

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet: *Escherichia coli* Stamm DH10B (Life Technologies, Rockville, MD, USA), TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), BL21 und BL21(DE3) (319), die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV3101 und C58C1 (341) sowie die *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 82-8 (233), 85-10 (59) und I74A (221, 358), welcher eine Mutante des Stammes 85-10 ist, die langsamer in Kulturmedium und Pflanze wächst als der Wildtypstamm. Die verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme waren EGY48 (*MAT $\alpha$* ; 96), AH109 (*MAT $\alpha$* ; 159) und Y187 (*MAT $\alpha$* ; 69).

*E. coli*-Zellen wurden bei 37°C in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen, *A. tumefaciens* bei 30°C in Yeast-Extract-Broth (YEB)-Medium (205, 336), *X. campestris* pv. *vesicatoria* bei 30°C in Nutrient-Yeast-Glycerol (NYG)-Medium (75) und *S. cerevisiae* bei 30°C in Yeast Selection Drop Out (YSD)-Medium (18). Bei Anzucht auf festem Medium wurde 1,5% Agar zugesetzt. Die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte bei *E. coli* und *A. tumefaciens* mittels Elektroporation. In Hefen wurden Plasmide mit Hilfe der PEG-Lithiumacetat-Methode (119) oder durch Paarung eingeführt. Die Paarung zweier Hefestämme erfolgte nach den Angaben des MATCHMAKER-Protokolls (Clontech, Heidelberg, Deutschland).

### 2.2. Verwendete Pflanzen

Tomaten (*Lycopersicon esculentum*)-Pflanzen der Kulturvarietät (cv.) Moneymaker (MM), Paprika (*Capsicum annuum*)-Pflanzen cv. Early Cal Wonder (ECW) und die isogenen Linien ECW-10R und ECW-30R, welche das Resistenzgen *Bs1* bzw. *Bs3* (233) enthalten, sowie *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden wie beschrieben angezogen (47, 221).

Die transiente Expression von Genen in der Pflanze mittels *A. tumefaciens* erfolgte nach Van den Ackerveken et al. (1996).

### 2.3. Infiltration von Pflanzen

Für Transkomplementationsstudien, wurden *A. tumefaciens*-Stämme in Blätter von Paprika ECW-30R infiltriert. Die Phänotypen der Pflanzen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet.

Für Lokalisierungs-, Kolokalisierungs- und Interaktionsstudien wurden Blätter von *N. benthamiana*-Pflanzen mit dem *Agrobacterium* Stamm C58CI (pCH32/pBin6Ip19) (348) zur Unterdrückung des pflanzlichen „Silencing“ und den entsprechenden, die zu untersuchenden Proteine kodierenden Gene enthaltenden *Agrobacterium*-Stämme GV3101 infiltriert. Die Stämme wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 ( $2,5 \times 10^9$  Zellen/ml) miteinander gemischt und wie beschrieben infiltriert (336). Bei Mischen von 3 Stämmen ergab sich eine relative OD<sub>600</sub> von 0,33 ( $8,25 \times 10^8$  Zellen/ml) je Stamm. Für Lokalisierungsstudien wurde ein Stamm mit leerem Vektor zugegeben.

Für Gen-„Silencing“-Experimente wurde die Methode des Virus induzierten Gen-„Silencing“ angewendet (209). Dafür wurden die Agrobakterienstämme GV3101(TRV1) und GV3101(TRV2a) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 ( $1,5 \times 10^9$  Zellen/ml) angezogen und zu gleichen Teilen gemischt. Die Bakteriensuspension wurde mittels Vakuum in drei Wochen alte Pflanzen infiltriert.

*Xanthomonas*-Stämme wurden nach Anzucht auf festem NYG-Medium in 1 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und mit einer OD<sub>600</sub> von 0,01 ( $1,25 \times 10^7$  Zellen/ml) bis 0,2 ( $2,5 \times 10^8$  Zellen/ml) mittels nadelloser Spritze in die Blattunterseite von Paprikapflanzen infiltriert.

### 2.4. Konstruktion von Plasmiden mittels GATEWAY-Technologie

Die Erstellung einer Vielzahl der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte mittels GATEWAY-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Diese Methode ermöglicht eine schnelle und gerichtete Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Das GATEWAY-System nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ . Dafür wurden die für diese Rekombinationsreaktionen notwendigen „attachment“ (*att*)-Bereiche modifiziert und in verschiedene Vektoren integriert. Die resultierenden Zielvektoren enthalten *attR1*- und *attR2*-Stellen. Die für die Rekombination notwendigen homologen Bereiche *attL1* und *attL2* sind in Eingangsvektoren („Entry“-Vektoren) enthalten. Das zu untersuchende Gen

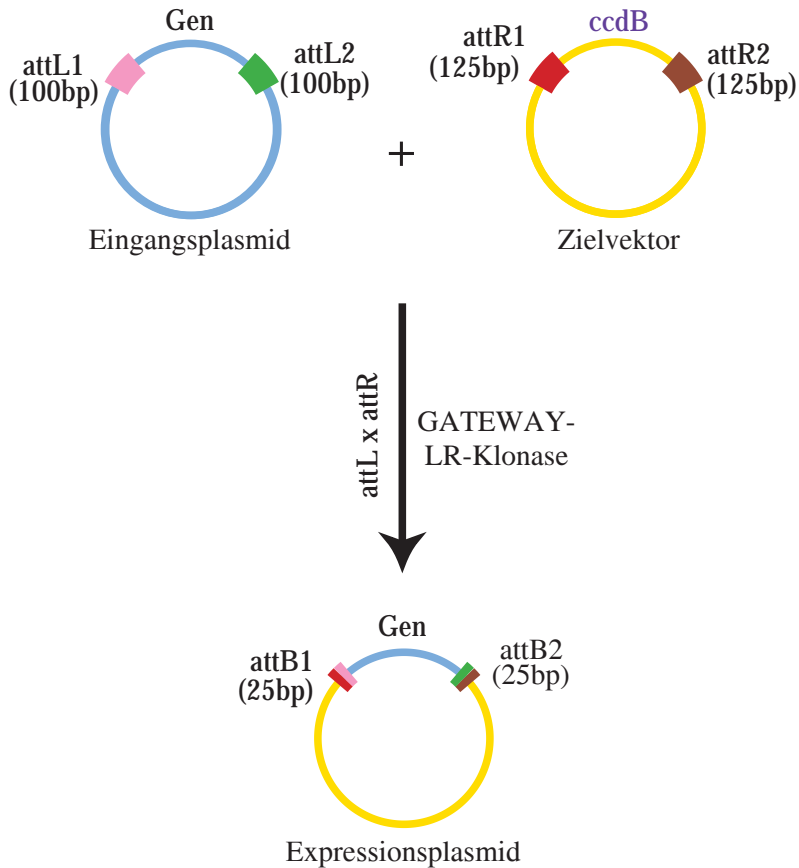
wird in einen Eingangsvektor kloniert. Anschließend erfolgt eine LR-Rekombinationsreaktion mit einem Zielvektor, welcher einen Promotor enthält, wodurch ein Expressionsplasmid generiert wird (Abbildung 8). In der *attR*-Kassette ist das *ccdB*-Gen integriert, dessen Expression in *E. coli* DH10B zur Hemmung der Gyrase führt. Durch die LR-Rekombination erfolgt ein Austausch des *ccdB*-Gens gegen das zu untersuchende Gen. Nach erfolgter Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH10B wachsen nur Bakterien, welche ein Expressionsplasmid enthalten.

Die erforderlichen Eingangsplasmide wurden wie folgt erstellt: Für das **AvrBs3**-Eingangsplasmid wurde der 5' Bereich von *avrBs3Δ2* mit den Oligonukleotiden 5'-GTCGACATGGATCTACGCACG-3', welcher eine *SalI* Schnittstelle einführt und 5'-AAGCTTTAACGGTGGACCTC-3', welcher eine *HindIII* Schnittstelle anfügt, amplifiziert. Nach Restriktionsverdau des PCR-Produktes, wurde das Fragment in pENTR-T (S. Schornack und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten) kloniert, so dass pENTR356N entstand. Die Oligonukleotide 5'-AAGCTTGCGTCTTTGCATGCATTC-3' und 5'-CTGCAGCTGAGGCAAT AGCTC-3' amplifizierten in einer PCR das 3' Ende von *avrBs3Δ2*, bei gleichzeitigem Anfügen einer *HindIII* bzw. einer *PstI* Erkennungssequenz. Das verdaute PCR-Fragment wurde in pENTR356N ligiert, um pENTR356NC zu erhalten. Anschließend wurde das *StuI/AgeI* Fragment von pBS356 (siehe unten) ausgeschnitten und in pENTR356NC kloniert, um das Eingangsplasmid pENTR356 zu erhalten. Des Weiteren wurde das *StuI/SacI* Fragment von pBS356ΔNLS (324) in das zuvor verdaute Plasmid pENTR356 ligiert, um pENTR356ΔNLS zu erhalten. Durch Restriktion von pENTR356 mit *SphI* und anschließender Religation wurde pENTR356ΔSphI erstellt. Somit konnten mittels GATEWAY-Rekombinationsreaktionen Plasmide für die Synthese von AvrBs3Δ2, AvrBs3Δ2ΔNLS und AvrBs3Δ2ΔSphI, welchem die gesamte „Repeat“-Region fehlt, erstellt werden.

Um ein Eingangsplasmid für Untersuchungen von *Caimpα1* erstellen zu können, wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-caccATGTCTCTTCGACCTAGCAC-3' und 5'-GCCAAACTTGAATCCACCTG-3' *Caimpα1* bzw. mit caccATGTCTCTTCGACCTAGCA C-3' und 5'-CTAGCCAAACTTGAATCCACCTGC-3' *Caimpα1stop* mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in pENTR/D-TOPO kloniert. Die resultierenden Plasmide pENTRCaimpα1 und pENTRCaimpα1stop wurden für Rekombinationen mittels GATEWAY-Technologie verwendet.

Für die Erstellung eines „**LeThiC**“-Eingangsplasmids wurde *LeThiC* mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-caccATGGCGTCTGTCCAAACTG-3' und 5'-CACATTCCTTTGGC

TCTTC-3' sowie 5'-caccATGGCGTCTGTCCAAACTG-3' und 5'-TACACATTCCTTTG GCTC-3' mittels PCR amplifiziert und in pENTR/D-TOPO kloniert, um die Plasmide pENTRLeThiC und pENTRLeThiCStop zu erstellen.



**Abbildung 8: Prinzip der Klonierung mittels GATEWAY-Technologie.**

Für die Expression von Genen in Hefe, in *E. coli* und in der Pflanze wurden die unterschiedlichen Expressionsplasmide mittels GATEWAY-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erstellt. Die Abbildung zeigt das Prinzip dieser Klonierungs-Technologie. Dabei werden zunächst die erforderlichen Eingangsplasmide generiert (siehe Text). Diese enthalten das zu untersuchende Gen, flankiert von den „attachment“-Stellen *attL1* und *attL2*. Die Eingangsplasmide werden jeweils mit den entsprechenden Zielvektoren, welche über *attR1*- und *attR2*-Stellen verfügen, gemischt. Durch Zugabe der GATEWAY-LR-Klonase erfolgt die Rekombination zwischen den *att*-Stellen. Dabei wird *ccdB* durch das zu untersuchende Gen ersetzt und das Expressionsplasmid mit *attB*-Stellen, sowie ein Nebenprodukt mit *ccdB*-Gen entstehen. Nach Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH10B können nur Zellen wachsen, welche kein *ccdB*-Gen enthalten. Das entstehende Nebenprodukt ist nicht dargestellt.

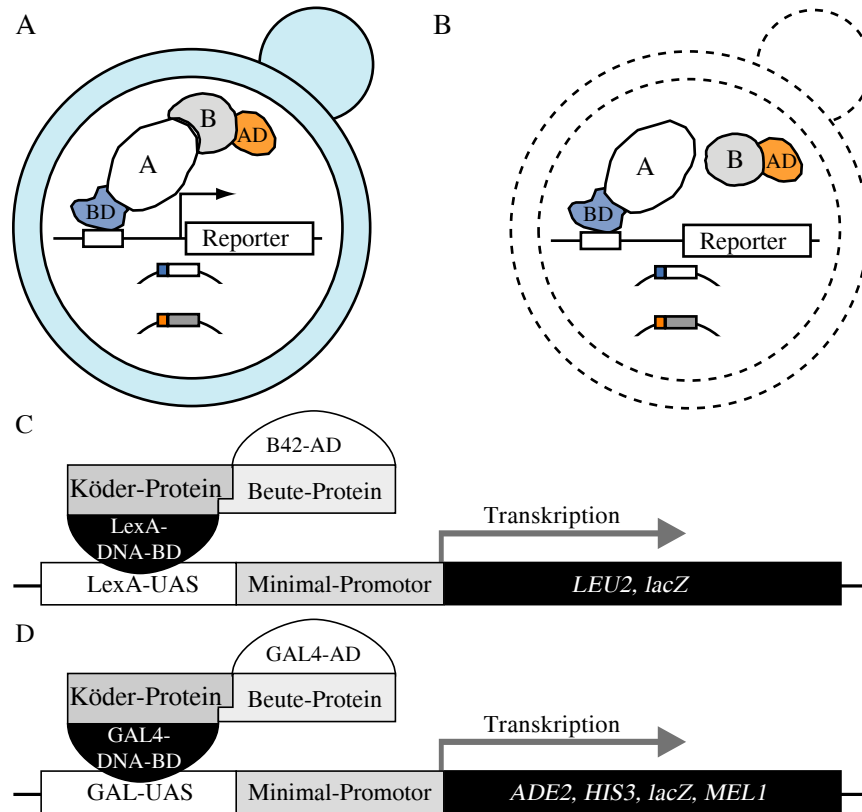
## 2.5. Hefe-Di-Hybrid-Analysen

Für direkte Interaktionsstudien wurde vorwiegend das “Hefe-interaction trap System” nach Gyuris *et al.* den Standardprotokollen (18, 135) folgend, verwendet (Abbildung 9A). Köder- (pEG202) und Beuteplasmide (pJG4-5) wurden in den Hefestamm EGY48,

welcher das  $\beta$ -Galaktosidase-Reporterplasmid pSH18-34 (18) enthält, kotransformiert. Im Genom dieses Stammes befindet sich mit *LEU2* ein zweites Reporter-gen (Abbildung 9C). Die Expression des Beutekonstruktes steht unter der Kontrolle eines Galaktose induzierbaren Promoters. Die Transformanten, welche auf selektivem Glukosemedium wuchsen, wurden auf Galaktosemedium mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X- $\beta$ -Gal) übertragen, um die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu ermitteln. Um auf Leucinprototrophie zu testen, wurden die Hefen auf Galaktose haltiges Medium ohne Leucin übertragen. Hefen, die ohne Leucin wachsen können und X- $\beta$ -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen, enthalten interagierende Köder-Beute-Komplexe. Dabei zeigt die Abhängigkeit von Galaktose, dass die Reporter-gene nur bei Anwesenheit des Beuteproteins angeschaltet wurden. Quantitative Analysen wurden nach Anzucht der Transformanten in Flüssigmedium durchgeführt. Dabei wurden je Konstrukt 3 bis 15 unabhängige Hefetransformanten über Nacht bei 30°C in selektivem Flüssigmedium mit Glukose angezogen. Die Übernachtskultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt und in induzierendem Galaktosemedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,0 kultiviert. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde unter Verwendung von o-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) bestimmt (18).

Für die Sichtung der Tomaten-cDNA-Bank und direkte Protein-Interaktionsstudien wurde außerdem das MATCHMAKER-GAL-4-Hefe-Di-Hybrid-System nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Abbildung 9B). Die Beuteplasmide (pGADT7-Rec2, in welchen die cDNA-Bank kloniert wurde; pGADT7att für direkte Interaktionsstudien) wurden in den Stamm Y187 transformiert. Nach Paarung mit dem Hefestamm AH109 wurden die diploiden Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert bzw. ausgestrichen, um auf Interaktion von Beute und Köder zu testen. Der Stamm AH109 enthält die Reporter-gene *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* und *lacZ* (Abbildung 9D). Y187 enthält ebenfalls das Reporter-gen *lacZ*. Bei Interaktion erfolgt die Aktivierung der Reporter-gene und die Hefezellen können ohne Adenin und Histidin wachsen und mit Hilfe der  $\alpha$ -Galaktosidase (auch: Melibiase) das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\alpha$ -D-Galactopyranosid (X- $\alpha$ -Gal) und, katalysiert durch die  $\beta$ -Galaktosidase, das Substrat X- $\beta$ -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. X- $\alpha$ -Gal wird dem Minimalmedium zugegeben, die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde mit Hilfe eines Übersichtungsansatzes wie folgt bestimmt: Die Hefezellen wurden auf Minimalmedium ausgestrichen und bei 30°C für drei Tage inkubiert. Die Hefe wurde mit Chloroform betropft, um die Zellen aufzuschließen.

Nach Verdunstung des Chloroforms erfolgte die Überschichtung mit einer Agarose-X- $\alpha$ -Gal-Lösung (1 mg/ml X- $\alpha$ -Gal, 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7, 0,3% Agarose), die Blaufärbung wurde über sechs Stunden beobachtet.



**Abbildung 9: Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems und verwendete Reportergene**

Dargestellt sind das generelle Prinzip des Hefe-Di-Hybrid-Systems zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die verwendeten Fusionsdomänen und Reportergene des „interaction trap“-Systems (135) und des MATCHMAKER-GAL4-Systems (Clontech, Heidelberg, Deutschland). **(A)** Die zu untersuchenden Proteine werden als Fusionsproteine in Hefe synthetisiert. Das Köderprotein A ist an eine DNA-Binde-Domäne (BD) fusioniert, welche an spezifische Operatorsequenzen bindet. Das Beuteprotein B ist an eine Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Interagieren Köder- und Beuteprotein, gelangen BD und AD in räumliche Nähe, und die Reportergene (Reporter) werden exprimiert. **(B)** Interagieren die Proteine nicht, so wird die Transkription der Reportergene nicht aktiviert, die Hefen wachsen nicht und produzieren keinen blauen Farbstoff. **(C)** Für Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels „Interaction trap“-System dient als BD die LexA-BD und als AD die B42-Domäne („acid blob“; 289). Die verwendeten Reportergene sind *LEU2* und *lacZ*, die verwendeten Vektoren pEG202 (Ködervektor), pJG4-5 (Beutevektor), pSH18-34 (*lacZ*-Reporterplasmid) und der Hefestamm EGY48 (18, 96). **(D)** Für Interaktionsstudien mit dem MATCHMAKER-GAL4-Hefe-Di-Hybrid-System liegen die Proteine an die GAL4-BD (Köder) bzw. die GAL4-AD (Beute) fusioniert vor. Als Reportergene dienen *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*. Es wurden die Vektoren pGADT7-Rec2 (cDNA-Bank-Vektor), pGADT7 (Beutevektor) und pGBKT7 (Ködervektor) verwendet sowie die Hefestämme Y187 (69) und AH109 (159).

### Erstellung der Plasmide für Expression von Genen in Hefe

Die verwendeten und neu erstellten Plasmide sind in Tabelle 3 im Anhang 1 aufgeführt. Die Konstruktion der für LexA-Hefe-Di-Hybrid-Studien verwendeten Plasmide wird im Folgenden erläutert. Für die Klonierung der ersten 150 bp von *avrBs3* in Hefevektoren wurde das *EcoRI/XhoI* Fragment von pBS*avrBs3*<sub>1-150</sub> (D. Büttner, unveröffentlichte Daten) in pEG202 und pJG4-5 (18), resultierend in pYB50 und pYP50, ligiert. pYBHpA und pYPHpA standen aus Vorarbeiten (L. Escolar, unveröffentlichte Daten) zur Verfügung.

Die Plasmide pYB356, pYB310 und pYB312, welche die Gene für AvrBs3 $\Delta$ 2, AvrBs3 $\Delta$ 3 und AvrBs3 $\Delta$ 3 $\Delta$ rep-312 enthalten, standen bereits zur Verfügung (324). In dieser Arbeit wurden weitere Deletionsderivate von AvrBs3 erstellt, denen unterschiedliche Bereiche der „Repeat“-Region fehlen. Dazu wurde das Plasmid pBS356 verwendet, welches *avrBs3* $\Delta$ 2 enthält. Für die Erstellung von pBS356 $\Delta$ SphI wurde pBS356 mit *SphI* geschnitten und religiert. Verschiedene Deletionsderivate von AvrBs3 lagen in pUC19 vor: pUS300 $\Delta$ rep-16, pUS300 $\Delta$ rep-9, pUS300 $\Delta$ rep-109, pUS300 $\Delta$ rep-27, pUS300 $\Delta$ rep-29, pUS300 $\Delta$ rep-21, pUS300 $\Delta$ rep-121 (45, 145). Diese kodieren für AvrBs3-Derivate, welchen die „Repeats“ 11-14, 5-7, 13-15, 7-16, 2-11, 2-13 bzw. 2-16 fehlen. Von diesen Plasmiden wurden die *StuI/AgeI* Fragmente mit dem von pBS356 ausgetauscht, um pBS356 $\Delta$ rep-9, pBS356 $\Delta$ rep-109, pBS356 $\Delta$ rep-27, pBS356 $\Delta$ rep-29, pBS356 $\Delta$ rep-21 und pBS356 $\Delta$ rep-121 zu erhalten. Für die Konstruktion von pBS356 $\Delta$ C wurde pBS356 mit *HincII* und *SacI* verdaut, glatte Enden erzeugt und religiert. Die gleichen Reaktionen wurden mit pBS310 durchgeführt, um pBS310 $\Delta$ C zu erstellen. Anschließend wurden die *EcoRI/XhoI* Fragmente der erstellten *avrBs3* Konstrukte in die Hefevektoren pEG202 (18) kloniert. Dies resultierte in den Plasmiden pYB356 $\Delta$ SphI, pYB356 $\Delta$ rep-16, pYB356 $\Delta$ rep-9, pYB356 $\Delta$ rep-109, pYB356 $\Delta$ rep-27, pYB356 $\Delta$ rep-29, pYB356 $\Delta$ rep-21, pYB356 $\Delta$ rep-121, pYB356 $\Delta$ C und pYB310 $\Delta$ C. Die Fragmente wurden außerdem in pJG4-5 kloniert, wodurch die Plasmide pYP356 $\Delta$ SphI, pYP356 $\Delta$ rep-16, pYP356 $\Delta$ rep-9, pYP356 $\Delta$ rep-109, pYP356 $\Delta$ rep-27, pYP356 $\Delta$ rep-29, pYP356 $\Delta$ rep-21, pYP356 $\Delta$ rep-121, pYP356 $\Delta$ C und pYP310 $\Delta$ C entstanden. Um pYB356N und pYP356N für die Expression der N-terminalen 143 Aminosäuren von AvrBs3 $\Delta$ 2 in Hefe zu erstellen, wurde pBS356 mit *MscI/HincII* geschnitten und religiert. Dies resultierte im Plasmid pBS356N, von welchem das *EcoRI/XhoI*-Fragment in pEG202 und pJG4-5 (18) kloniert wurden. Für pYBC, wurden

die 3' gelegenen 867 bp mit den Oligonukleotiden 5'-GGAATTCAGCAATGGCGGCG GCAG-3' und 5'-GCCTCGAGTCACTGAGGCAATA GC-3' mittels PCR amplifiziert, wobei eine *EcoRI*- sowie eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde zunächst in pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Das *EcoRI/XhoI*-Fragment des resultierenden Plasmides pTopoC wurde in die Hefevektoren pEG202 und pJG4-5 (18) kloniert.

Für die Klonierung von *Caimpα1* und *LeThiC* in die Vektoren des „interaction trap“-Systems wurden die Eingangsplasmide pENTRCaimpα1stop bzw. pENTRLeThiCstop für LR-Rekombinationsreaktionen mit dem Zielvektor pJCL (C. Lorenz und J. Boch, unveröffentlichte Daten) verwendet. Die Expressionsplasmide pJCLCaimpα1stop und pJCLLeThiCstop wurden in Hefe transformiert.

Für die Hefe-Di-Hybrid-Arbeiten mit dem MATCHMAKER-GAL4-System (Clontech, Heidelberg, Deutschland) wurden die Vektoren pGBKT7, pGADT7, pGADT7-Rec2 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) sowie pGBKT7att und pGADatt (A. Meyer, unveröffentlichte Daten) verwendet. Für die Generierung der Köderplasmide wurden die entsprechenden Fragmente durch Restriktion mit *EcoRI/XhoI* aus den bereits erstellten Köderplasmiden des „interaction trap“-Systems (siehe oben) erhalten und in den mittels *EcoRI/SalI* verdauten Vektor pGBKT7 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) ligiert.

*avrBs3-LZ* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'AGCAATGGCGGCGGCAGGCC3' and 5'GCAGCGTCCAGCACCGTGATGC3' mittels PCR amplifiziert, wodurch eine *EcoRI*- und eine *XhoI*-Schnittstelle angehängt wurden. Das PCR-Fragment wurde mittels *EcoRI* und *XhoI* geschnitten und in pGBKT7 und pGADT7 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) kloniert, um pGBKT7avrBs3-LZ und pGADT7avrBs3-LZ zu erhalten.

Für die Generierung von pGADattLeThiCstop wurde eine GATEWAY-Rekombinationsreaktion mit pGADatt und pENTRLeThiCstop durchgeführt (siehe oben).

### Erstellung und Sichtung der Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate

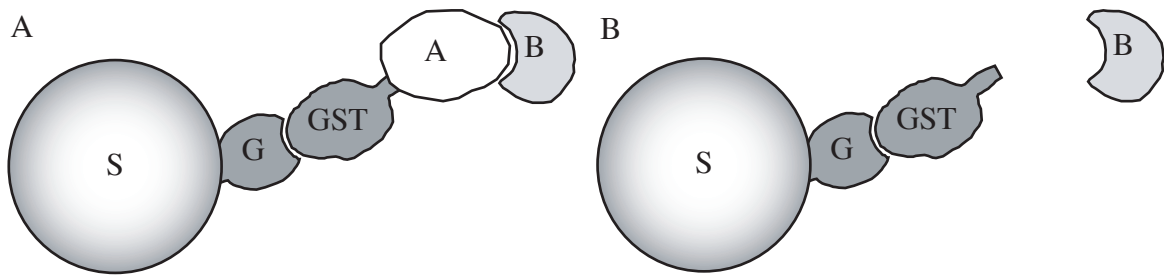
Die verwendete Hefe-Di-Hybrid-cDNA-Bank von Tomate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Simona Masiero und Dr. Hans Sommer am MPIZ Köln hergestellt. Gesamt-RNA wurde aus nicht infizierten Laubblättern 6 Wochen alter Tomaten (*Lycopersicon esculentum* cv. MM)-Pflanzen isoliert. Für die Generierung der cDNA-Bank wurde das GAL4-Hefe-Di-Hybrid-„MATCHMAKER Library Construction&Screening Kit“



(Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte sowohl mittels oligodT-Oligonukleotiden als auch mit zufällig generierten Oligonukleotiden. Die cDNA-Populationen wurden separat gehalten. cDNA-Fragmente mit einer Größe von 0,5-2,0 kb wurden ausgewählt. Beide cDNA-Populationen wurden durch subtraktive Hybridisierung normalisiert und in pGADT7-Rec2, den Angaben des Herstellers folgend (Clontech, Heidelberg, Deutschland), rekombiniert. Die Rekombination und Generierung erfolgen dabei im Hefestamm AH109. Der Stamm wurde nachfolgend in Reaktionsgefäße mit einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml abgefüllt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Sichtung der cDNA-Bank erfolgte mittels Hefe-Paarung wie im Protokoll des Herstellers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) beschrieben.

### **2.6. Interaktionsstudien *in vitro***

Für Interaktionsstudien *in vitro* wurde die Methode des GST-„pull-down“ verwendet (Abbildung 10). AvrBs3, AvrBs3<sub>1-50</sub> und LeThiC wurden als Glutathion-S-Transferase-(GST) Fusion in *E. coli* BL21 synthetisiert. AvrBs3 $\Delta$ 2FLAG und HpaB-c-Myc wurden ebenfalls in *E. coli* BL21 synthetisiert. Die Genexpression erfolgte unter der Kontrolle des *lac*-Promoters. Die entsprechenden Bakterienkulturen wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  angezogen, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt und bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit IPTG versetzt (Endkonzentration 1mM). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem PBS-Puffer (1/10 vol) resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. 150  $\mu\text{l}$  des bakteriellen Proteinextraktes, welcher GST, GST-AvrBs3, GST-AvrBs3<sub>1-50</sub> oder GST-LeThiC enthielt, wurde mit 2 ml des AvrBs3 $\Delta$ 2-FLAG bzw. HpaB-c-Myc enthaltenden Extrakt gemischt und mit 50  $\mu\text{l}$  Glutathionsepharose versetzt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen 5x mit je 5 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution spezifisch gebundener Proteine wurde den Angaben des Herstellers entsprechend bei RT mit 50  $\mu\text{l}$  10 mM reduziertem Glutathion durchgeführt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.



**Abbildung 10: Prinzip des GST-,pull-down“-Ansatzes.**

Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip eines GST-,pull-down“-Ansatzes, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu untersuchen. Das zu untersuchende Protein A wird als Fusion an die Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* synthetisiert. Die GST bindet an Glutathion (G), welches an Sepharose (S) gebunden ist. Die Elution des Komplexes erfolgt mittels reduziertem Glutathion, zu welchem die GST eine höhere Affinität aufweist als zu Glutathion. (A) Interagiert ein Protein B mit Protein A, so wird der gesamte Komplex an der Glutathionsepharose gebunden und aufgereinigt. (B) In einem Kontrollansatz wird das Protein B nur mit der GST inkubiert, wobei keine Interaktion erfolgen sollte.

### Erstellung von Plasmiden zur Genexpression in *E. coli*

Das Plasmid pGEX300, für welches das *EcoRI/XhoI* Fragment von pBS300 in pGEX-2TKM (58) ligiert wurde, stand zu Beginn der Arbeit für die Synthese von GST-AvrBs3 zur Verfügung (B. Szurek, unveröffentlichte Daten). Das *EcoRI/XhoI*-Fragment von pBSavrBs3<sub>1-50</sub> (D. Büttner, unveröffentlichte Daten) wurde in pGEX-2TKM kloniert. Die Plasmide pDS356F (324) und pDMhpaB (56) standen zur Expression von AvrBs3 $\Delta$ 2-FLAG bzw. HpaB-c-Myc zur Verfügung. Für die Synthese von GST-LeThiC in *E. coli* wurde pDEST15LeThiCstop mittels GATEWAY-Rekombination mit pENTRLeThiCstop (siehe oben) und pDEST15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) generiert.

## **2.7. Interaktionsstudien *in planta***

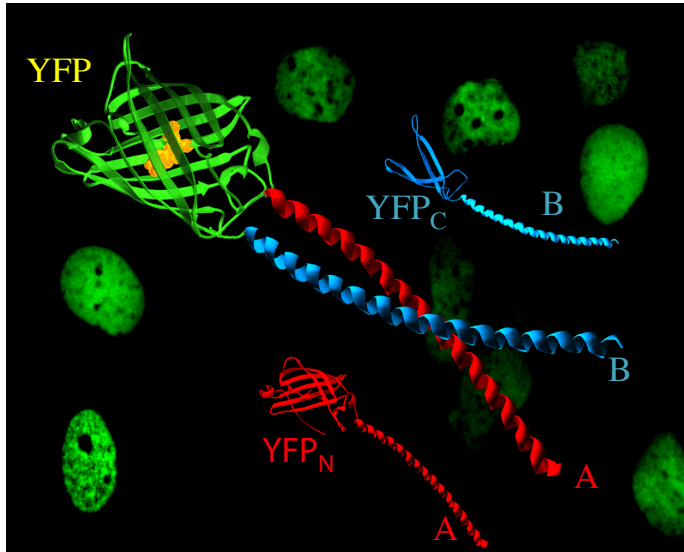
### **2.7.1. Kolokalisierungsstudien**

Kolokalisierungsstudien wurden mittels transienter Expression von Genen in Zwiebelepidermiszellen und in *N. benthamiana* durchgeführt. Für die transiente Expression von Genen in Zwiebelepidermiszellen wurden diese unter Verwendung des BioRad Biolistic PDS-1000/He Systems, wie bei Van den Ackerveken *et al.* beschrieben, mit 1  $\mu$ m Goldkugeln beschossen, welche zuvor mit DNA beladen wurden (336). Um

die  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität zu messen, wurden die Zwiebelzellen mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure-Zyclohexylammoniumsalz (X-Gluc) gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch Behandlung der Zellen mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Die transformierten Zellen wurden mittels Zeiss Axioskop Mikroskop mit Sony 3CCD COLOR VIDEO Kamera (Sony, Deutschland) untersucht. Für die Kolokalisierungsstudien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte die transiente Expression der zu untersuchenden Gene in *N. benthamiana*, vermittelt durch *Agrobacterium*. Zwei Tage nach Infiltration (siehe oben) wurden die mit *Agrobacterium* infizierten *N. benthamiana*- Blätter mit DAPI infiltriert, geerntet und mittels konfokalem Zeiss Laser Fluoreszenz Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der entsprechenden Filtereinstellungen für EGFP, ECFP, EYFP und DAPI untersucht.

### **2.7.2. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)**

Interaktionsstudien mittels BiFC wurden unter Verwendung des gelb fluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*; YFP; 236) durchgeführt, welches in eine C-terminale und eine N-terminale Domäne geteilt wurde (YFP<sub>C</sub>: Aminosäuren 155-239; YFP<sub>N</sub>: Aminosäuren 1-154; 22, 149). Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 11 dargestellt. BiFC-Experimente erfolgten nach transienter Expression der entsprechenden Gene mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* wie von Walter und Kollegen beschrieben (349). Für die Fluoreszenzdetektion wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit spezifischen Filtern für YFP verwendet.

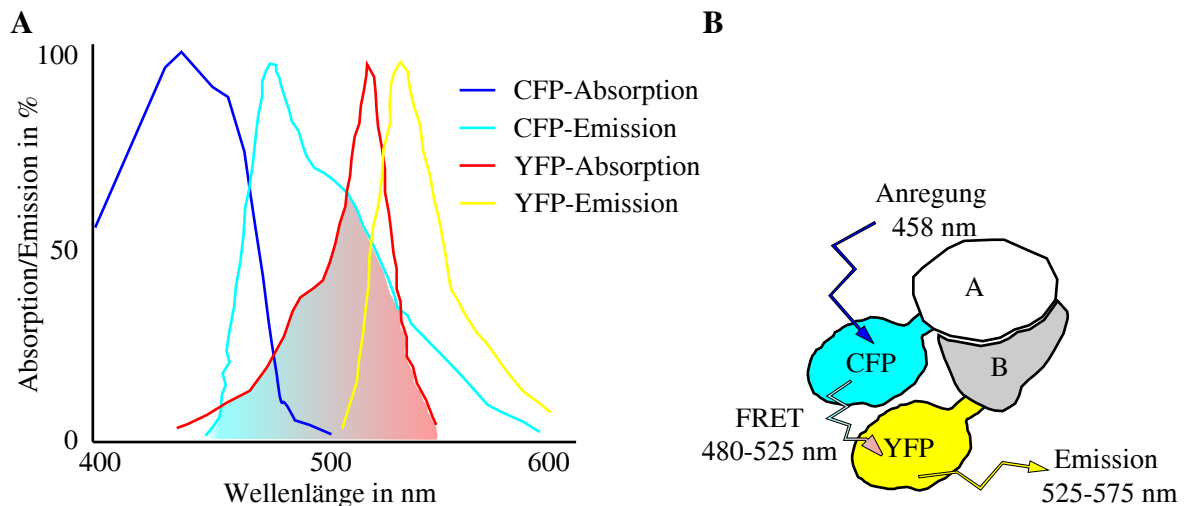


**Abbildung 11: Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).**

Die Abbildung zeigt das Prinzip der BiFC. Die N-terminalen Aminosäuren 1-155 des gelb fluoreszierenden Proteins YFP (YFP<sub>N</sub>) werden an das zu untersuchende Protein A (rot) fusioniert, die C-terminalen Aminosäuren 156-239 (YFP<sub>C</sub>) an Protein B (blau). Interagieren beide Proteine miteinander, so gelangen die YFP-Hälften in räumliche Nähe und assemblieren irreversibel zu einem funktionsfähigen YFP-Molekül, welches gelb fluoresziert. Die Abbildung wurde nach [http://sitemaker.umich.edu/kerppola.lab/kerppola\\_lab\\_bifc](http://sitemaker.umich.edu/kerppola.lab/kerppola_lab_bifc) modifiziert.

### 2.7.3. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

FRET-Analysen erfolgten unter Verwendung der gelben (*yellow*) und *cyan*-farbenen Spektralvarianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) YFP und CFP, welche an die Interaktionspartner fusioniert wurden, mittels „acceptor photobleaching“, wie von Karpova und Kollegen beschrieben (174). Die analysierten Fusionsproteine wurden transient in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium* synthetisiert. In Abbildung 12 ist das Prinzip des FRET schematisch dargestellt. CFP wird mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt. Im Fall einer Interaktion der CFP- und YFP-Fusionsproteine befinden sich CFP und YFP-Moleküle in räumlicher Nähe, so dass die CFP-Emissions-Strahlung auf das YFP-Molekül (Akzeptor) trifft und dieses anregt. Die resultierende Emissions-Strahlung wird als YFP-Fluoreszenz detektiert. Wird das Akzeptor-Molekül über einen längeren Zeitraum mit 514 nm angeregt, so erfolgt ein Ausbleichen des YFP („acceptor photobleaching“). Die CFP-Emissions-Strahlung kann nicht auf YFP übertragen werden und wird als verstärkte CFP-Fluoreszenz detektiert. Die Analysen erfolgten unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopes LSM510 Meta von Zeiss (Jena, Deutschland) mit Unterstützung von Dr. Bettina Hause (IPB, Halle).



**Abbildung 12: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).**

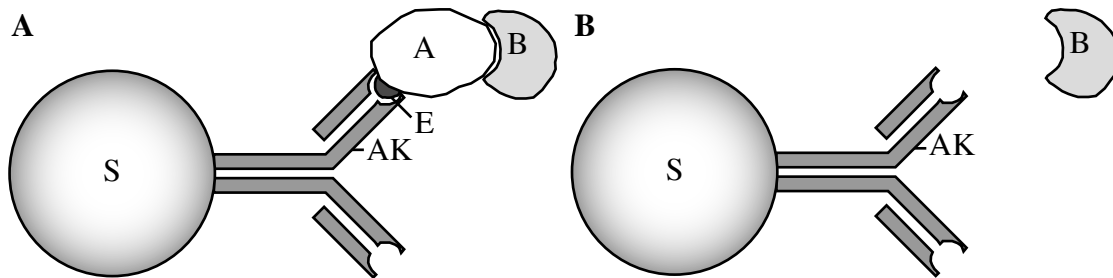
Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP (modifiziert nach [www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)) sowie das Prinzip des FRET (modifiziert nach [meds.queensu.ca/qcri/greer/ri\\_pag.htm](http://meds.queensu.ca/qcri/greer/ri_pag.htm)). (A) Die Anregungswellenlänge (Absorption) für CFP beträgt 458 nm. Die CFP-Emissions-Strahlung (480-525 nm) überlappt mit der Absorptionswellenlänge von YFP. (B) Befinden sich CFP und YFP in räumlicher Nähe, so wird die abgegebene Emissions-Strahlung des CFP-Moleküls direkt von dem YFP-Molekül absorbiert (FRET). Für die Methode des FRET wird CFP an ein zu untersuchendes Protein A und YFP an ein zu untersuchendes Protein B fusioniert. Interagieren beide Proteine, so gelangen CFP und YFP in räumliche Nähe und bei Anregung des CFP mit 458 nm wird die YFP-Emission (525-575 nm) detektiert.

#### 2.7.4. Untersuchung von Protein-Interaktionen mittels Koimmunopräzipitation

##### (KoIP)

For KoIP-Experimente wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine transient in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium* exprimiert. 48 Stunden nach Infiltration wurden 2 Blattscheiben mittels Korkbohrer (d = 9 mm) geerntet und in „Safe-lock“-Reaktionsgefäßen (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der vollständigen Zerkleinerung des Blattmaterials wurde 1 ml KoIP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 40 µl Protease-Inhibitor-Mischung (25 x konzentriert; complete, EDTA-free; Roche, Mannheim, Deutschland)) sowie 1 Spatelspitze Polyvinylpyrrolidon zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen und 15 minütiger Zentrifugation wurde der Extrakt-Überstand mit 2,1 µl 15%igem Nonidet-P40 versetzt, zu 25 µl Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben und für 30 min bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Der vorgeklärte Extrakt wurde anschließend mit 25 µl Sepharose gemischt, an welche Anti-FLAG-Antikörper kovalent gebunden waren (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und über Nacht bei 4°C über Kopf rotierend

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4°C kaltem KoIP-Puffer wurden gebundene Proteine unter Verwendung von 1 x Lämmli eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.



**Abbildung 13: Prinzip der Koimmunopräzipitation (KoIP).**

Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip der KoIP. Antikörper (AK) werden an Protein G-Sepharose (S) gebunden. Der Antikörper bindet an das entsprechende Epitop (E), welches an ein zu untersuchendes Protein (A) fusioniert ist und bewirkt dessen Immunopräzipitation. (A) Interagieren Protein B und A, so bindet der Proteinkomplex an die Sepharose-Matrix. Protein B wird mit Protein A koimmunopräzipitiert. (B) Fehlt das Protein A, welches an das Epitop fusioniert ist, so sollte Protein B nicht durch den Antikörper präzipitiert werden (Negativkontrolle).

### Erstellung von Plasmiden zur Expression von Genen in Pflanzen

Zur Erstellung von pBI356ΔSphI für Kollokalisierungsstudien wurde das *EcoRI/XhoI* Fragment von pBS356ΔSphI in pBI1.4t (232) ligiert.

Die oben beschriebenen Eingangsplasmide wurden für GATEWAY-basierende Rekombinationsreaktionen verwendet. Dabei wurde *avrBs3Δ2* in die Vektoren pK7FWG2 (173), pK7CWG, pK7WGC, pK7YWG, pK7WGY (173), pGWB14 (Tsuyoshi Nakagawa) und pGWB735.1 (35S::HA-YFP<sub>C</sub>-GW; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), welcher durch Einfügen von 35S::HA-YFP<sub>C</sub>-GW mittels *HindIII/SacI* in pGWB1 (kein Promotor, kein Epitop, attR1-CmR-ccdB-attR2; Tsuyoshi Nakagawa) erstellt wurde, rekombiniert. Die resultierenden Plasmide, welche die Expression von *avrBs3Δ2-GFP*, *avrBs3Δ2-CFP*, *CFP-avrBs3Δ2*, *avrBs3Δ2-YFP*, *YFP-avrBs3Δ2*, *avrBsΔ2-HA* und *YFPc-avrBs3Δ2* ermöglichen, sind in Tabelle 3 (Anhang 1) aufgeführt. pENTRT356ΔNLS wurde zur GATEWAY-Rekombination von *avrBs3Δ2ΔNLS* in pK7FWG2, pGWB14 und pGWB735.1 zur Expression von *avrBs3Δ2ΔNLS-GFP*, *avrBs3Δ2ΔNLS-HA* und *YFPc-avrBs3Δ2ΔNLS* verwendet.

pENTRavrBs3 $\Delta$ 2 $\Delta$ SphI wurde mittels GATEWAY-Technologie mit pK7FWG2 rekombiniert. Das erhaltene Plasmid pK7FWG2avrBs3 $\Delta$ 2 $\Delta$ SphI ermöglichte die Expression von *avrBs3 $\Delta$ 2 $\Delta$ SphI-GFP*.

Mit pENTRCaimp $\alpha$ 1 erfolgten Rekombinationsreaktionen in die Vektoren pK7YWG, pGWB735.1 und pSPYNE-35S-GW (35S-*attR*-c-myc-YFP<sub>N</sub>; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), welcher durch Einführen der GATEWAY-*attR*-Kassette mittels *XbaI/XhoI* aus pUC-SPYNE (349) in pSPYNE-35S (349) erhalten wurde. Die erhaltenen Plasmide erlaubten die Expression von *Caimp $\alpha$ 1-YFP*, *Caimp $\alpha$ 1-FLAG* und *Caimp $\alpha$ 1-YFP<sub>N</sub>*. Rekombinationsreaktionen mit pENTRLeThiC bzw. pENTRLeThiCstop und den Vektoren pK7CWG, pK7WGC, pK7YWG, pK7WGY (173), pGWB735.1, pSPYNE-35S-GW, pSPYCE-35S-GW (35S-*attR*-c-myc-YFP<sub>N</sub>; S. Schornack, T. Lahaye, unveröffentlichte Daten); welcher durch Einführen der GATEWAY-*attR*-Kassette mittels *XbaI/XhoI* aus pUC-SPYCE (349) in pSPYCE-35S (349) erhalten wurde; pGWB2, pGWB9, pGWB11, pGWB12, pGWB14, pGWB15, pGWB20, pGWB21 und pGWB24 ermöglichten die Expression von *LeThiC-CFP*, *CFP-LeThiC*, *LeThiC-YFP*, *YFP-LeThiC*, *YFP<sub>C</sub>-LeThiC*, *LeThiC-YFP<sub>N</sub>*, *LeThiC*, *6xHIS-LeThiC*, *LeThiC-FLAG*, *FLAG-LeThiC*, *LeThiC-3xHA*, *3xHA-LeThiC*, *LeThiC-10xc-myc*, *10xc-myc-LeThiC* und *GST-LeThiC* in der Pflanze.

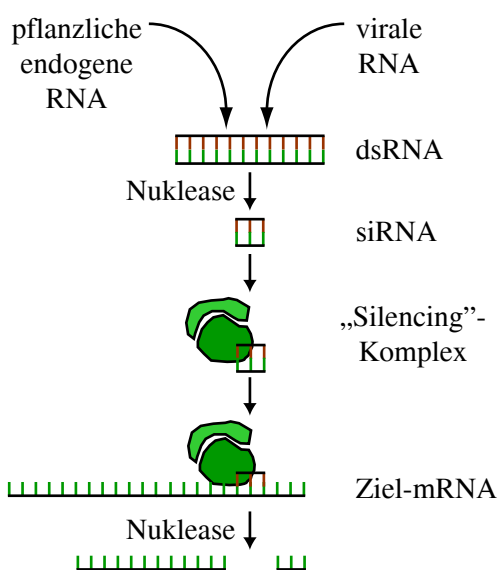
### 2.8. Virus induziertes Gen-,Silencing“ (VIGS)

VIGS wurde als schnelle, alternative Methode für die Stilllegung pflanzlicher Genexpression ohne Generierung transgener Pflanzen wie bei Liu *et al.*, 2002 beschrieben verwendet. Dafür wurden rekombinante TR- (*tobacco rattle*) Viren (V), welche Teile des zu untersuchenden pflanzlichen Gens enthielten, verwendet. Die pflanzlichen, endogenen Gentranskripte, welche Homologie zur Sequenz des eingefügten Genfragmentes im Virusgenom aufweisen, werden durch posttranskriptionelles Gen-,Silencing“ (PTGS; 26) reduziert. Die Fragmente des zu untersuchenden pflanzlichen Gens wurden dafür in den Virus-Vektor TRV2a (pYL279a; P. Römer und T. Lahaye, unveröffentlichte Daten), die GATEWAY-Technologie nutzend, eingefügt. Der TRV2a-Vektor wurde durch Einfügen des Gens für die Ampicillin-Resistenz in den Vektor pYL279 (pTRV2-*attR*2-*attR*1; 208) generiert. In dem TRV2-Vektor befindet sich außerdem das Gen für das virale Hüllprotein. Auf einem zweiten Plasmid (pTRV1) befinden sich unter der Kontrolle zweier 35S-

Promotoren aus dem Blumenkohlmosaik-Virus die Gene für die RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRp), ein Movement-Protein (MP), ein 16 kDa großes Cystein reiches Protein (16K) und ein selbstschneidendes Ribozym (Rz). Die Plasmide TRV1 und TRV2 wurden jeweils in *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert. Beide Stämme wurden vor Infiltration gemischt. Nach transienter Expression der Plasmid kodierten Gene assemblieren die Viren und verbreiten sich systemisch in der wachsenden Pflanze.

### Erstellung von Plasmiden für Virus induziertes Gen-„Silencing“ in Pflanzen

Das Plasmid TRV2LeThiC<sub>VIGS</sub> zum Silencing von *LeThiC* und dessen Homologen in Pflanzen wurde wie folgt erstellt: Unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-CACCGGGAACAATAATCCACAAGT-3' und 5'-TCTCACGAGCAGCACAGTACACC-3' wurde ein 520 bp langes Fragment des offenen Leserasters von *LeThiC* mittels PCR amplifiziert und in pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die GATEWAY-Technologie nutzend, kloniert. Eine GATEWAY-LR-Rekombinationsreaktion mit dem Vektor pTRV2a resultierte in dem Plasmid TRV2LeThiC<sub>VIGS</sub>, welches in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert wurde.



**Abbildung 14 : Prinzip des Virus induzierten Gen-„Silencing“ (VIGS).**

Das Virus induzierte Gen-„Silencing“ beruht auf natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen den Befall durch Viren. Wird in das Virus-Genom ein Fragment eines pflanzlichen Gens integriert, so paaren sich die entstehenden „viralen“ RNA-Moleküle mit den bereits vorhandenen endogenen pflanzlichen komplementären RNA-Molekülen. Die resultierenden doppelsträngigen RNA-Moleküle (dsRNA) werden durch Nukleasen in kurze „Silencing“-RNA-Moleküle (20-25bp, siRNA) abgebaut. Durch Bindung spezifischer Proteine (grün) entsteht ein „Silencing“-Komplex, welcher an neue endogene mRNA-Moleküle (Ziel-mRNA) bindet. Die Bindung des Komplexes bewirkt den Abbau der mRNA zu kleinen Fragmenten, die wiederum als siRNA dienen. Die endogenen mRNA-Moleküle sind somit nicht stabil und fehlen für den Translationsprozess.



## 2.9. Bestimmung des Ionenaustritts aus Pflanzenzellen

Der Austritt von Ionen aus Pflanzenzellen wurde wie folgt ermittelt: 1 und 4 Tage nach Infiltration von *Agrobacterium* wurden zwei Blattscheiben ( $d = 9 \text{ mm}$ ) je Infiltrationsstelle geerntet und für 15 Stunden in 6 ml destilliertem Wasser in 15 ml Plastikröhrchen (Greiner BIO-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) Kopf-über-Kopf rotierend inkubiert. Die Leitfähigkeit wurde mit Hilfe des Konduktometers 703 (Knick, Berlin, Deutschland) gemessen. Die Proben wurden anschließend für 5 min auf  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach Abkühlen auf  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde die Gesamtleitfähigkeit bestimmt. Die relative Leitfähigkeit, welche den Ionenaustritt aus der Pflanzenzelle in das Wasser reflektiert, wurde wie folgt berechnet:  $\text{Leitfähigkeit/Gesamtleitfähigkeit} \times 100\%$ .

## 2.10. Licht- und Elektronenmikroskopie

*N. benthamiana* wurde mit den *Agrobacterium*-Stämmen GV3101(pVuidA), GV3101(pVSavrBs4), GV3101(pVSavrBs3) und GV3101(pVSavrBs1) mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 infiltriert. Das Blattmaterial wurde 4 Tage nach Infektion geerntet. Die Blatteile ( $2 \times 5 \text{ mm}$ ) wurden 2 Stunden mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer (NCP; pH 7,2) bei Raumtemperatur fixiert, gewaschen, nachfixiert mit 1% Osmiumtetroxid in NCP und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Zur Anfertigung von Dünnschnitten wurde das fixierte und entwässerte Gewebe mit Epoxidharz nach Spurr (1969) über 3 Tage infiltriert (314). Nach Polymerisierung des Harzes bei  $70^\circ\text{C}$  für 24 h wurden Schnitte mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut-R, LEICA, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Semidünnschnitte ( $1 \mu\text{m}$ ) wurden mit Toluidinblau (1% in 1%  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) gefärbt und mit einem Axioskop 20 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) analysiert. Ultradünnschnitte (80 nm) wurden auf Ceducol-beschichtete Kupfernetzchen aufgenommen, mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die Aufnahmen wurden mit einer Slow-Scan-Kamera (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS, Dünzelbach, Deutschland) angefertigt. Für morphometrische Messungen wurde Aufnahmen von Mesophyllzellen mit Zellkernen mit Nukleoli verwendet, um die Analyse peripherer Dünnschnitte zu vermeiden. Die Messungen erfolgten mit Hilfe der analySIS

Software (SIS, Münster, Deutschland). Die mikroskopischen Analysen wurden von Simone Jahn und Dr. Gerd Hause durchgeführt.

### **2.11. Physiologische Vitamin B1-Komplementations-Analysen**

Für physiologische Komplementationsanalysen mit Vitamin B1 wurden *N. benthamiana*-Pflanzen nach Infektion mit TRV für VIGS jeden zweiten Tag mit 50 ml einer 10 mM Thiaminlösung (pH 6,0) gegossen. Dafür wurde Thiamin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in 25 mM Natrium-Phosphat (NaP)-Puffer gelöst. Kontrollpflanzen wurden mit 50 ml NaP-Puffer (pH 6,0) behandelt.

### **2.12. Bestimmung des Vitamin B1-Gehaltes in Pflanzen**

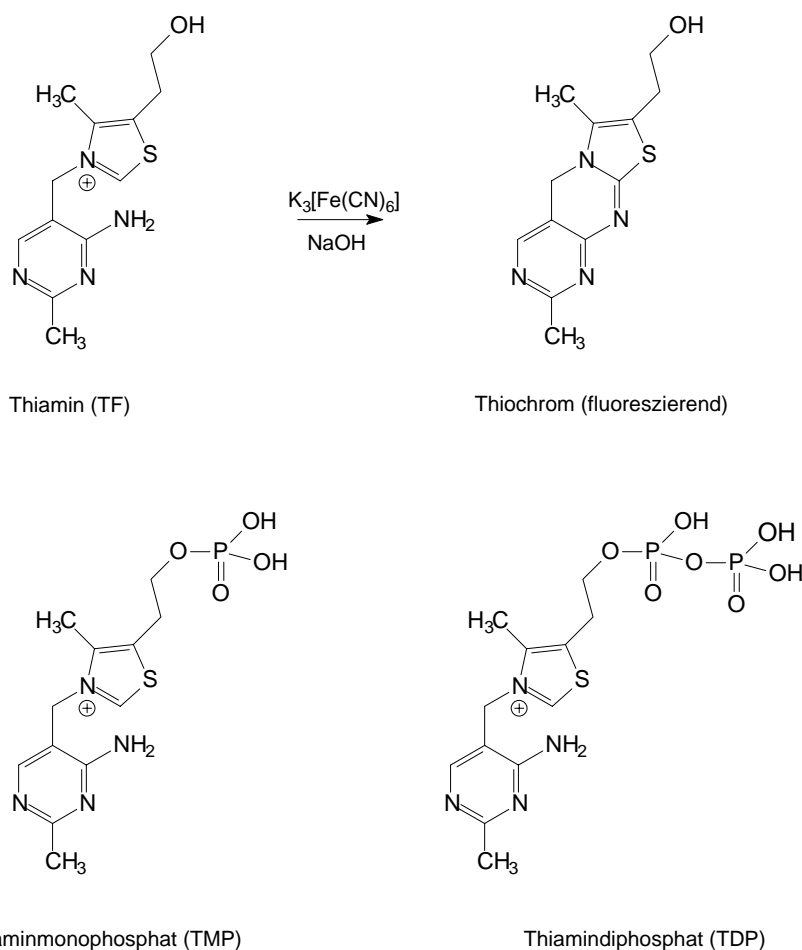
Die Bestimmung des Vitamin B1 (Thiamin)-Gehaltes in Pflanzen erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) leicht modifiziert nach Pinto *et al.*, 2002 (270) in Kooperation mit Dr. Robert Kramell (IPB, Halle).

Standard-Lösungen von 10 mM Thiamin (TF; AppliChem), 10 mM Thiaminmonophosphat (TMP; AppliChem) und 10 mM Thiamindiphosphat (TDP; AppliChem) wurden in 0,1 M HCl hergestellt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.12.1. Extraktion der Thiamin-Verbindungen**

Blattmaterial wurde mit einem Korkbohrer ausgestanzt, in 2 ml „Safe lock tubes“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einer Kugelmühle (MM300, Retsch, Deutschland) zerkleinert und mit 0,1 M HCl versetzt (20  $\mu\text{l}$  0,1 M HCl je zwei Blattscheiben,  $d = 9\text{ mm}$ ). Nach Inkubation im Thermomixer compact (Eppendorf, Deutschland) bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht wurden die Extraktionsansätze zentrifugiert und die Überstände mit Chloroform (20  $\mu\text{l}$ /2 Blattscheiben) zum Entfernen von Proteinen ausgeschüttelt. Zur HPLC-Analyse mittels Fluoreszenz-Detektor wurden sowohl die Thiamin-Standard-Lösungen als auch die Extrakte mit Kaliumhexacyanoferrat (II) in Thiochromverbindungen überführt. Dafür wurden zu 60  $\mu\text{l}$  eines Protein-freien

Pflanzenextraktes 5 µl einer frisch hergestellten 30 mM Lösung  $K_3[Fe(CN)_6]$  gegeben und anschließend mit 300 µl 1 M NaOH sowie 550 µl MeOH versetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit Hilfe eines Vortex Genie 2 (Bender und Hobein, Zürich, Schweiz) intensiv durchmischt und für 10 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden auf eine HPLC-Säule gegeben.



**Abbildung 15: Strukturformeln von Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiamindiphosphat.**

Für Thiamin (TF) ist die Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat (II) zum fluoreszierenden Thiochrom (2,7-Dimethyl-5H-thiachromine-8-ethanol) gezeigt.

### 2.12.2. HPLC-Bedingungen

Die HPLC-Analysen erfolgten unter Verwendung einer Agilent 1100-Anlage mit integrierter Software (Agilent Technologie, Waldbronn, Deutschland), gekoppelt mit einem Fluoreszenz-Detektor (Agilent 1100). Es wurde eine Anregungswellenlänge von 375 nm verwendet und die Emission bei 450 nm detektiert. Für die HPLC wurde eine

Säule des Typs LiChrospher 100 NH<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm sowie einer Partikelgröße von 10 µm verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die mobile Phase setzte sich aus dem Solvens A (0,05 M Phosphat- Puffer, pH 7,4) und dem Solvens B (MeOH) zusammen. Die HPLC wurde mit einem Gradienten wie folgt durchgeführt: In 5 min wurde von 30% (v/v) Solvens B auf 50% Solvens B erhöht, in weiteren 5 min wurde auf 60% Solvens B erhöht und für 10 min bei 60% Solvens B gehalten. Anschließend wurde die Säule bei 30% Solvens B für 8 min wieder äquilibriert.

### 2.13. Statistische Auswertungen

Für statistische Auswertungen wurden statistische Tests in Kooperation mit Ingrid Haufe am Rechenzentrum der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit der SPSS12-Software (Achim Bühl, Peter Zöfel, Pearson Sudium) mittels parametrischen und nicht-parametrischen Testverfahren. Unterschiede von  $P \leq 0,05$  werden als signifikant gewertet. Alle Mittelwerte sind mit Standardabweichung angegeben. Die detaillierten Ergebnisse der Tests sind im Anhang aufgeführt.

### 2.14. Silberfärbung, Native Gel-Elektrophorese und Westernblot

Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE unter Verwendung 8-12%iger Gele aufgetrennt (196). Silberfärbung erfolgte nach Blum und Gross (39).

Für Blue-native-PAGE (BN-PAGE) von AvrBs3 wurde das *EcoRI/XhoI*-Fragment von pBS356 (siehe oben) in pGEX6p1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) kloniert, welcher einen *lac*-Promoter enthält. Die resultierende *GST-avrBs3Δ2*-Fusion wurde nach Induktion mittels IPTG in *E. coli* BL21 exprimiert. 500 ml Bakterienkultur wurden 1.5 Stunden nach Induktion pelletiert, in 10 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der aufgeschlossenen Zellen über eine GSTrap<sup>TM</sup> F-Säule gegeben (Amersham Pharmacia Biotech). Die Affinitäts-aufreinigung und Elution mittels PreScission-Protease (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte wie im mitgelieferten Protokoll beschrieben. Die BN-PAGE wurde mit 100 µg des gereinigten AvrBs3Δ2 Proteins nach Schägger und von Jagow durchgeführt (293). Nach Entfärbung des Gels erfolgte der Transfer der Proteine auf eine

Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell BioScience GmbH, Dassel, Deutschland), welche mit einem AvrBs3-spezifischen Antikörper inkubiert wurde.

In einem weiteren Ansatz wurden 5 µg des affinitätsgereinigten AvrBs3Δ2 Proteins in 5 x Proteinpuffer nach Lämmli aufgenommen, welcher kein Mercaptoethanol, aber 1,4-Dithiothreitol (DTT) enthielt. Ein Teil der Proben wurde mit Puffer ohne DTT versetzt. Die Hälfte der Proteinproben wurde auf 95°C erhitzt. Alle Proteinproben wurden auf ein 8%iges SDS-Gel geladen und nach Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Für Westernblotanalysen wurden Proteine auf 8-12%igen SDS-Gelen mittels SDS-PAGE (196) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit monoklonalem Anti-LexA-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper (Maus; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland), polyklonalem Anti-GST-Antikörper (Ziege; Amersham Pharmacia Biotech), polyklonalem Anti-GFP-Antikörper (Kaninchen; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), monoklonalem Anti-HA-Antikörper (Ratte; Santa Cruz), monoklonalem Anti-c-Myc-Antikörper (Maus; Roche) oder polyklonalem Anti-AvrBs3-Antikörper (Kaninchen; (187) inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden sekundären Antikörpers erfolgte die Detektion der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

### **2.15. 5'- und 3'- RACE (“rapid amplification of cDNA ends”)**

Die RNA für 5'- und 3'-RACE wurde aus *L. esculentum* cv. MM mit Hilfe des Qiagen RNeasy Plant Mini Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen GmbH, Hilden). 5'-und 3'-RACE erfolgten mittels BD SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplifikationskit nach Angaben des Herstellerprotokolls (Clontech, Heidelberg, Deutschland).