, auch mit Hax3 und Hax4, zwei weiteren AvrBs3-ähnlichen Proteinen, eine Resistenzreaktion auszulösen (Abb. M2-7D, Kay *et al.*, 2005). Hax3 und Hax4 haben im Gegensatz zu AvrBs3 eine andere Anzahl an Repeats (Abb. 3), werden aber trotzdem sowohl bei Translokation durch *Xanthomonas* als auch bei schwacher *Agrobacterium*-vermittelter Expression durch *Bs4* erkannt. AvrBs3 muss dafür überexprimiert werden, obwohl es wie AvrBs4 17,5 Repeats hat. Dies weist darauf hin, dass nicht die Gesamtstruktur des Avr-Proteins, sondern eher ein kurzes Avr-Peptidmotiv als Spezifitätskomponente in Frage kommt. Zwar haben alle durch *Bs4* erkannten Avr-Proteine eine andere Repeat-Reihenfolge, das Repertoire an unterschiedlichen 34-AS-Repeatsequenzen ist jedoch identisch. Das einzige bisher identifizierte AvrBs3-Homolog ohne *Bs4*-Erkennung ist Hax2. Allerdings hat Hax2 in jedem Repeat einen zusätzlichen AS-Rest und außerdem zwei in Hax3, Hax4, AvrBs4 und AvrBs3 nicht vorkommende Repeats (Kay *et al.*, 2005), die die Ursache für die fehlende *Bs4*-vermittelte Erkennung sein könnten. Zusätzlich beeinflusst sicherlich die Stabilität der Avr-Proteine in der Pflanze deren Avr-Aktivität. Bislang wurden keine Vergleiche der Avr-Proteinmengen über Epitop-markierte Derivate durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der schwach exprimierende *Bs4*-Promotor im Vergleich zum stärkeren 35S-Promotor zur Adressierung quantitativer Aspekte der *Bs4*-vermittelten Erkennung verwendet.

Da *Bs4* sowohl unter Kontrolle des eigenen, als auch des 35S-Promotor ein identisches Erkennungsspektrum gegenüber AvrBs3-ähnlichen Proteinen besaß, haben *Bs4*-Transkript-Mengen keinen Einfluss auf die Erkennungsspezifität von *Bs4* (Abb. M2-2, Schornack *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu beeinflusste aber das Expressionsniveau des Avr-Proteins die *Bs4*-Erkennungsspezifität. So löst AvrBs3 nur bei Überexpression, Hax3 und Hax4 jedoch auch noch bei Expression unter Kontrolle des schwachen *Bs4*-Promotors eine *Bs4*-HR aus. Wurden Promotorfragmente mit noch geringerer Aktivität vor Hax3- bzw. Hax4 geschaltet, so erfolgte zwar Hax4- und AvrBs4-Erkennung, jedoch keine Hax3-Erkennung mehr (Abb. M2-7). Geringe Unterschiede im Expressionsniveau von AvrBs3-ähnlichen Proteinen sind also bereits ausschlaggebend für ihre *Bs4*-vermittelte Erkennung. Schlussfolgerungen hinsichtlich Erkennungsspezifitäten von R-Proteinen sollten deshalb

immer dann vorsichtig interpretiert werden, wenn das *avr*-Gen unter Kontrolle starker Promotoren *in planta* exprimiert wurde.

3.4. Bs4 und AvrBs4: indirekte oder direkte Interaktion?

Bislang konnte experimentell keine Interaktion zwischen AvrBs4 und Bs4 nachgewiesen werden. Da dies auch für andere Avr-R-Interaktionen zutrifft, wurde ein *guard*-Modell postuliert, das auf der R-Protein-vermittelten Detektion Avr-bedingter Veränderungen eines pflanzlichen Zielproteins basiert (Van der Biezen und Jones, 1998b; Dangl und Jones, 2001; Dangl und McDowell, 2006). Interaktionen treten demnach nicht direkt zwischen Avr- und R-Protein, sondern zwischen dem Zielprotein und dem Avr- bzw. R-Protein auf. Eine Interaktion von Avr-, R- und Zielprotein in einem trimeren Komplex, bei der auch Avr- und R-Protein miteinander interagieren, ist dabei nicht ausgeschlossen. Dagegen postuliert das Rezeptor-Liganden-Modell eine direkte Interaktion zwischen Avr- und R-Protein (Gabriel und Rolfe, 1990; Dangl und McDowell, 2006). Etwaige weitere Zielproteine des Avr-Proteins bleiben unberücksichtigt. Bislang ist jedoch keine direkte Interaktion eines R-Proteins mit einem AvrBs3-ähnlichen Protein identifiziert worden. Für andere Avr-Proteine wurde aber eine direkte Interaktion mit NB-LRR-Proteinen gezeigt (Jia *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006).

Für eine direkte AvrBs4-Bs4-Interaktion ist eine Kolokalisation zwingend notwendig. Die voneinander abweichende Lokalisierung von AvrBs4 im Kern und Bs4 im Cytoplasma würde demnach eine direkte Interaktion ausschließen (Abb. M3-1B, M3-2B). Da aber auch cytoplasmatisch lokalisierte AvrBs4-Derivate ohne NLS durch Bs4 erkannt werden, muss die Erkennung im Cytoplasma stattfinden (Ballvora *et al.*, 2001; Schornack *et al.*, 2004). Ursache für den fehlenden Nachweis von AvrBs4 im Cytoplasma könnten zu geringe Protein-Mengen sein. Die subzelluläre Lokalisierung weiterer R-Proteine und ihrer korrespondierenden Avr-Proteine weist aber generell auf die Notwendigkeit einer räumlichen Beziehung beider Komponenten hin (Bonas und Lahaye, 2002). In *Arabidopsis* ist die RPM1-vermittelte Erkennung der *Pseudomonas syringae*-Proteine AvrRpm1 und AvrB abhängig von der Membranassoziation der beteiligten Proteine (Nimchuk *et al.*, 2000; Thompson und Okuyama, 2000). Ebenso membranlokalisiert sind RIN4 und NDR1 (*no disease resistance*), zwei weitere Komponenten der RPM1-Resistenz (Century *et al.*, 1997; Mackey *et al.*, 2002; Coppinger *et al.*, 2004). Potentielle membranassoziiierende

Myristoylierungsmotive wurden auch in den interagierenden *Arabidopsis*-Proteinen RPS5 (R-Protein) und PBS1 (*AvrPphB* *susceptible protein1*) sowie dem korrespondierenden *Pseudomonas*-Avr-Protein AvrPphB gefunden (Puri *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1998; Swiderski und Innes, 2001; Shao *et al.*, 2003). Das durch *Cladosporium fulvum* in den Apoplasten von Tomaten sekretierte Avr2 wird durch membranständiges Cf-2 zusammen mit der ebenfalls extrazellulären Protease Rcr3 (*required for C. fulvum resistance*) erkannt (Rooney *et al.*, 2005). Sowohl die RPM1-, RPS5- als auch die Cf-2-Resistenz basieren auf Interaktionen von Avr- und R-Protein mit einem pflanzlichen Zielprotein im Sinne des *guard*-Modells.

Für direkte Avr-R-Interaktionen ist nur eine Kollokalisationsstudie publiziert. *Arabidopsis* RRS1 kollokalisiert mit dem *Ralstonia solanacearum* Avr-Protein PopP2 im Zellkern (Deslandes *et al.*, 2003). Die Interaktion der membranassoziierten Proteine AvrPto und Pto ist dagegen keine Avr-R-, sondern eine Avr-Zielprotein-Interaktion. Das korrespondierende R-Protein ist wahrscheinlich Prf (Salmeron *et al.*, 1996), dessen Interaktion mit AvrPto bisher nicht nachgewiesen wurde (Van der Biezen und Jones, 1998a).

Für RRS1 und PopP2 bzw. AvrL567 und L6 wurde eine direkte Interaktion im Hefe-System gezeigt (Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006). Dagegen konnte für AvrBs4 keine Interaktion mit Bs4 nachgewiesen werden. Das verwendete Hefesystem erzwingt eine Lokalisierung beider zu testenden Partner im Zellkern, obwohl die AvrBs4-Erkennung wahrscheinlich im Cytoplasma stattfindet. Demnach entspricht der zelluläre Kontext nicht den Bedingungen in der Pflanze. Alternativ könnte ein kernunabhängiges Hefe-split-Ubiquitin-System (Johnsson und Varshavsky, 1994) verwendet werden. Zur Wahrung des zellulären Kontexts wurden in dieser Arbeit Co-IP-Analysen aus Pflanzenextrakt und Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) *in vivo* durchgeführt, die jedoch auch keine AvrBs4-Interaktion mit Bs4 zeigen konnten. Der Erfolg dieser Methoden ist abhängig von nachweisbaren Protein-Mengen. Die Bs4-Menge in *N. benthamiana* ist gering und wird bei Anwesenheit von AvrBs4 noch reduziert, so dass die Sensitivität des experimentellen Nachweises der limitierende Faktor für den Nachweis einer Interaktion zwischen AvrBs4 und Bs4 sein könnte. Sollten nur Spaltprodukte eines oder beider Proteine in die Interaktion eingehen, ist ein Nachweis über fusionierte Epitope nicht mehr möglich. Alternativen wären ein polyklonales Antiserum mit mehreren über das Protein verteilten Antigen-Bereichen oder die radioaktive Markierung der Interaktoren.

BiFC-Experimente wurden auch durchgeführt, um temporäre Interaktionen in einem fluoreszierenden Komplex zu arretieren (Kerppola, 2006). So ist z.B. die im Cytoplasma und im Zellkern zu erwartende Interaktion zwischen dem Transport-Protein Importin α und AvrBs4 mittels BiFC ausschließlich im Zellkern detektierbar, weil die beiden Partner dort wahrscheinlich nicht dissoziieren können (Abb. M3-3). Mit AvrBs4 und Bs4 wurden keine fluoreszierenden Signale in BiFC-Experimenten detektiert. Ein Nachteil von BiFC ist, dass die Position der YFP-Hälften kritisch für den erfolgreichen Nachweis einer BiFC-Interaktion ist (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Eine alternative Fixierung von Proteinkomplexen wäre das chemische Kreuzvernetzen (*cross-linking*) und die anschließende Aufreinigung der Proteinkomplexe.

Insgesamt könnten also experimentelle Ursachen den Nachweis einer AvrBs4-Interaktion mit Bs4 verhindert haben. Die durch Bs4 erkannten, verkürzten AvrBs4-Derivate haben keine NLS- und AD-Motive, die bei anderen AvrBs3-ähnlichen Proteinen die Grundlage für die Virulenz sind. Demnach besitzt auch AvrBs4 wahrscheinlich keine Vir-Funktion mehr, die die Basis einer indirekten Erkennung im Sinne des *guard*-Modells darstellt. Es existieren zum jetzigen Zeitpunkt demnach weder für das Rezeptor-Liganden-Modell, noch für das *guard*-Modell experimentelle Hinweise. Auf Basis der postulierten TPR-ähnlichen AvrBs4-Struktur wäre eine direkte Interaktion mit der Bs4-LRR-Domäne möglich (Abb. 13, Schornack *et al.*, 2006). In Übereinstimmung damit wurden bereits eine Interaktion von NB-LRR-Proteinen mit TPR-Domänen gezeigt (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2003). Eine direkte Interaktion von AvrBs4 und Bs4 im Sinne des Rezeptor-Liganden-Modells kann also nicht ausgeschlossen werden.

3.5. Die Bs4-Menge wird posttranslational reguliert

Punktmutationen im C-terminalen Abschnitt der NB- und in der LRR-Domäne führten bei den R-Proteinen Rx aus Kartoffel und Mi-1 aus Tomate zur Avr-unabhängigen HR-Induktion (Autoaktivierung). Die Häufigkeit von NB-LRR-Autoaktivatoren bei Mutationsanalysen, deutet eher auf einen viel häufiger auftretenden Funktionsverlust, als auf den selteneren Funktionsgewinn hin. Es könnte sich um den Verlust einer Suppression handeln, die normalerweise das NB-LRR-Protein im inaktiven Zustand arretiert (Bendahmane *et al.*, 2002; Hwang und Williamson, 2003). So resultierte die Mutagenese des im NB lokalisierten konservierten MHD-Motivs z. B. bei L6 aus Flachs in einem Autoaktivierungsphänotyp (Howles *et al.*, 2005). Für Bs4 sind bisher keine Autoaktivator-

Mutanten bekannt. Die Mutagenese des Aspartats im MHD-Motiv hatte keine Auswirkung auf die Bs4-HR (S. Schornack & T. Lahaye, unveröffentlicht).

Neben Mutationen führt auch die Überexpression einiger NB-LRR-Gene zu deren Autoaktivierung (Mindrinos *et al.*, 1994; Oldroyd und Staskawicz, 1998; Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2000; Bendahmane *et al.*, 2002; Stokes *et al.*, 2002; Stokes und Richards, 2002; Tameling *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Daraus folgt, dass die NB-LRR-Menge kritisch ist für die Funktion und deshalb Regulationsmechanismen unterliegt. Eine Überexpression von *Bs4* führte zwar zu erhöhten Transkriptmengen (diese Arbeit, Manuskript 1) und höheren Bs4-Mengen in der Pflanze (S. Schornack und T. Lahaye, unveröffentlicht), jedoch bei *Agrobacterium*-vermittelter Überexpressionen nicht zur Avr-unabhängigen Autoaktivierung von *Bs4*. Interessanterweise wird Bs4 trotz 35S-basierter konstitutiver Expression bereits 2-3 Tage nach Infiltration auch in Abwesenheit von AvrBs4 auf nicht detektierbare Mengen reduziert (Abb. M3-8). Dies deutet auf eine posttranslationelle Regulation der Bs4-Mengen hin. Nicht nur Bs4, sondern auch einzelne Bs4-Domänen wurden bei Überexpression in der Pflanze in ihrer Menge reguliert, wobei der TIR am stärksten und LRR-enthaltende Domänenkonstrukte am schwächsten nachweisbar sind (Abb. M3-5, M3-6). Dem LRR könnte also eine Rolle in der Regulierung der Bs4-Menge zukommen. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, zu prüfen, ob Punktmutationen im LRR, die zu einer veränderten Bs4-Funktionalität führen (A. Fick & T. Lahaye, unveröffentlicht) auch mit einer Veränderung der Bs4-Stabilität gekoppelt sind.

3.6. AvrBs4 induziert die Auflösung von Bs4-Domänen-Interaktionen und führt zum Verschwinden von Bs4

Experimente mit den CC-NB-LRR-Proteinen Rx aus Kartoffel und Bs2 aus Paprika zeigten, dass intramolekulare Interaktionen der CC- mit der NB-LRR-Domäne und der CC-NB- mit der LRR-Domäne an der Regulierung der Funktion beteiligt sind (Moffett *et al.*, 2002). Die für Bs4-Domänen hier experimentell gezeigten Interaktionen zwischen TIR und NB-LRR bzw. TIR-NB und LRR deuten darauf hin, dass dieses Regulationsprinzip auch auf TIR-NB-LRR-Proteine übertragbar ist (Abb. 3-4, 3-7). Im Hefe-Dihybrid-System konnte diese Bs4-Domänen-Interaktion jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies lässt die Notwendigkeit weiterer pflanzlicher Komponenten für die intramolekularen Interaktionen vermuten. Interessanterweise sind Rx-Domänen-Interaktionen bei Expression des komplementären Avr-Proteins (PVX-Hüllprotein) nicht mehr nachweisbar (Moffett *et al.*,

2002). Das auf Basis dieser Daten entwickelte Schaltermodell postuliert eine Avr-induzierte Transition von einem durch intramolekulare Interaktionen inaktivierten Komplex in einen signalkompetenten, aktiven Komplex, bei dem intramolekulare Interaktionen nicht mehr nachweisbar sind (Rathjen und Moffett, 2003). In Übereinstimmung mit diesem Modell führt auch bei Bs4 die Anwesenheit von AvrBs4 zum Verlust der Bs4-Domänen-Interaktionen (Abb. M3-7). Die Bs4-Experimente wurden in *N. benthamiana* Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. In vergleichbaren Arbeiten wurden Unterschiede bei der Avr-induzierten Aufhebung der Domänen-Interaktionen zwischen unbehandelten und *SGT1*-Silencing-Pflanzen festgestellt. Untersuchungen zu Bs2 aus Paprika bestätigten zwar die Domänen-Interaktion, konnten jedoch keine Avr-induzierte Aufhebung derselben finden (Leister *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den Arbeiten mit Rx wurden die neueren Bs2-Analysen nicht in *SGT1*-Silencing-Pflanzen, sondern in Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Aktuelle Arbeiten belegen eine Notwendigkeit von *SGT1* für die Stabilisierung und Funktion von NB-LRR-Proteinen (Azevedo *et al.*, 2001; Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002; Tör *et al.*, 2002; Leister *et al.*, 2005). Tatsächlich führt Virus-induziertes *SGT1*-Silencing auch zu stark reduzierten Bs4-Mengen und zum Verlust der Bs4-HR (Abb. M1-10, Abb. M3-11; S. Schornack & T. Lahaye, unveröffentlicht). Im Gegensatz zu Bs4 sind Bs2-Domänen-Interaktionen möglicherweise stabiler und nur bei fehlender Stabilisierung von Bs2 durch *SGT1* auflösbar.

Immunoblot-Analysen zeigten, dass die Bs4-Menge bei Koexpression mit AvrBs4 geringer ist als ohne AvrBs4. Dieser Effekt wurde auch für das NB-LRR Protein RPM1 aus *Arabidopsis* beschrieben und könnte der Pflanze dazu dienen, die Resistenz-Antwort zu limitieren (Boyes *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 2005). Das Verschwinden von Bs4 wird spezifisch durch alle AvrBs3-ähnlichen Proteine ausgelöst, die eine Bs4-HR induzieren. Jedoch handelt es sich nicht um eine generelle HR-bedingte Degradierung aller Proteine, da z.B. *SGT1* in seiner Menge unverändert bleibt. Der Effekt ist zudem Bs4-spezifisch, da das 57% identische N-Protein bei Expression *avrBs3*-ähnlicher Gene nicht verschwindet (Abb. M3-8). Messbare Unterschiede in relativen Bs4-Mengen wurden 1,5-2 Tage nach Agroinfiltration detektiert. Damit ist das Verschwinden von Bs4 zeitlich nach der Auflösung der Bs4-Domänen-Interaktionen einzuordnen, die bereits einen Tag nach Agroinfiltration nicht mehr detektierbar waren. AvrBs4 induziert neben dem Verschwinden von Bs4 auch das von Bs4-Domänen (mit Ausnahme der TIR-Domäne), obwohl die Domänen alleine keine HR bei Koexpression mit AvrBs4 auslösen können (Abb. M3-8). Dies zeigt, dass die Verringerung der Bs4- bzw. Bs4-Domänen-Mengen

unabhängig von der HR ist. Möglich wäre ein Einfluss von AvrBs4 auf Hsp90, welches für die Stabilisierung der Bs4-Proteinmengen notwendig sind.

3.7. Hsp90 reguliert die Bs4-Aktivität

Sequenzvergleiche zwischen NB-LRR-Proteinen haben gezeigt, dass die AS-Sequenz im LRR stark variiert (*diversifying selection*). Diese hypervariablen AS-Reste definieren wahrscheinlich die Erkennungsspezifität. Es wird vermutet, dass diese Variabilität der LRR-Sequenz mit einem Stabilitätsverlust einhergeht, der durch Chaperone (z. B. Hsp90) kompensiert wird (Schulze-Lefert, 2004). Aus Silencing-Experimenten war bekannt, dass zahlreiche NB-LRR Proteine in ihrer Funktion von *Hsp90* abhängig sind (Lu *et al.*, 2003) (Liu *et al.*, 2004) (de la Fuente van Bentem *et al.*, 2005) (Zhang *et al.*, 2004). *Hsp90*-Silencing in *Bs4*-Tomatenpflanzen bzw. *Bs4*-transgenen *N. benthamiana* zeigte, dass *Hsp90* auch für die *Bs4*-HR notwendig ist (Abb. M3-9; Daten nicht dargestellt). Wird *Hsp90* durch Silencing reduziert, ist kein *Bs4*-Protein mehr nachweisbar, d. h. *Hsp90* ist an der Regulierung der *Bs4*-Menge beteiligt (Abb. M3-9). Darüber hinaus konnte eine Interaktion zwischen *Bs4* und *Hsp90* nachgewiesen werden. Ob ein funktionales *Hsp90* für den Einfluss auf *Bs4* notwendig ist, muss noch mit ATPase-inaktiven *Hsp90*-Mutanten getestet werden. Die Tatsache, dass *Hsp90*-Inhibition durch Geldanamycin in *Arabidopsis* zum Verlust der RPM1-Funktion führt (Holt *et al.*, 2005), deutet aber bereits darauf hin, dass nicht nur die Interaktion von *Hsp90* mit RPM1 und anderen NB-LRR-Proteinen, sondern die *Hsp90*-Aktivität für deren Funktion notwendig ist.

Interessanterweise resultierte nicht nur *Hsp90*-Silencing, sondern auch die transiente Überexpression von *Hsp90* in einer signifikanten Reduktion der *Bs4*-HR, obwohl in diesem Fall die relativen *Bs4*-Mengen erhöht waren (Abb. M3-11). Im aktuellen Arbeitsmodell (Abb. M3-13) reguliert *Hsp90* die *Bs4*-Funktion. Es kontrolliert die im Schaltermodell postulierte Transition des *Bs4*-Proteins von einem erkenntungskompetenten in einen signalkompetenten Zustand, der für die HR notwendig ist (Abb. M3-13). Ein Hinweis für eine tatsächlich stattfindende Zustandsänderung sind nicht mehr nachweisbare *Bs4*-Domänen-Interaktionen und die reduzierte *Bs4*-Menge. *Hsp90*-Überexpression könnte das Gleichgewicht zwischen erkenntungskompetentem und signalkompetentem Zustand in Richtung erkenntungskompetenten Zustand verschieben und dadurch für höhere *Bs4*-Mengen verantwortlich sein. Die entsprechend geringere Menge an signalkompetentem *Bs4* ist der Grund für die reduzierte HR bei *Hsp90*-Überexpression. Es bleibt zu prüfen, ob

ein veränderter Hsp90-Bedarf der Pflanze ein mögliche Ursache für den Funktionsverlust zahlreicher Resistenz-Reaktionen bei erhöhten Temperaturen ist (siehe z.B. Whitham *et al.*, 1996; siehe z.B. Erickson *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit zu anderen NB-LRR-Proteinen durchgeführten *Hsp90*-Expressionsanalysen belegen bereits, dass HR-Reduktion durch *Hsp90*-Überexpression kein Bs4-spezifisches Phänomen ist, sondern auch für andere NB-LRR-Proteine gilt (Abb. M3-11). Die Hsp90-kontrollierte HR-Induktion von NB-LRR-Proteinen könnte demnach ein generelles Regulationsprinzip sein.

3.8. Die Bs4-HR benötigt Polyubiquitinierung

Die Abhängigkeit der Bs4-HR von *SGT1* gab bereits Hinweise auf die Notwendigkeit des Ubiquitin- bzw. Proteasom-vermittelten Proteinabbaus, da SGT1 eine Komponente eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist (Peart *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurden Experimente mit einer Ubiquitin-Mutante (*ubr48*) durchgeführt (Schlögelhofer *et al.*, 2006), um die Bedeutung der Ubiquitinierung für die Bs4-vermittelte HR zu prüfen. Die Expression von *ubr48* inhibiert die Polyubiquitinierung, da eine Ubiquitin-Ubiquitin-Verknüpfung über den Lysinrest 48 nicht mehr möglich ist (Abb. 15). Für die Proteasom-vermittelte

Proteolyse sind jedoch mindestens vier aneinander gekoppelte Ubiquitin-Einheiten am Zielprotein notwendig (Thrower *et al.*, 2000). Die Überexpression dieses *ubr48*-Konstrukts führte zur Abschwächung der Bs4-vermittelten HR. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Polyubiquitinierung für die Bs4-HR. Wäre Bs4 selbst polyubiquitiniert, so wäre bei Überexpression von *ubr48* der Bs4-Abbau supprimiert und eine Bs4-Akkumulation zu erwarten. Interessanterweise waren aber die Bs4-Mengen reduziert (Abb. M3-12). Das bedeutet, dass Bs4

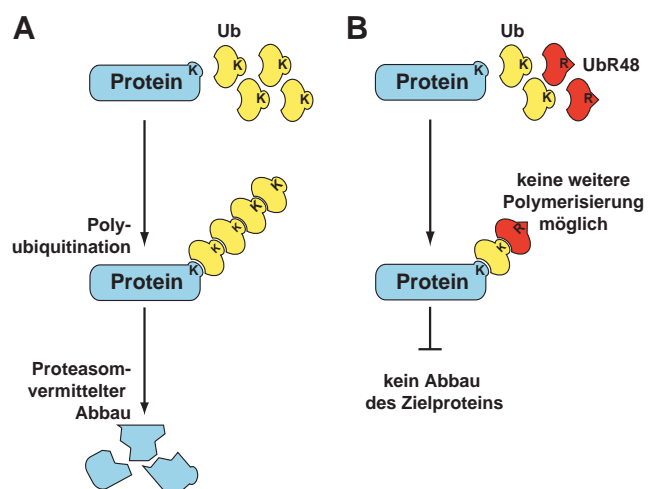


Abb. 15. Funktionsprinzip von ubR48 (A) Kovalente Bindung von Ubiquitin (Ubi) an Lysinreste (K) des Zielproteins und weitere Ubi-Ubi-Verknüpfung über K48 führt zur Polyubiquitinierung, einer Markierung für den Proteasom-vermittelten Abbau. (B) Bei *ubr48* ist K48 durch Arginin (R) ersetzt. Eine Ubi-Ubi-Verknüpfung ist dadurch nicht mehr möglich. Wird *ubr48* in die Poly-Ubi-Kette integriert, so kommt es zum Abbruch der Polymerisierung und damit je nach *ubr48*-Menge zur mehr oder weniger starken Inhibition des Proteasom-vermittelten Abbaus aller Ubi-markierten Proteine.

wahrscheinlich nicht selbst polyubiquitiniert wird. Da auch für RPM1 eine Elicitor-induzierte Reduktion der Proteinmenge beobachtet wurde, prüfte man dort den Einfluss des Ubiquitin/Proteasom-Abbaus auf die Resistenz mittels chemischer Inhibierung durch Geldanamycin. Es wurde zwar ein Funktionsverlust, aber keine Akkumulation von RPM1 nachgewiesen (Holt *et al.*, 2005). Demnach werden wahrscheinlich sowohl RPM1-, als auch Bs4-Mengen Ubiquitin-unabhängig reguliert.

3.9. Die Blockierung der Ubiquitinierung hat einen indirekten Effekt auf die Bs4-Funktion.

Die Überexpression von *ubr48* zeigte nicht nur einen Einfluss auf die Bs4-HR sondern beeinträchtigte auch die HRs aller anderen getesteten NB-LRR-Proteine (Abb. M3-12). Dies deutet auf eine Beeinflussung gemeinsamer Signalkomponenten der NB-LRR-vermittelten HR hin. Die Tatsache, dass *ubr48* keinen Einfluss auf die AvrBsT-induzierte HR in *N. benthamiana* hatte, lässt vermuten, dass das korrespondierende R-Protein nicht zum NB-LRR-Typ gehört.

Es kann angenommen werden, dass die *ubr48*-Überexpression zur Akkumulierung zahlreicher z. T. falsch gefalteter Proteine führt, die normalerweise über das Proteasom abgebaut werden. Die verstärkt vorhandenen Proteine sind zusätzliche Klienten des Hsp90-

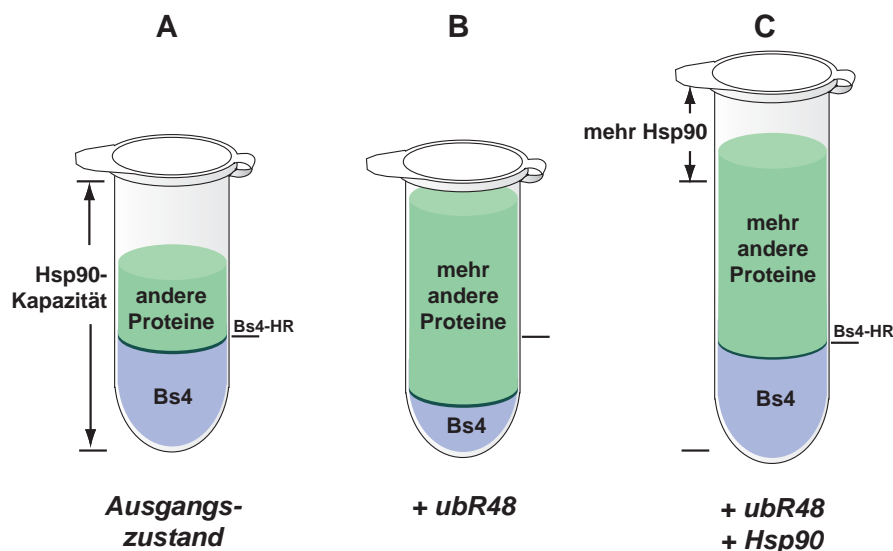


Abb. 16. Dosis-Modell des *ubr48*-Einflusses auf die Bs4-HR. (A) Viele pflanzliche Proteine benötigen Hsp90 als Chaperon. Bs4 erreicht durch Hsp90 eine für die Erkennung und HR kritische Menge. (B) Die *ubr48*-Expression blockiert die Polyubiquitinierung und führt dadurch zu Akkumulation fehlerhafter Proteine, die Hsp90-Klienten sind. Für Bs4 steht dann nicht genügend freies Hsp90 zur Verfügung. Bs4-Mengen und -HR sind reduziert. (C) Zusätzliche Hsp90-Überexpression stellt genügend freies Hsp90 bereit, um sowohl höhere Mengen an nicht abgebauten Proteinen abzudecken, als auch ausreichend erkenntnis-kompetentes Bs4 zu generieren. Dadurch sollte die Bs4-HR wieder hergestellt sein.

Chaperons, so dass die Menge an verfügbarem Hsp90 für Bs4 reduziert ist (Abb. 16A,B). Demnach wäre Hsp90 der Mediator des *ubr48*-Expressionseffekts auf die Bs4-HR. Sollte diese Hypothese zutreffen, so müssten höhere Mengen an Hsp90 den *ubr48*-Effekt auf die Bs4-HR ausgleichen. Trotz Überexpression von *ubr48* wäre dann noch ausreichend Hsp90 vorhanden, um Bs4 zu stabilisieren und eine Bs4-HR auszulösen (Abb. 16C). Tatsächlich deuten vorläufige Daten daraufhin, dass bei gemeinsamer Überexpression von *Hsp90* und *ubr48* die *ubr48*-bedingte Bs4-HR-Reduktion nicht mehr nachweisbar ist (S. Schornack & T. Lahaye, unveröffentlicht).

Würde Bs4 nicht durch ausreichend Hsp90 stabilisiert, kann Bs4 keine AvrBs4-Erkennung und HR vermitteln. Diese postulierte Notwendigkeit einer Bs4-Mindestmenge für die HR wird unterstützt durch *Bs4*-Expressionsdaten unter Verwendung unterschiedlich starker Promotoren. Die *Bs4*-Expression unter Kontrolle eines schwachen Promotors war nicht ausreichend für eine Bs4-HR (Abb. M2-4, M2-5). Da *Hsp90* von einigen NB-LRR-Proteinen für die Funktion benötigt wird, lässt sich der nachgewiesene negative Einfluss der *ubr48*-Expression auf die HRs anderer NB-LRR-Proteine erklären (Abb. M3-12). Interessanterweise wurde bei erhöhten Temperaturen eine Mengenreduktion der R-Proteine Mla1 und Mla6 aus Gerste nachgewiesen (Bieri *et al.*, 2004). Dies könnte durch den temperaturbedingt höheren Bedarf an Hsp90 für andere Proteine und die dadurch reduzierte Menge an freiem Hsp90 für Mla1 und Mla6 verursacht worden sein.

3.10. Das Bs4-AvrBs4-System birgt einige ungelöste Fragen und bietet vielfältige Möglichkeiten zur weiteren Charakterisierung

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bieten eine solide Basis für fortführende Experimente mit Bs4. Da Bs4 ein Vertreter der größten R-Protein-Klasse der NB-LRR Proteine ist, könnten die Ergebnisse einen Erkenntnisgewinn für andere R-Gene bringen.

Wichtige Aspekte wären z. B. proteinbiochemische Arbeiten zur Klärung der Bs4-Erkennungsspezifität und evolutionäre *Bs4*-Analysen. Die Verfügbarkeit von AvrBs3-ähnlichen Proteinen und zahlreichen davon abgeleiteten Derivaten bietet eine einmalige Ressource zur Eingrenzung des Avr-Erkennungsspektrums. Dieses könnte auch zusammen mit weiteren *Bs4*-sequenzhomologen Genen getestet werden, da die *Bs4*-vermittelte Resistenz und *Bs4*-ähnliche Sequenzen in allen bisher untersuchten *Lycopersicon*-Arten gefunden wurden. *Bs4* liegt als Einzelkopie im Tomaten-Genom vor (Schornack *et al.*, 2004). Dies erleichtert die PCR-basierte Amplifikation von *Bs4*-Allelen aus verschiedenen

Tomaten-Spezies. Zusammen mit transienten *Agrobacterium*-vermittelten Expressionen in *N. benthamiana* besteht die Möglichkeit, diese *Bs4*-Allele und ihre Sequenz-Funktions-Beziehungen zu analysieren. Dafür können auch verfügbare genetische Ressourcen in Tomate (z. B. Mutanten- und TILLING-Bibliotheken) verwendet werden, da die dort verwendeten Tomaten-Linien mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso ein funktionales *Bs4*-homologes Gen tragen.

Die PCR-basierte Mutagenese von *Bs4*-Abschnitten und *avrBs4*-Derivaten ist eine weitere Möglichkeit, um kritische AS-Reste für die *Bs4*-Autoaktivierung oder die *AvrBs4*-Erkennungsspezifität zu identifizieren. Aussagen zur funktionellen Relevanz generierter Mutationen können durch Analysen der Domänen-Interaktion und der Proteinstabilität getroffen werden. Reporter-Assays ohne arbeits- und zeitaufwendige Protein-Extraktion und Immunoblots sind langfristig für Hochdurchsatz-Sichtungen nach Mutanten notwendig. Eine Möglichkeit wären Fluoreszenz-basierte Reporter, z.B. YFP-Hälften an beiden Enden von *Bs4*, die nur bei intramolekularer Interaktion ein Fluoreszenzsignal abstrahlen. Auf diese Weise wäre auch die Suche nach weiteren pflanzlichen Proteinen möglich, die einen Einfluss auf die Regulationsmechanismen und die *Bs4*-vermittelte Erkennung von *AvrBs4* haben könnten.

Die biochemische Aufreinigung von *Bs4*-haltigen Proteinkomplexen über Epitop-Markierung könnte zur Identifizierung von beteiligten Proteinen in der Pflanze verwendet werden. Die Charakterisierung solcher Komplexe könnte Einblicke in den, im Vergleich zur *Bs4*-Regulation, bisher noch unzureichend verstandenen Mechanismus der *Avr*-Erkennung zu geben.