

**Identifizierung und Analyse von Protein-Interaktionen des Typ III-
Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Doreen Gürlebeck

geboren am 16.02.1977 in Karl-Marx-Stadt

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bonas

2. Prof. Dr. D. Scheel

3. Prof. Dr. M. Hahn

Verteidigung: 28.03.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011569

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011569>]

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert.

Gürlebeck D., Szurek B., Bonas U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* 42: 175-187

Büttner D., Gürlebeck D., Noël L., Bonas U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* 54: 755-768

Zusammenfassung

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) transloziert mindestens 20 Effektorproteine durch ein spezialisiertes Typ-III-Sekretionssystem in die pflanzliche Wirtszelle. AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 sind drei dieser Typ-III-Effektoren, welche aufgrund ihrer Fähigkeit, in resistenten Pflanzen eine HR auszulösen, als Avirulenzproteine bezeichnet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden deren Primärfunktionen als Virulenzfaktoren des Pathogens untersucht. Im Vordergrund stand die Analyse von AvrBs3, einem der bestuntersuchten Typ-III-Effektoren aus *Xcv*. Im Mittelpunkt stand dabei die Identifizierung und Analyse von Proteinen, die mit AvrBs3 interagieren. Es wurde gezeigt, dass AvrBs3 mit dem *Xcv*-Typ-III-Chaperon HpaB interagiert, welches die Sekretion des Effektorproteins begünstigt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der zentralen „Repeat“-Region Homodimere bildet. Die Interaktion zwischen AvrBs3 und Importin $\alpha 1$ aus *Capsicum annuum* (CaIMP $\alpha 1$), welches den Kernimport des Effektors vermittelt, wurde *in planta* gezeigt. In Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen einer cDNA-Bank aus *Lycopersicon esculentum* mit AvrBs3 als Köderprotein wurden zwei interessante, pflanzliche Proteine identifiziert, welche potentielle Virulenzzielproteine von AvrBs3 darstellen und eine Rolle für die Virulenz von *Xcv* spielen könnten: Der Interaktor LeThiC ist vermutlich an der Thiaminbiosynthese beteiligt und Aip8 („protein interacting with AvrBs3 8) zeigt Ähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator aus *Arabidopsis*. Mikroskopische Studien nach *Agrobacterium* vermittelter Expression von *avrBs3* in *Nicotiana benthamiana* zeigten, dass AvrBs3 eine erhöhte Transkriptionsaktivität in den Zellkernen bewirkt. Vergleichende mikroskopische Analysen von Pflanzenzellen, die *avrBs3*, *avrBs1* oder *avrBs4* exprimieren, ergaben außerdem, dass AvrBs1 eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen induziert wie AvrBs3. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass AvrBs1 und AvrBs3 eine Erhöhung des Ionenaustritts aus *N. benthamiana*-Zellen bewirken. Das AvrBs3-Familienmitglied AvrBs4 induziert dagegen weder eine starke Zellvergrößerung noch einen verstärkten Ionenaustritt, jedoch eine Erhöhung des Katalasegehaltes in Peroxisomen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass AvrBs3 eine supprimierende Wirkung auf die durch AvrBs1 induzierte HR in *Bs1*-enthaltenden Paprikapflanzen hat.

Summary

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*) translocates at least 20 effector proteins through a specialized type III secretion system into the plant host cell. Among these are AvrBs1, AvrBs3 and AvrBs4, type III effectors that were termed avirulence proteins because of their ability to induce the HR in resistant plants. In the present work, the primary functions of these effectors were studied which are proposed to enhance the virulence of the pathogen. The main focus of this work was the analysis of AvrBs3, a well-studied type III effector of *Xcv*. The central question dealt with the identification and analyses of proteins interacting with AvrBs3 (Aip). First, the interaction of AvrBs3 with HpaB, a type III chaperone which promotes the secretion of the effector, was shown. Secondly, the present analyses revealed that AvrBs3 homodimerizes in the plant cell cytoplasm, mediated by the central repeat region of the effector. The interaction of AvrBs3 with Importin α 1 from *Capsicum annuum* (CaIMP α 1), which mediates the import of the effector into the plant cell nucleus, was demonstrated *in planta*. In yeast two-hybrid screens using AvrBs3 as bait two interesting proteins from *Lycopersicon esculentum* were identified displaying potential virulence targets of AvrBs3: LeThiC, probably an enzyme of the thiamine synthesis, and Aip8, a putative transcriptional regulator. Furthermore, microscopic studies following *Agrobacterium*-mediated transient expression of *avrBs3* in *Nicotiana benthamiana* revealed that AvrBs3 causes enhanced transcription activity in plant cell nuclei. Comparative microscopic analyses of cells expressing *avrBs3*, *avrBs1* or *avrBs4* showed that AvrBs1 induces a similar enlargement of mesophyll cells as AvrBs3. Physiological analyses revealed that AvrBs1 and AvrBs3 also cause increased ion leakage in *N. benthamiana*. However, the AvrBs3 family member AvrBs4 showed almost no effect on cell size or ion leakage, but induces an increased content of catalase in peroxisomes. Furthermore, a cell death suppressing activity of AvrBs3 was observed in *Bs1* pepper plants after delivery of AvrBs3 and AvrBs1 by *Xcv*.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema arbeiten zu können. Ich bedanke mich für Ihre Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen und das rege Interesse am Fortschreiten der Experimente.

Vielen Dank an Prof. Dinesh Kumar, Dr. Gerd Hause, Dr. Robert Kramell, Dr. Bettina Hause, Dr. Hauke Lilie, Dr. Bernhard Sielaff und Prof. J. Andreesen, die mir kooperativ und hilfsbereit bei der Verwirklichung von Experimenten zur Seite standen. Ganz besonders danke ich Dr. Gerd Hause und Dr. R. Kramell, die wesentlich zur Realisierung während dieser Arbeit durchgeführter Projekte beigetragen haben. Ich bedanke mich herzlich bei Prof. R. B. Klösgen, Dr. B. Hause, Dr. Gerd Hause und Prof. J. Andreesen für die Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit. Ich bedanke mich bei Dr. Anne Ousbourne für die hilfreichen Kommentare zum „Dimerisierungs-Manuskript“. Bei Boris bedanke ich mich für die exzellente Betreuung in den ersten Monaten der Arbeit und das anhaltende Interesse und seine Hilfsbereitschaft in den darauf folgenden Jahren. Danke für die vielen wissenschaftlichen und motivierenden Diskussionen. Merci. Ganz besonders möchte ich mich bei Eric für das Korrekturlesen des „Virulenz-Manuskriptes“ bedanken. Danke, dass du so bist, wie du bist! Merci beaucoup. Ein großer Dank gilt Daniela Büttner für ihre Hilfe, ihre Unterstützung, ihre Anwesenheit. Dankeschön! Thomas Lahaye, Sebastian Schornack, Ernst Weber, Jens Boch und Ralf Koebnik danke ich für kritische, fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen während dieser Arbeit. Für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei all den auftretenden Computer-Problemen bedanke ich mich bei Robert, Sebastian und Frank. Ich danke Bianca für ihren grünen Daumen und die hervorragende Organisation und Marina für die schnellen Bestellungen außer der Reihe. Boris, Carola, Eric, Lucía, Virginie, Johannes, Alex, Simone, Tina und Ernst: es hat Spaß gemacht, mit euch im Labor zu arbeiten! Danke für all die lustigen Momente zwischendurch. Danke für die Musik. Danke, Tina, danke Steffi, danke Larissa - für die sportlichen Momente im Wasser und im Park. Luce, ma puce, ich danke dir hundertmal für die aufbauenden, motivierenden Gespräche und die schönen Tage mit dir. Muchas gracias! Ich danke besonders herzlich meinen Freunden und meiner Familie. Danke, Tom, für die letzten Jahre. Danke Iv, Norman und Julia für die energetisierenden Wochenenden! Danke Leopold, für dein Verständnis in den letzten Monaten.

Ich danke allen, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. Interaktionen zwischen phytopathogenen Bakterien und deren Wirtspflanzen	1
1.2. Basale Abwehrmechanismen der Pflanze (Nichtwirtsresistenz).....	1
1.3. Spezifische Resistenzmechanismen bei Pflanzen (Wirtsresistenz).....	2
1.3.1. Genetische Grundlage der Wirtsresistenz bei Pflanzen.....	3
1.3.2. Modelle für molekulare Mechanismen zur Erkennung von Avr-Proteinen durch pflanzliche R-Proteine	4
1.4. Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren Gram-negativer phytopathogener Bakterien	6
1.4.1. Das T3SS wird durch die <i>hrp</i> -Gene kodiert.....	7
1.4.2. Der Aufbau des T3SS phytopathogener Bakterien	9
1.4.3. Die Substrate des T3SS: Harpine und Effektorproteine.....	11
1.4.3.1. Die Sekretion der Typ-III-Substrate	11
1.4.3.2. Die Translokation der Effektorproteine.....	12
1.4.3.3. Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr durch Effektorproteine	13
1.4.3.4. T3-Effektoren mit enzymatischer Funktion.....	15
1.4.3.5. Wirkung individueller Effektoren bei der Etablierung der Krankheit und der Ausbreitung des Pathogens.....	17
1.5. Das Modellsystem <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	17
1.6. Das Effektorprotein AvrBs3 aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	19
1.7. Ziele der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen	25
2.2. Verwendete Pflanzen.....	25
2.3. Infiltration von Pflanzen.....	26

2.4. Konstruktion von Plasmiden mittels GATEWAY-Technologie.....	26
2.5. Hefe-Di-Hybrid-Analysen.....	28
Erstellung der Plasmide für Expression von Genen in Hefe	31
Erstellung und Sichtung der Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate	32
2.6. Interaktionsstudien <i>in vitro</i>	33
Erstellung von Plasmiden zur Genexpression in <i>E. coli</i>	34
2.7. Interaktionsstudien <i>in planta</i>	34
2.7.1. Kolokalisierungsstudien	34
2.7.2. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).....	35
2.7.3. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	36
2.7.4. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation (KoIP)	37
Erstellung von Plasmiden zur Expression von Genen in Pflanzen.....	38
2.8. Virus induziertes Gen-„Silencing“ (VIGS).....	39
Erstellung von Plasmiden für Virus induziertes Gen-„Silencing“ in Pflanzen	40
2.9. Bestimmung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen.....	41
2.10. Licht- und Elektronenmikroskopie.....	41
2.11. Physiologische Vitamin B1-Komplementations-Analysen.....	42
2.12. Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Pflanzen.....	42
2.12.1. Extraktion der Thiamin-Verbindungen	42
2.12.2. HPLC-Bedingungen	43
2.13. Statistische Auswertungen	44
2.14. Silberfärbung, Native Gel-Elektrophorese und Westernblot.....	44
2.15. 5'- und 3'- RACE (“rapid amplification of cDNA ends”)	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Sekretion aus dem Bakterium: Wie wird die Sekretion von AvrBs3 gesteuert?.....	46
3.1.1. Das Typ-III-Chaperon HpaB interagiert mit dem N-Terminus von AvrBs3	46
3.1.1.1. Einführung und Vorarbeiten	46
3.1.1.2. Untersuchung der HpaB-AvrBs3 ₁₋₅₀ -Interaktion <i>in vitro</i>	46
3.2. Ankunft des Effektors in der Pflanzenzelle - Interaktionspartner von AvrBs3 im pflanzlichen Zytoplasma.....	48
3.2.1. AvrBs3 dimerisiert im Zytoplasma der Pflanzenzelle	48

3.2.1.1. Einführung und Vorarbeiten	48
3.2.1.2. AvrBs3 interagiert mit AvrBs3 in Hefe	48
3.2.1.3. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion erfolgt auch <i>in vitro</i>	49
3.2.1.4. Die Koexpression von mutanten <i>avrBs3</i> -Derivaten <i>in planta</i> induziert die hypersensitive Reaktion.....	50
3.2.1.5. AvrBs3-Moleküle interagieren im pflanzlichen Zytoplasma	51
3.2.1.6. Die zentralen „Repeats“ vermitteln die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion	53
3.2.1.7. Eine Region von 5,5 „Repeats“ erlaubt eine AvrBs3-AvrBs3 Interaktion in Hefe	54
3.2.1.8. Die putativen Leucin-Zipper-„Repeats“ sind nicht an der Dimerisierung von AvrBs3 beteiligt.....	55
3.2.1.9. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird nicht durch Disulfidbrücken vermittelt.....	57
3.2.1.10. Wie viele AvrBs3-Moleküle sind im Oligomer enthalten?	58
3.2.1.11. Die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion wird auch <i>in planta</i> von der „Repeat“-Region vermittelt	59
3.2.2. AvrBs3 interagiert mit Importin α in der Pflanze	60
3.2.2.1. Einführung und Vorarbeiten.....	60
3.2.2.2. Untersuchung der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion in Hefe mittels GATEWAY-Technologie	60
3.2.2.3. CaIMP α 1 und AvrBs3 lokalisieren im gleichen Kompartiment der Pflanzenzelle....	62
3.2.2.4. AvrBs3 und CaIMP α 1 koimmunoprecipitieren NLS abhängig aus pflanzlichem Proteinextrakt	64
3.2.2.5. Nachweis der AvrBs3 Δ 2-CaIMP α 1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen.....	65
3.2.3. Isolierung neuer AvrBs3-Interaktoren aus Tomate	68
3.2.3.1. Einführung und Vorarbeiten.....	68
3.2.3.2. Wahl und Erstellung der cDNA-Bank.....	68
3.2.3.3. Wahl und Konstruktion geeigneter Köderproteine.....	69
3.2.3.4. Die Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3 Δ 2 Δ NLS::SV40NLS als Köder	72
3.2.3.5. Aip6 interagiert spezifisch mit der „Repeat“-Region von AvrBs3.....	73
3.2.3.6. <i>Aip6</i> kodiert für ein Thiaminbiosyntheseprotein C-Homolog	74
3.2.3.7. LeThiC interagiert mit AvrBs3 in Hefe unabhängig von den fusionierten Aktivierungs- und DNA-Bindedomänen.....	76
3.2.3.8. LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Effektor-Familie.....	79
3.2.3.9. LeThiC ist im Zytoplasma lokalisiert.....	80
3.2.3.10. Interagiert AvrBs3 mit LeThiC <i>in planta</i> ?	81
Kolokalisieren AvrBs3 und LeThiC?.....	81
Untersuchung der LeThiC-AvrBs3-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation	84
3.2.3.11. Interagiert LeThiC mit AvrBs3 <i>in vitro</i> ?.....	85
3.2.3.12. Untersuchung der biologischen Bedeutung der AvrBs3-LeThiC-Interaktion	86
Silencing von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>N. benthamiana</i>	87
Silencing von <i>LeThiC</i> -Homologen in Paprika.....	89
3.2.3.13. LeThiC ist an der Vitamin B1-Synthese in Pflanzen beteiligt.....	90
3.2.3.14. Verändert AvrBs3 den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzenzellen?.....	92
Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Tomate, Paprika und Tabak.....	92
Untersuchung des Einflusses von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt von Pflanzen	93
3.3. Ankunft des Effektors am Zielort: Suche nach kernlokalisierten AvrBs3-Interaktoren	95
3.3.1. Sichtung der cDNA-Bank aus Tomate mit AvrBs3-LZ als Köder.....	95
3.3.2. Untersuchung der AvrBs3-LZ-Interaktoren in Hefe	97

3.3.3. Sequenzanalyse der identifizierten cDNA-Fragmente aus Tomate.....	98
3.4. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus <i>Xcv</i>	100
3.4.1. Einführung und Vorarbeiten.....	100
3.4.2. AvrBs1 und AvrBs3 lösen Chlorosen in der Pflanze aus.....	101
3.4.3. AvrBs1 verursacht eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen wie AvrBs3.....	102
3.4.4. Das Zellwachstum ist mit einer Vergrößerung der Vakuole verbunden	104
3.4.5. Untersuchung des Einflusses von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Ultrastruktur der Organellen.....	105
3.4.6. AvrBs1 induziert nekrotische Reaktionen im Pflanzengewebe	106
3.4.7. AvrBs4 verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in den Peroxisomen	107
3.4.8. AvrBs3 verursacht eine sichtbar erhöhte Transkriptionsaktivität in den Zellkernen	107
3.4.9. AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR unterdrücken.....	109
3.4.10. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren einen erhöhten Ionenaustritt aus <i>N. benthamiana</i> -Zellen	110
4. Diskussion und Ausblick.....	112
4.1. Der Weg des Typ-III-Effektors AvrBs3: von der Sekretion aus dem Bakterium bis zur Wirkung als Transkriptionsfaktor in der Pflanze	112
4.1.1. HpaB beeinflusst die Sekretion von AvrBs3 durch Interaktion mit dem N-Terminus des Effektors in <i>Xcv</i>	112
4.1.2. AvrBs3 formt Homodimere durch Interaktion der zentralen „Repeats“ im Zytoplasma der Pflanzenzelle	115
4.1.3. CaIMP α 1 interagiert mit dem NLS-Bereich des Effektorproteins AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle	119
4.1.4. Hemmt AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese im Zytoplasma?	123
4.1.5. Interagiert AvrBs3 im Zellkern mit pflanzlichen Proteinen?.....	127
4.2. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus <i>Xcv</i> : unterschiedliche Proteine mit ähnlicher Wirkung?	129
4.2.1. AvrBs3 und AvrBs4 können vermutlich der pflanzlichen Abwehr entgegenwirken.....	129
4.2.2. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren eine Hypertrophie der Mesophyllzellen.....	133
4.2.3. AvrBs3 induziert stärkere Transkriptionsaktivitäten in den Nukleoli als AvrBs4.....	136
4.2.4. Ein erhöhter Austritt von Ionen aus Wirtszellen erfolgt nicht nur während der HR.....	137
5. Literatur.....	141

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Modelle zur spezifischen Erkennung bakterieller Avirulenzproteine durch pflanzliche Resistenzproteine.	5
Abbildung 2: Modell der Interaktion zwischen Gram-negativen phytopathogenen Bakterien und ihren Wirtspflanzen.	8
Abbildung 3: Das T3SS von <i>Xcv</i>	10
Abbildung 4: Durch <i>Xanthomonas</i> ausgelöste Krankheiten auf Nutzpflanzen.	18
Abbildung 5: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> im Interzellularraum des Mesophylls einer infizierten Paprikapflanze.	19
Abbildung 6: Strukturelle Merkmale von AvrBs3 aus <i>Xcv</i>	21
Abbildung 7: Arbeitsmodell zur Wirkungsweise von AvrBs3 in der Wirtszelle.	23
Abbildung 8: Prinzip der Klonierung mittels GATEWAY-Technologie.	28
Abbildung 9: Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems und verwendete Reportergene.	30
Abbildung 10: Prinzip des GST-„pull-down“-Ansatzes.	34
Abbildung 11: Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Kom-plementation (BiFC).	36
Abbildung 12: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).	37
Abbildung 13: Prinzip der Koimmunopräzipitation (KoIP).	38
Abbildung 14 : Prinzip des Virus induzierten Gen-„Silencing“ (VIGS).	40
Abbildung 15: Strukturformeln von Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat. ...	43
Abbildung 16: HpaB interagiert mit den ersten 50 Aminosäuren von AvrBs3.	47
Abbildung 17: AvrBs3-Moleküle interagieren in Hefe.	49
Abbildung 18: AvrBs3-Moleküle interagieren <i>in vitro</i>	50
Abbildung 19: AvrBs3 Δ NLS-GFP kann durch AvrBs3 in den Nukleus der Pflanzenzelle importiert werden, nicht jedoch durch AvrBs3 Δ SphI.	52
Abbildung 20: Bestimmung der Proteinregion, welche die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion in Hefe vermittelt.	57
Abbildung 21: Die AvrBs3-Oligomerisierung erfolgt nicht durch Disulfidbrücken.	58
Abbildung 22: AvrBs3 bildet Dimere.	59
Abbildung 23: CaIMP α 1 interagiert mit AvrBs3 Δ 2 bei Verwendung der GATEWAY-Technologie.	61
Abbildung 24: Lokalisierung von CaIMP α 1 und Kolo-kalisierung mit AvrBs3 Δ 2.	64
Abbildung 25: CaIMP α 1 koimmunopräzipitiert mit AvrBs3 Δ 2 aus Pflanzenzellen.	65
Abbildung 26: Visualisierung der AvrBs3 Δ 2-CaIMP α 1-Komplexe in lebenden Pflanzenzellen mittels BiFC. (A)	67
Abbildung 27: Überprüfung der AvrBs3- und AvrBs4-Köderproteine.	71
Abbildung 28: Aip6 interagiert spezifisch mit AvrBs3 in Hefe.	72

Abbildung 29: Bestimmung der Aip6-Bindestelle in AvrBs3.	74
Abbildung 30: Die Vitamin B1-Synthese in E. coli.	75
Abbildung 31: Vergleich der isolierten cDNA-Fragmente mit Sequenzen aus der EST-TIGR-Datenbank.	76
Abbildung 32: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3 Δ 2 im GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System.	77
Abbildung 33: Das vollständige ThiC-Protein aus Tomate interagiert mit AvrBs3 Δ 2 im „interaction trap“-System.	78
Abbildung 34: LeThiC interagiert spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Familie.	79
Abbildung 35: LeThiC ist im Zytoplasma von Pflanzenzellen lokalisiert.	81
Abbildung 36: Kolokalisieren AvrBs3 Δ 2 und LeThiC in Pflanzenzellen?	83
Abbildung 37: LeThiC-FLAG bewirkt keine Retardierung von YFP-AvrBs3 im Zytoplasma von Pflanzenzellen.	84
Abbildung 38: AvrBs3 Δ 2 und LeThiC interagieren <i>in vitro</i>	86
Abbildung 39: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>N. benthamiana</i>	88
Abbildung 40: Phänotypische Auswirkungen des „Silencing“ von <i>LeThiC</i> -Homologen in <i>C. annuum</i> nach Infektion mit <i>Xcv</i>	90
Abbildung 41: LeThiC ist an der Vitamin B1-Synthese beteiligt.	91
Abbildung 42: Einfluss von AvrBs3 auf den Vitamin B1-Gehalt in Pflanzen.	94
Abbildung 43: Überprüfung der Synthese und Transkriptionsaktivität des Köderproteins BD-AvrBs3-LZ in Hefe.	96
Abbildung 44: Untersuchung der Induktion der Reportergene <i>ADE2</i> , <i>HIS3</i> und <i>lacZ</i> durch die Köder-Beute-Interaktionen.	97
Abbildung 45: Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Spezifität der Interaktionen der identifizierten Proteine mit AvrBs3-LZ, Lamin C und AvrBs3 Δ 2 in Hefe.	99
Abbildung 46: AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 lösen makroskopisch sichtbare Reaktionen in <i>N. benthamiana</i> aus.	101
Abbildung 47: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen eine starke Veränderung der Morphologie von Mesophyllzellen.	104
Abbildung 48: AvrBs1 und AvrBs3 verursachen ein Wachstum der Zentralvakuole in der Pflanzenzelle.	104
Abbildung 49: Einfluss von AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 auf die Organellen von <i>N. benthamiana</i> -Zellen.	105
Abbildung 50: AvrBs1 induziert das Absterben von Mesophyllzellen in <i>N. benthamiana</i>	106
Abbildung 51: Die Expression von <i>avrBs4</i> in <i>N. benthamiana</i> verursacht einen erhöhten Katalasegehalt in Peroxisomen von Mesophyllzellen.	107

Abbildung 52: AvrBs3 verursacht eine erhöhte Aktivität in Zellkernen von Pflanzenzellen.	109
Abbildung 53: AvrBs3 kann die durch AvrBs1 induzierte HR in <i>C. annuum</i> cv. ECW-10R unterdrücken.....	110
Abbildung 54: Messung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen nach Expression von <i>uidA</i> , <i>avrBs1</i> , <i>avrBs3</i> oder <i>avrBs4</i>	111
Abbildung 55: Aktuelles Modell zur Wirkungsweise von AvrBs3 aus <i>Xcv</i>	140

Tabellen:

Tabelle 1: Die Gen-für-Gen-Hypothese.....	3
Tabelle 2: Zelltod inhibierende T3-Effektoren phytopathogener Bakterien.	15
Tabelle 3: Analyse der Interaktion von AvrBs3 Δ 2 und CaIMP α 1 in Zellkernen mittels FRET.....	64

Abkürzungsverzeichnis

AD: „activation domain“, Aktivierungsdomäne
ADP: Adenosindiphosphat
As: Aminosäuren
ATP: Adenosintri-phosphat
avr, Avr: Avirulenz
BiFC: bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp: Basenpaare
Bs: „bacterial spot“
CDS: „cell death suppressing“, Zelltod unterdrückend
CFU: „colony forming units“
cDNA-AFLP: „complementary DNA amplified fragment length polymorphism“
CFP: „cyan fluorescent protein“, cyan fluoreszierendes Protein
DNA: „desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
ECW: „Early californian wonder“, Kultivar von *Capsicum annuum*
FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GFP: „green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
GST: Glutathion-S-Transferase
Hop: „*hrp* outer protein“
hpa, Hpa: „*hrp* associated“, *hrp*-assoziiert
HR: „hypersensitive response“, hypersensitive Antwort, hypersensitive Reaktion
hrc, Hrc: „*hrp* conserved“, *hrp*-konserviert
hrp, Hrp: „hypersensitive response and pathogenicity“, hypersensitive Antwort und Pathogenität
kb: Kilobasen
kDa: Kilodalton
KoIP: Koimmunopräzipitation
LZ: Leucin-Zipper
mRNA: „messenger RNA“, Boten-RNA
NLS: „nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
OD: optische Dichte
ORF: „open reading frame“, offener Leserahmen
PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR: „polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pv.: Pathovar
R, R: Resistenz
RNA: „ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rRNA: ribosomale RNA
SDS: Sodiumdodecylsulfat
spp.: Subspezies
T3SS: „type III secretion system“, Typ-III-Sekretionssystem
tRNA: Transfer-RNA
RT-PCR: "reverse transcribed PCR", Reverse Transkription und PCR
Xop: „*Xanthomonas* outer protein“
YFP: „yellow fluorescent protein“, gelb fluoreszierendes Protein
Yop: „*Yersinia* outer protein“