

4. Diskussion und Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit liefern neue Erkenntnisse über Virulenzfunktionen von T3-Effektoren sowie neue Einblicke in die molekulare Wirkungsweise des T3-Effektorproteins AvrBs3 aus *Xcv*. Sekretion und Translokation von AvrBs3 werden vermutlich durch die Bindung des T3-Chaperons HpaB begünstigt. Im pflanzlichen Zytoplasma bindet AvrBs3 an Importin α , wodurch der Kernimport vermittelt werden kann. Weiterhin zeigten die Studien, dass AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese in der Pflanze hemmen kann, vermutlich durch direkte Interaktion mit dem Thiaminbiosynthese-Enzym C. Interessant sind auch die Ergebnisse, die zeigen, dass das als Transkriptionsregulator diskutierte AvrBs3-Protein Homodimere formt, da viele Transkriptionsregulatoren als Dimere agieren. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden im Detail diskutiert.

4.1. Der Weg des Typ-III-Effektors AvrBs3: von der Sekretion aus dem Bakterium bis zur Wirkung als Transkriptionsfaktor in der Pflanze

4.1.1. HpaB beeinflusst die Sekretion von AvrBs3 durch Interaktion mit dem N-Terminus des Effektors in *Xcv*

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das *Xcv*-Protein HpaB an die N-terminalen Aminosäurereste 1-50 von AvrBs3 bindet, nicht aber an AvrBs3 Δ 2, in welchem die Reste 2-152 fehlen. Da HpaB ein kleines, saures, Leucin reiches Protein ist und damit typische Eigenschaften eines T3-Chaperons besitzt, wird postuliert, dass es die Sekretion des T3-Effektors AvrBs3 begünstigt (56, 98). Für HpaB wurde nicht nur die Bindung an AvrBs3, sondern auch eine Interaktion mit anderen, nicht homologen Effektoren aus *Xcv* nachgewiesen (D. Büttner, C. Lorenz, (57). Daher liegt der Schluss nahe, dass es sich um ein T3-Chaperon der Klasse IB handelt (265). Somit ist HpaB das erste Klasse IB-Chaperon aus phytopathogenen Bakterien, da IB-Chaperone bisher nur aus den Tierpathogenen *Shigella flexneri* und *Salmonella enterica* isoliert wurden (89, 90, 202, 262).

Es wurde gezeigt, dass die Bindung von T3-Chaperonen an den N-Terminus von T3-Effektoren deren Sekretion durch das T3SS begünstigen (141). Tatsächlich werden die Derivate AvrBs3 Δ 1 (Aminosäurereste 3-27 fehlen) und AvrBs3 Δ 2 (Aminosäurereste 2-152 fehlen) nicht von *Xcv* sekretiert (325). Dies legt die Vermutung nahe, dass Sekretionssignal und HpaB-Bindungsstelle in AvrBs3 kolokalisieren.

Es werden verschiedene Möglichkeiten angenommen, wie ein T3-Chaperon zur Sekretion eines T3SS-Substrates beitragen kann (98). Für das T3-Chaperon IpgC aus *Shigella* wurde z.B. gezeigt, dass es eine Assemblierung seiner Substrate IpaB und IpaC verhindert und zu deren Stabilisierung beiträgt (227). Sekretionsanalysen mit *hpaB*-Deletionsmutanten lassen jedoch vermuten, dass HpaB keinen Einfluss auf die Stabilität von AvrBs3 hat (D. Büttner; 56). Ob HpaB eine Assemblierung des Effektors vor dessen Sekretion verhindert, könnte z.B. anhand der beobachteten Dimerisierung von AvrBs3 untersucht werden. Dabei sollte *hpaB* gleichzeitig mit *avrBs3* und *avrBs3* Δ NLS-GFP mittels *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert werden. Verhindert HpaB die Assemblierung der AvrBs3-Derivate, so sollte kein Koimport von AvrBs3 Δ NLS-GFP durch AvrBs3 beobachtet werden.

Andere Studien wiesen wiederum darauf hin, dass T3-Chaperone ihre Substrate in einem teilweise entfalteten Zustand halten, um deren Passage durch das T3SS zu gewährleisten (98). So zeigten Kristallisierungsstudien mit Chaperon-Effektor-Komplexen aus *Salmonella typhimurium*, dass SicP durch Bindung an den N-Terminus von SptP ca. 100 Aminosäuren des Effektors in einem ungefalteten Zustand hält (316). Um zu klären, ob HpaB tatsächlich die Faltung der Effektor-N-Termini verhindert, müsste HpaB in weiterführenden Studien zusammen mit AvrBs3 oder einem der interagierenden T3-Effektoren aus *Xcv* kristallisiert werden.

T3-Chaperone wurden auch als Regulatoren für eine Sekretions-Hierarchie diskutiert (98). So erlauben die 15 N-terminalen Aminosäurereste von YopE, z.B. nur in multiplen Effektor-Deletionsmutanten eine starke Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₅-Cya. Wurden dagegen die N-terminalen 130 Aminosäurereste von YopE, welche die Chaperonbindestelle enthalten, an die Cya fusioniert, so erfolgte auch in Wildtyp-Stämmen eine starke Sekretion des Fusionsproteins (49). Diese Daten deuten an, dass das Chaperon SycE durch Bindung an YopE eine bevorzugte Sekretion des Effektorproteins vermittelt. Domänenaustausch-Experimente mit AvrBs3 und dem Translokonprotein HrpF zeigten, dass der HrpF-N-Terminus eine Sekretion des entsprechenden AvrBs3 Δ 2-Fusionsproteins aus *hpaB*-Deletionsmutanten ermöglicht (D. Büttner; 56). Dies deutet an, dass der AvrBs3-

N-Terminus eine HpaB-Abhängigkeit der Sekretion vermittelt. Es ist denkbar, dass auch die Bindung von HpaB an die N-terminalen Bereiche von AvrBs3, ähnlich wie SycE, zu einem bestimmten Zeitpunkt eine bevorzugte Sekretion des Effektors bewirkt, wohingegen Translokationproteine kaum oder gar nicht sekretiert werden.

Neuere Studien mit tierpathogenen Bakterien weisen nun darauf hin, dass T3-Chaperone einen Kontakt zwischen ihren Substraten und dem T3S-Apparat herstellen (9, 115, 330). Die ATPase InvC, z.B., aus *Salmonella enterica* interagiert mit T3SS-Substraten und bewirkt deren Freisetzung aus dem Effektor-Chaperon-Komplex (9). Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass HpaB mit der mit dem T3S-Apparat assoziierten ATPase HrcN aus *Xcv* interagiert (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Die Bindung von HpaB an die 50 N-terminalen Aminosäurereste von AvrBs3 und die Interaktion von HpaB mit HrcN könnte somit den Kontakt zwischen Effektor und Sekretionsapparat herstellen.

Es wurde gezeigt, dass HpaB mit AvrBs3₁₋₅₀, nicht aber mit AvrBs3 Δ 2 (Aminosäurereste 2-152 fehlen) interagiert. Tatsächlich wurden die T3S-Signale in den meisten Effektoren im N-Terminus der Effektorproteine lokalisiert, wobei jedoch keine Konsensussequenz identifiziert werden konnte (118, 134, 210, 211, 240, 269, 294). Übereinstimmend damit wurden die Bindestellen fast aller untersuchten T3-Chaperon-Moleküle im N-Terminus ihrer Substrate lokalisiert (141). Chaperone von Substraten des Flagellarsystems bilden eine Ausnahme, da diese an die C-Termini ihrer Bindungspartner binden (19). Analysen von AvrBs2 aus *Xcv* zeigten, z.B., dass die Aminosäurereste 1-28 und 1-58 für die Sekretion und Translokation des Effektors benötigt werden (240). Für YopE und YopH wurden die Sekretionssignale in den N-terminalen 15 bzw. 17 Aminosäureresten gefunden (296, 313). Vergleichende Sequenzanalysen mit mehreren Effektoren von *Xcv* ergaben jedoch ein konserviertes, mögliches Sekretions- bzw. Translokationssignal für AvrBs3 innerhalb der Aminosäuren 129-143 (94). Diese Daten lassen vermuten, dass es möglicherweise zwei Sekretionssignale in AvrBs3 gibt, eines in den ersten N-terminalen Aminosäuren 1-27 und ein weiteres innerhalb der Aminosäuren 129-143. Die Deletion des ersten Signals scheint jedoch bereits effektiv die Sekretion von AvrBs3 zu verhindern (325). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine Deletion der Aminosäuren 129-143 ebenfalls zum Verlust der Sekretion des Effektors führt.

Es ist bisher auch nicht auszuschließen, dass die Aminosäurereste 1-15 von AvrBs3, ähnlich wie in YopE, für die T3S genügen. Um dies zu überprüfen, müsste ein weiteres Deletionsderivat von AvrBs3 (AvrBs3 Δ 1-15) erstellt und mittels Sekretionsanalysen

untersucht werden. Für das Chaperon SycE wurde gezeigt, dass es an die Aminosäurereste 15-50 in YopE bindet. Interessanterweise zeigten die Arbeiten an SycE und YopE, dass die Reste 50-77 in YopE dessen Sekretion behindern, und dieser Effekt durch SycE-Bindung überwunden wird (62, 105, 296, 351). Ob die Aminosäurereste 15-50 in AvrBs3 für die HpaB-Bindung ausreichen, wurde bisher noch nicht untersucht. Da die N-Termini der Translokonproteine zur Erstellung der HrpF- und XopA-AvrBs3-Fusionsproteine an AvrBs3 Δ 2 (Aminosäurereste 2-152 deletiert) fusioniert wurden, konnte ein negativer Einfluss der Aminosäurereste 50-77 bisher nicht untersucht werden. In wieweit die Aminosäurereste 51-152 von HpaB gebunden werden können, ist ebenfalls nicht geklärt. Es kann bisher demnach auch nicht ausgeschlossen werden, dass HpaB auch an die Aminosäurereste 51-100 bindet, wie die Kristall-Untersuchungen der SptP-SicP-Komplexe andeuten (315). Die Erstellung weiterer Deletionsderivate von AvrBs3 und anschließende Interaktionsstudien mit HpaB sowie Sekretionsanalysen könnten Aufschluss geben, ob zusätzliche Bereiche von AvrBs3 die HpaB-abhängige Sekretion verstärken bzw. eine Rolle für die HpaB-Bindung spielen.

4.1.2. AvrBs3 formt Homodimere durch Interaktion der zentralen „Repeats“ im Zytoplasma der Pflanzenzelle

Nachdem AvrBs3 mit Hilfe von HpaB durch das T3SS aus *Xcv* sekretiert und in die Wirtszelle transloziert wurde, befinden sich die Effektormoleküle zunächst im Zytoplasma der Pflanzenzelle. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AvrBs3-Moleküle in Hefe und *in vitro* miteinander interagieren. Die Interaktion *in vitro* mittels GST-„pull-down“-Experimenten legt den Schluss nahe, dass für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion keine zusätzlichen eukaryotischen Proteine nötig sind. Die Untersuchungen von AvrBs3 mittels „Blue native“-Gelelektrophorese wiesen darauf hin, dass AvrBs3 Homodimere bildet. Es wurde weiterhin gezeigt, dass AvrBs3 in der Pflanzenzelle dimerisiert. AvrBs3 ist nach unserem Wissen das erste Beispiel eines T3-Effektorproteins eines phytopathogenen Bakteriums, welches dimere Komplexe formt. Bisher wurde die Fähigkeit zur Dimerisierung nur für Effektoren aus Tierpathogenen beschrieben (260). Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass AvrBs3 als Transkriptionsregulator in der pflanzlichen Zelle agiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese, da für einige eukaryotische Transkriptionsregulatoren gezeigt wurde, dass sie Dimere bilden. Aufgrund

konservierter DNA-Binde-Domänen wurden diese in Familien eingruppiert. Beispiele sind die Familien der bZIP-Faktoren, welche basische Leucin-Zipper-Motive enthalten sowie MYB- und MADS-Box-Proteine, welche nach den zuerst isolierten Proteinen mit dem entsprechenden Motiv benannt wurden (199, 229, 279, 301). Obwohl AvrBs3 keine offensichtliche DNA-Bindedomäne enthält, hat es mehrere Eigenschaften mit den genannten Transkriptionsfaktoren gemeinsam. AvrBs3 lokalisiert im Zellkern und enthält eine AD, welche für die Induktion von Pflanzengenossen essentiell ist (221, 324). AvrBs3 enthält außerdem imperfekte Leucin-Zipper (LZ)-„Repeats“, (111). Letztere vermitteln in bZIP-Faktoren deren Homo- und Heterodimerisierung. Die hier erfolgten Hefe-Di-Hybrid-Studien zeigten jedoch, dass AvrBs3-Deletionsderivate ohne LZ (AvrBs3 Δ C) miteinander interagieren können, wohingegen AvrBs3 Δ rep-312, welches das LZ-Motiv enthält, keine Dimere in Hefe bilden kann. Demnach sind die LZ-ähnlichen „Repeats“ im C-Terminus von AvrBs3 vermutlich nicht an der AvrBs3-AvrBs3-Interaktion beteiligt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Leucin-Zipper-„Repeats“ eine Heterodimerisierung mit pflanzlichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. bZIP-Faktoren ermöglichen. Die in einem solchen bZIP-Protein enthaltene DNA-Bindedomäne könnte dann die Bindung an Promotoren, der durch AvrBs3 induzierten Gene vermitteln. Interessanterweise wurde in Arbeiten mit AvrBs3-homologen Proteinen gezeigt, dass das LZ-Motiv für die Erkennungsspezifität der Effektoren wichtig sein kann (156, 175). AvrBs3 und das sehr homologe Protein AvrBs4, zeigen unterschiedliche Erkennungsspezifitäten, weisen aber im Bereich des LZ-Motivs keine Sequenzunterschiede auf (23, 45, 47). Domänenaustauschexperimente zwischen AvrBs3 und Hax2 zeigten wiederum, dass der AvrBs3-LZ-Bereich für die *Bs3* vermittelte Erkennung wichtig sein könnte (175). Die Daten deuten demnach darauf hin, dass die LZ-„Repeats“ vermutlich nur für die Avirulenzaktivität von AvrBs4 unbedeutend sind. Übereinstimmend damit wird auch das AvrBs4-Derivat AvrBs4 Δ 227, welchem 12 „Repeats“ und der gesamte C-Terminus fehlen, von *Bs4* erkannt (23). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit ein pflanzlicher AvrBs3-Interaktor mit LZ-Motiv identifiziert, welcher weiter unten diskutiert wird.

Hefe-Di-Hybrid-Studien ergaben, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion durch die zentrale „Repeat“-Region vermittelt wird, welche auch die Erkennungsspezifität von AvrBs3 bestimmt (145). Um zu untersuchen, welche „Repeats“ für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion verantwortlich sind, wurden verschiedene AvrBs3-Deletionsderivate getestet. Dabei stellte sich heraus, dass 14,5 „Repeats“ ausreichen, um eine Interaktion ähnlich des Wildtyp-Proteins zu vermitteln, wohingegen die Deletion von 10 bis 12 „Repeats“ eine verminderte

Proteininteraktion bewirken. Obwohl die zentralen „Repeats“ nicht völlig identisch sind, waren die getesteten Interaktionen vergleichbar, unabhängig davon, welcher Bereich der „Repeat“-Region deletiert wurde. Diese Ergebnisse deuten auf einen additiven Effekt der einzelnen „Repeats“ für die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion hin. Die Cysteinreste, welche in allen „Repeats“ enthalten sind, vermitteln jedoch keine Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken, wie Untersuchungen mit aufgereinigtem AvrBs3-Protein zeigten. Tatsächlich ist allen „Repeats“ auch ein hoher Anteil an Leucin-Resten gemeinsam, was eine Rolle der Sequenzwiederholungen für Protein-Protein-Wechselwirkungen impliziert (111, 188).

Transkomplementationsansätze in *C. annuum* cv. ECW-30R (*Bs3*) und Kolokalisierungsstudien in *N. benthamiana* ergaben, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion sowohl in resistenten als auch in nicht-resistenten Pflanzen erfolgt. Dies lässt vermuten, dass die Dimerisierung von AvrBs3 während kompatibler und inkompatibler Pathogen-Wirt-Interaktionen erfolgt und demzufolge für Avirulenz- und Virulenzfunktion von AvrBs3 eine Rolle spielt. Da die „Repeat“-Region nicht nur die Dimerisierung, sondern auch die Erkennungsspezifität von AvrBs3 vermittelt, ist es schwierig, die Frage nach der biologischen Relevanz der Dimerisierung zu klären. Es wird vermutet, dass die Dimerisierung von AvrBs3 nach der Translokation von AvrBs3-Monomeren erfolgt, da angenommen wird, dass die Substrate des T3SS teilweise ungefaltete durch den T3-Pilus ins Wirtszellzytoplasma transportiert werden (98). Ein AvrBs3-Dimer würde vermutlich zu groß sein, um den T3-Pilus passieren zu können. Wie im Abschnitt 4.1.1. diskutiert, könnte das T3-Chaperon HpaB AvrBs3 in einem teilweise entfalteten Zustand halten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *Agrobacterium* vermittelte Koexpression zweier *avrBs3*-Deletionsderivate, welche in Paprika keine *Bs3*-spezifische HR auslösen (*avrBs3*ΔAD und *avrBs3*Δrep-16) zur Induktion einer HR führt. Überraschenderweise resultierte die Koinfiltration von zwei *Xcv*-Stämmen, wobei jeder Stamm eines der *avrBs3*-Derivate exprimiert, nicht in einer solchen Transkomplementation. Dies könnte an der niedrigen Menge an AvrBs3-Protein liegen, welches von *Xcv* sekretiert wird, verglichen mit der erhöhten Proteinmenge, die aus der *Agrobacterium* vermittelten Expression unter der Kontrolle des 35S-Promotors resultiert. Weiterhin muss beachtet werden, dass die AvrBs3-Deletionsderivate nicht nur Heterodimere, sondern auch Homodimere bilden, jedoch nur die heterodimeren Komplexe aktiv sind und eine HR auslösen können. Da während der *Agrobacterium* vermittelten Expression aufgrund des starken 35S-Promotors eine höhere Anzahl Monomere zur Verfügung steht, steigt in diesem experimentellen

Ansatz auch die Anzahl an Heterodimeren. Die *Agrobacterium* vermittelte Koexpression von *avrBs3*ΔAAD und *avrBs3*Δrep-16 in *N. benthamiana* oder suszeptiblen Paprikapflanzen führte jedoch nicht zur Induktion einer Hypertrophie (Daten nicht gezeigt), welche normalerweise durch AvrBs3 ausgelöst wird (221). Eine mögliche Erklärung ist, dass für die Induktion einer Hypertrophie mehr AvrBs3-Moleküle nötig sind als für die Auslösung einer HR. Denkbar ist auch, dass die Homodimerisierung effektiver als die Heterodimerisierung der AvrBs3-Derivate erfolgt, so dass die Transkomplementation erschwert wird. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass *Xanthomonas*-Stämme mehrere Homologe mit unterschiedlicher Spezifität in die gleiche Pflanzenzelle translozieren, ohne dass deren Aktivität sichtbar beeinträchtigt ist. Dazu zählen z.B. der *Xcv*-Stamm 82-8, welcher AvrBs3 und AvrBs4 sekretiert, sowie *Xoo*-Stämme, die mehr als zehn *avrBs3*-Homologe exprimieren (197, 365, 367). Des Weiteren ist es auch denkbar, dass andere, gleichzeitig aus *Xanthomonas* sekretierte Proteine, pflanzliche Proteine oder eine bevorzugte Kinetik zur favorisierten Bildung von Homodimeren führen. Das Ausbleiben einer Hypertrophie bei Expression zweier mutanter *avrBs3*-Derivate lässt aber auch den Schluss zu, dass nur Wildtyp-AvrBs3-Homodimere die vollständige Virulenzaktivität besitzen.

Die Kolokalisierungsexperimente zeigten weiterhin, dass die AvrBs3-AvrBs3-Interaktion im Zytoplasma der Pflanzenzelle und somit vor dem Kernimport des Effektors erfolgt.

Zusammenfassend ergeben die *in planta*-Studien folgende Schlussfolgerung: Ein AvrBs3-Molekül mit funktionaler AAD und eine Wildtyp-„Repeat“-Region innerhalb eines AvrBs3-Dimers sind notwendig und ausreichend, um eine HR in resistenten Pflanzen zu induzieren. Wie frühere und hier erfolgte Arbeiten zeigten, binden Importin α -Moleküle an die AvrBs3 NLS (324; diese Arbeit). Die hier erfolgende Importin α -NLS-Interaktion benötigt keine Assemblierung der NLS zu einer dimeren Form, da auch AvrBs3ΔSpHI in den Zellkern lokalisiert, obwohl diesem AvrBs3-Derivat gesamte „Repeat“-Region fehlt. Andere Proteine, wie z.B. die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 aus Hefe, müssen dagegen dimerisieren, um funktionale NLS auszubilden (224). Dabei erfolgt die Dimerisierung über SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen zwischen zwei STAT-Molekülen und Importin α bindet über seinen C-Terminus an Tyrosin-phosphorylierte STAT-Dimere und nicht über die Armadillo-„Repeats“ wie bei AvrBs3 (27, 71, 104, 303).

Insgesamt geben die hier erhaltenen Ergebnisse einen weiteren Einblick in die Wirkungsweise des Effektorproteins AvrBs3: AvrBs3 wird als Dimer in den Zellkern transportiert, in welchem es dann die Induktion pflanzlicher Zielgene bewirkt. Die

Fähigkeit, Dimere zu bilden unterstützt die Hypothese, dass AvrBs3 als Transkriptionsregulator in der Pflanzenzelle fungiert. Da die Dimerisierung durch das Leucin reiche Rückgrat der „Repeat“-Region vermittelt wird, ist es wahrscheinlich, dass auch andere AvrBs3-Familien-Mitglieder als Homodimere agieren. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob AvrBs3 im Zellkern tatsächlich als Homodimer agiert oder mit pflanzlichen Transkriptionsfaktoren heterodimerisiert. FRET-Analysen von Zellkernen unter Verwendung fluoreszierender AvrBs3-Fusionsproteine könnten darüber Aufschluss geben, wie stabil der dimere AvrBs3-Komplex im Zellkern vorliegt. Bei einer möglichen Heterodimerisierung könnte das postulierte LZ-Motiv eine Rolle spielen. Diese Frage wurde in Abschnitt 3.1.2.3.15. bearbeitet und wird weiter unten diskutiert.

4.1.3. CaIMP α 1 interagiert mit dem NLS-Bereich des Effektorproteins AvrBs3 im Zytoplasma der Pflanzenzelle

Unter Verwendung unterschiedlicher Techniken wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Importin α -Protein CaIMP α 1 aus Paprika in der Pflanze mit AvrBs3 interagiert. Die Komplexe aus CaIMP α 1 und AvrBs3 wurden direkt in lebenden pflanzlichen Zellen visualisiert, wodurch gezeigt wurde, dass die in Hefe und *in vitro* beobachtete Interaktion (324) tatsächlich in der natürlichen Umgebung der Proteine erfolgt. Mit den durchgeführten Koimmunopräzipitations-, BiFC- und FRET-Analysen wurden dabei relativ neu entwickelte Techniken angewendet. Diese Arbeiten zeigen auch, dass eine Interaktion eines T3-Effektors, welche durch Hefe-Di-Hybrid-Sichtungen gefunden wurde, *in planta* bestätigt werden kann. Bisher wurden nur wenige Proteine beschrieben, welche mit T3-Effektoren phytopathogener Bakterien in der Pflanzenzelle interagieren. Beispielsweise wurden mehrere putative Interaktoren von AvrPto in Hefe-Di- und Hefe-Tri-Hybrid-Sichtungen mit Pto identifiziert, welche als Virulenzzielproteine bezeichnet werden könnten. Für keines dieser Proteine wurde bisher jedoch eine Interaktion *in planta* gezeigt (43). Erst kürzlich wurden mittels Hefe-Di-Hybrid-Sichtung Proteine aus *Malus domestica* identifiziert, welche mit dem *Erwinia*-Effektor DspA/E interagieren. Die Interaktionen konnten *in vitro* bestätigt werden, jedoch erfolgten keine Experimente *in planta* (228).

Eine der ersten *in planta*-Studien zeigte, dass AvrRpt2 aus *P. syringae* und das entsprechende R-Protein RPS2 aus *Arabidopsis*-Zellen koimmunopräzipitieren. Dabei

wurden interessanterweise zusätzliche Proteine mit Molekulargewichten von 75 kDa bzw. 100 kDa detektiert, deren Identität jedoch unbekannt ist (203). Bei einem der in diesen Komplexen enthaltenen Proteine könnte es sich um RIN4 handeln, welches in Hefe als Interaktor von AvrB isoliert wurde (216). Später wurde mit Hilfe von Koimmunoprecipitationsansätzen gezeigt, dass RIN4 tatsächlich in der Pflanze mit AvrB sowie mit AvrRpt2 und AvrRpm1 und den korrespondierenden Resistenzproteinen interagiert (20, 215, 216). Ein weiteres Beispiel eines Virulenzzielproteins, dessen Interaktion mit dem Effektorprotein in der Pflanze gezeigt werden konnte, ist PBS1. Die Studien zeigten, dass der *Pseudomonas*-Effektor HopAR1, welcher vermutlich als Cysteinprotease fungiert, mit der Kinase PBS1 aus *Arabidopsis* interagiert, wodurch diese abgebaut wird (306). Der Abbau von PBS1 führt zur Aktivierung des Resistenzproteins RPS5 und dadurch zur Induktion der Abwehrreaktionen. Bisher wurde für eine Vielzahl weiterer T3-Effektoren phytopathogener Bakterien eine Aktivität als Cysteinprotease postuliert und gezeigt (für einen Überblick siehe (132, 239)). Virulenzziele dieser Effektoren wurden jedoch noch nicht identifiziert.

Die Tatsache, dass die Interaktion zwischen CaIMP α 1 und AvrBs3 Δ 2 mittels KoIP und BiFC-Studien in Pflanzenzellen gezeigt werden konnte, legt den Schluss nahe, dass es sich bei dem in Hefe-Di-Hybrid-Studien identifizierten CaIMP α 1-Protein um einen realen Interaktor des Effektors AvrBs3 handelt.

Um die Interaktion von AvrBs3 und CaIMP α 1 *in planta* zu untersuchen, wurden AvrBs3-Fusionsproteine verwendet. Sowohl die N-terminalen als auch die C-terminalen AvrBs3-Fusionsproteine lokalisierten im Nukleus wie das Wildtyp-Protein (325). Dies zeigt, dass die verwendeten Fusionen den Kernimport nicht behindern. Experimente in Hefe und *in vitro* deuteten an, dass die Interaktion des Paprika-Importin α -Proteins mit AvrBs3 über die NLS 2 des Effektors erfolgt (324). Die hier erfolgten Studien zeigten, dass für die CaIMP α 1-AvrBs3 Δ 2-Interaktion in der Pflanzenzelle tatsächlich die AvrBs3-NLS-Region benötigt wird. Erste FRET-Analysen mit AvrBs3 Δ 2 und CaIMP α 1 ergaben Zellkerne mit positiven, aber auch Zellkerne mit negativen FRET-Effizienzen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Interaktion von Importin α -Molekülen mit AvrBs3 Δ 2 transient erfolgt und nach Kernimport aufgehoben wird. So enthalten Zellkerne mit positiven FRET-Signalen vermutlich CaIMP α 1-AvrBs3 Δ 2-Komplexe, wohingegen in Zellkernen ohne messbaren FRET die Proteinkomplexe bereits dissoziiert sein könnten. Die bekannten Daten über die Wirkungsweise der Kernimportmaschinerie unterstützen diese Hypothese (122, 194). Danach erfolgt die Interaktion von AvrBs3 und Importin α

vermutlich im Zytoplasma und anschließend wird dieser Komplex vermittelt durch ein gebundenes Importin β -Molekül in den Zellkern transportiert. Dort dissoziiert der Proteinkomplex und die Importin α - und β -Moleküle sowie AvrBs3 werden vermutlich freigesetzt. Die Importin-Moleküle können dann zurück in das Zytoplasma gelangen, um neue Proteine für den Kernimport zu binden und AvrBs3 kann als Transkriptionsaktivator fungieren.

Interessanterweise zeigten kürzlich erschienene Arbeiten, dass Importin α -Proteine eine bedeutende Rolle für die Pflanzenabwehr spielen können. *MOS6*, ein Gen aus *Arabidopsis*, kodiert für Importin $\alpha 3$, dessen Deletion eine verstärkte Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pathogenen bewirkt (264). Da die *Bs3* vermittelte Erkennung und die Geninduktion von der Kernlokalisierung von AvrBs3 abhängen, würde eine Deletion von *Caimp α 1* jedoch sowohl die Avirulenz- als auch die Virulenzaktivität beeinträchtigen. Die vorangegangenen Hefestudien zeigten aber, dass verschiedene Importin α - Homologe an die AvrBs3-NLS binden können und vermutlich den Transport des Effektors in den Zellkern vermitteln (324). Die gleichzeitige Deletion oder das „Silencing“ aller Paprikahomologe würde vermutlich pleiotrope Effekte haben und Pathogen unabhängige Prozesse in der Pflanze beeinträchtigen und somit starke negative Einflüsse auf das Wachstum der Pflanze haben.

Da *Caimp α 1* in einer cDNA-Bank aus *C. annuum* cv. ECW-123-Pflanzen, welche das Resistenzgen *Bs3* enthalten, gefunden wurde, könnte es sich bei *Caimp α 1* um *Bs3* handeln (112). Bisher wurden einige Fälle einer direkten Avr-R-Interaktion beschrieben. Beispielsweise interagiert AvrPto aus *P. syringae* mit Pto aus Tomate; AvrPita aus *Magnaporthe grisea* interagiert *in vitro* direkt mit dem Reis-R-Protein Pi-ta und PopP2 aus *R. solanacearum* interagiert mit dem korrespondierenden R-Protein RRS1-R aus *Arabidopsis* (81, 162, 302, 327). *Caimp α 1* kann jedoch nicht für das R-Protein *Bs3* kodieren, da AvrBs3 sowohl in suszeptiblen als auch in resistenten Paprikapflanzen im Nukleus lokalisiert ist und die Expression von *Caimp α 1* in beiden isogenen Linien (ECW-30R und ECW) nachgewiesen werden kann (A. Raschke, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlichte Daten).

Der „Guard“-Hypothese entsprechend (siehe 1.3.2.), könnte der AvrBs3-Interaktor CaIMP α 1 auch ein Virulenzziel von AvrBs3 sein, welches durch *Bs3* „bewacht“ wird (337). CaIMP α 1 interagiert *in planta* spezifisch mit dem NLS-Bereich von AvrBs3, welche in den Proteinen der AvrBs3-Effektorfamilie konserviert ist. Tatsächlich bildet

auch AvrBs4 Δ 2 mit CaIMP α 1 Komplexe in lebenden Pflanzenzellen (A. Raschke, D. Gürlebeck und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es ist demnach wahrscheinlich, dass auch andere AvrBs3-Homologe mit CaIMP α 1 bzw. mit homologen Importin α -Molekülen verschiedener Pflanzenarten interagieren. In diesem Fall würde Importin α ein Virulenzzielprotein vieler T3-Effektoren darstellen. Tatsächlich wurde mit RIN4 bereits ein pflanzliches Zielprotein beschrieben, welches durch mehrere, nicht homologe Effektoren aus *P. syringae* gebunden wird (182, 216, 306). AvrB und AvrRpm1 phosphorylieren RIN4, wohingegen die Cysteinprotease AvrRpt2 den Abbau von RIN4 bewirkt. Dabei ist jedoch noch nicht geklärt, welche Rolle die Modifikationen von RIN4 für die Virulenzaktivität der Effektoren bzw. die Virulenz des Pathogens spielen. RIN4 wird durch die R-Proteine RPM1 und RPS2 „bewacht“ (20, 215, 216). Diese werden durch die Phosphorylierung bzw. den Abbau von RIN4 aktiviert und leiten die pflanzlichen Abwehrreaktionen ein (20, 182, 215, 216). Auch AvrBs3 ähnliche Effektoren werden durch verschiedene *R*-Gene vermittelt, erkannt. Dabei sind diese *R*-Gene und deren Produkte sehr divers: Xa5, z.B., weist Homologie zur γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA auf (36, 157), Xa27 wird durch AvrXa27 induziert (129) und Bs4 ist ein typisches NB-LRR-Resistenzprotein (298). Doch „bewacht“ tatsächlich jedes dieser unterschiedlichen R-Proteine Importin α ? Importin α ist ein essentielles Protein für die pflanzliche Zelle, da es den Transport verschiedener Pflanzenproteine in den Zellkern gewährleistet. Demnach ist es denkbar, dass Importin α -Proteine sehr gut in der Pflanzenzelle „bewacht“ werden. Die Bs3 vermittelte Erkennung von AvrBs3 erfolgt in Abhängigkeit von der Kernlokalisierung des Effektors (324). Da aber AvrBs3 Δ AD, welches die NLS enthält, keine HR in Bs3-Paprikapflanzen induziert, ist die Aktivierung von Bs3 bzw. Bs3 eher von der Aktivität von AvrBs3 als Transkriptionsregulator abhängig und nicht von der Bindung an Importin α . Auch im Fall von AvrXa27 löst nicht die Bindung an ein Importin α -Homolog aus Reis die Abwehrmechanismen aus, sondern vermutlich die Bindung des Effektors an den Promotor des *R*-Gens Xa27 (130). Des Weiteren erkennt Bs4 das homologe AvrBs4-Protein unabhängig von den C-terminalen NLS (23, 298). Dies deutet wiederum darauf hin, dass die Bindung von Importin α nicht für die Gen-für-Gen-Erkennung notwendig ist.

Alle Daten weisen darauf hin, dass Importin α kein klassisches, durch R-Proteine „bewachtes“ Virulenzzielprotein ist. Importin α ist dennoch für die Virulenz- und Avirulenzaktivitäten AvrBs3-ähnlicher Effektoren notwendig, da die Aktivierung der

Genexpression vom Kernimport der Proteine und damit von der Bindung an Importin α -Moleküle abhängig ist. Auch andere T3-Effektoren enthalten NLS, wie z.B. XopD, PopP2, AvrRxxv, AvrBsT und AvrXv4 (63, 81, 251, 281). Für PopP2 aus *R. solanacearum* und XopD aus *Xcv* wurde die Kernlokalisierung bereits gezeigt (81, 148). Dies deutet an, dass auch diese Proteine mit Importin α -Molekülen interagieren könnten. Die eigentlichen Virulenzzielproteine von XopD, z.B., sind vermutlich jedoch bisher unbekannte SUMOylierte Pflanzenproteine (148).

In zukünftigen Studien sollten abschließende Koimmunopräzipitationsexperimente zur Untersuchung der AvrBs3-CaIMP α 1-Interaktion erfolgen, da in der vorliegenden Arbeit dafür zunächst AvrBs3 Δ 2-HA und YFP_C-HA-AvrBs3 Δ 2 verwendet wurden. Für einen besseren Vergleich sollte ein Experiment mit AvrBs3 Δ 2-HA und AvrBs3 Δ 2 Δ NLS-HA erfolgen. Die FRET-Analysen, welche in dieser Arbeit mit AvrBs3-CFP und CaIMP α 1-YFP begonnen wurden, sollten nachfolgend mit allen möglichen Kombinationen der verschiedenen fluoreszierenden Fusionsproteine durchgeführt werden. Dies erfolgte in der Diplomarbeit von A. Raschke. Dabei wurde eine größere Anzahl an Zellkernen untersucht, um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können. Die statistische Auswertung ergab, dass sich, verglichen mit homodimeren Komplexen von Transkriptionsfaktoren (Positivkontrolle) keine stabilen AvrBs3-Importin α -Komplexe in pflanzlichen Zellkernen befinden (A. Raschke, Diplomarbeit, 2006). Dies spricht für die bereits diskutierte transiente Interaktion der untersuchten Proteine.

Interessanterweise ist CaIMP α 1 der bisher einzige beschriebene Interaktor eines Effektors der AvrBs3-Familie. In dieser Arbeit wurden jedoch auch weitere potentielle AvrBs3-Interaktoren identifiziert, die nachfolgend diskutiert werden.

4.1.4. Hemmt AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese im Zytoplasma?

Während einer Hefe-Di-Hybrid-Sichtung mit AvrBs3 als Köder wurde LeThiC als putativer Interaktor von AvrBs3 identifiziert. Die LeThiC-AvrBs3-Interaktion konnte in Hefe und *in vitro* reproduziert werden und erfolgt spezifisch mit Mitgliedern der AvrBs3-Familie. Analysen mit verschiedenen Deletionskonstrukten von AvrBs3 zeigten, dass die Interaktion mit LeThiC mit der „Repeat“-Region erfolgt und von der Anzahl der „Repeats“, nicht aber von deren Position oder variablen Aminosäureresten abhängt. *In*

planta durchgeführte Interaktionsstudien konnten die Interaktion bisher jedoch nicht bestätigen: In BiFC-Analysen interagierte weder AvrBs3 Δ 2, welches relativ schnell in den Zellkern importiert wird, noch AvrBs3 Δ 2 Δ NLS, welches im Zytoplasma verbleibt, mit LeThiC. AvrBs3 Δ 2 wurde zuvor jedoch erfolgreich für *in planta*-Interaktionsstudien mit CaIMP α 1 mittels BiFC verwendet. Auch für das entsprechende LeThiC-Fusionsprotein wurde eine Interaktion unter Verwendung der BiFC-Methode gezeigt (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion zwischen AvrBs3 und LeThiC zu schwach ist, um mit den zur Verfügung stehenden Techniken *in planta* nachgewiesen zu werden. Es ist ebenfalls möglich, dass die fusionierten YFP-Hälften die hier untersuchte Interaktion behindern. Koimmunopräzipitationen der möglichen AvrBs3-LeThiC-Komplexe aus Pflanzenzellextrakten waren bisher nicht möglich, da bereits nach Immunopräzipitationsreaktionen nach Expression von *LeThiC*-Fusionen nicht genügend Protein detektiert werden konnte.

Eine weitere mögliche Erklärung bietet die Lokalisierung von Effektor und Interaktor. Aufgrund seiner Homologie könnte der Interaktor LeThiC eine Rolle in der Vitamin B1-Synthese in der Pflanze spielen, welche früheren Arbeiten zufolge vermutlich in den Chloroplasten erfolgt (28, 170, 278). Tatsächlich deuteten physiologische Komplementationsanalysen an, dass LeThiC an der Vitamin B1-Synthese in der Pflanze beteiligt ist. Jedoch wurde LeThiC in der vorliegenden Arbeit im Zytoplasma von Pflanzenzellen lokalisiert. Die zu den früheren Arbeiten an Vitamin B1-Synthaseenzymen widersprüchliche Lokalisierung könnte in der Verwendung N-terminaler Fusionsproteine begründet sein, welche die Erkennung des Signalpeptids für den Chloroplastenimport behindern. C-terminale Fusionen konnten aber weder mittels Fluoreszenzmikroskop noch mittels Westernblot nachgewiesen werden. Die Vorhersagen verschiedener Computerprogramme waren sehr unterschiedlich und erlaubten keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung von LeThiC. Aufgrund dieser Daten kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher gesagt werden, in welchem Kompartiment LeThiC lokalisiert. In weiterführenden Arbeiten könnten andere Epitope an *LeThiC* fusioniert werden oder aber Antikörper gegen LeThiC hergestellt werden, welche dann für die Detektion des Proteins nach Fraktionierung von Pflanzenmaterial und Isolierung von Chloroplasten verwendet werden können. Da AvrBs3 zunächst von *Xcv* ins pflanzliche Zytoplasma injiziert wird, und die Synthese von LeThiC im Zytoplasma der Pflanzenzelle erfolgt, ist jedoch, trotz

unterschiedlicher Lokalisierung von AvrBs3 und LeThiC, nicht auszuschließen, dass beide Proteine transient im Zytoplasma interagieren.

Vitamin B1 dient als Kofaktor von Enzymen des Zitratzyklus. Um die Frage nach einer möglichen biologischen Relevanz der in Hefe gefundenen Interaktion zwischen AvrBs3 Δ 2 und LeThiC zu klären, wurden „Silencing“-Experimente mittels VIGS in *N. benthamiana* und Paprika durchgeführt. Die makroskopisch sichtbaren Reaktionen der Pflanzen nach anschließender Infektion mit *avrBs3*-exprimierenden Agrobakterien bzw. Xanthomonaden lieferten keine Hinweise dafür, dass LeThiC an der Ausbildung der Hypertrophie beteiligt ist. Um sicherzustellen, dass das VIGS erfolgt war, müsste überprüft werden, ob die Transkriptmenge der homologen *ThiC*-Gene in *N. benthamiana* und Paprika hinreichend reduziert werden konnte. Interessanterweise zeigten jedoch spezifisch die Pflanzen, für welche das *LeThiC*-„Silencing“-Konstrukt verwendet wurde einen deutlich abweichenden Phänotyp im Vergleich zu Pflanzen, in welchen Fragmente des *GFP*- oder *PDS*-Gens verwendet wurden. Dies legt den Schluss nahe, dass das „Silencing“ der *ThiC*-Homologen in beiden Pflanzenarten erfolgreich war. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass wenige, noch vorhandene LeThiC-Moleküle ausreichen, um die AvrBs3-spezifischen Reaktionen auszulösen.

Interessanterweise wurde bei den Analysen zur biologischen Bedeutung der AvrBs3-LeThiC-Interaktion ein verminderter Vitamin B1-Gehalt in Pflanzen, welche *avrBs3* exprimieren, verglichen mit Pflanzen, welche kein Wildtyp-*avrBs3* exprimieren, festgestellt. Dies deutet an, dass AvrBs3 die Vitamin B1-Synthese hemmt oder zumindest verzögert. Dies erscheint im Vergleich aktueller Arbeiten, welche Hinweise dafür liefern, dass Vitamin B1 eine Rolle während der pflanzlichen Abwehr spielt, vorstellbar. So wurde gezeigt, dass Thiamin in verschiedenen Pflanzenarten Resistenz induziert, unabhängig von der untersuchten Pathogen-Wirt-Interaktion (7). Dabei wurde festgestellt, dass verschiedene *PR*-Gene durch Thiamingabe verstärkt exprimiert wurden. Wang und Kollegen isolierten das Reisgen *OsDR8*, welches für die Resistenz der Pflanzen gegenüber *Xoo* und *Magnaporthe grisea* bedeutend ist (350). Interessanterweise zeigte das Genprodukt Homologie zu einem Enzym der Thiaminsynthese. Transgene Pflanzen, welche eine reduzierte Expression von *OsDR8* und eine reduzierte Resistenz zeigten, enthielten außerdem weniger Thiamin als die Kontrollpflanzen. Wurde Vitamin B1 zugegeben, konnte der beobachtete Resistenzverlust komplementiert werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Akkumulation von Vitamin B1 für die Abwehrreaktionen der Reispflanzen essentiell ist. Diese Daten berücksichtigend, ist es vorstellbar, dass AvrBs3

an LeThiC bindet, dessen enzymatische Aktivität inhibiert und dadurch die Abwehr der Pflanze verzögert.

Um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, mussten die zu vergleichenden *Agrobacterium* vermittelten Expressionen nebeneinander in einem Blatt erfolgen. Dazu wurde das Experiment in *N. benthamiana* durchgeführt, da nur in diesen Pflanzen eine ausreichend große Fläche mit *Agrobacterium* durch einmaliges Aufsetzen der Spritze infiziert werden konnte. Um die Variabilität der individuellen Pflanzen zu umgehen und mit Tomate arbeiten zu können, aus welcher *LeThiC* isoliert wurde, könnten zukünftig ähnliche Experimente mit Zellkulturen von *L. esculentum* durchgeführt werden. Ein solcher Ansatz ermöglicht die *Agrobacterium* vermittelte Expression des Effektorgens und stellt ausreichend Zellmaterial für die Extraktion der Thiamin-Verbindungen zur Verfügung. Des Weiteren könnten nach Etablierung eines solchen experimentellen Ansatzes, eine Reihe von AvrBs3-Deletionsderivaten getestet werden, um zu prüfen, von welcher Region des Effektors die Hemmung des Vitamin B1-Synthese-Enzyms abhängt.

Weiterhin könnten VIGS-Experimente durchgeführt werden, und die Pflanzen nach erfolgtem „Silencing“ mit unterschiedlichen Pathogenen infiziert werden. Diese Ansätze könnten zeigen, ob das Vorhandensein von LeThiC auch einen Einfluss auf andere Pathogen-Wirt-Interaktionen hat. In den durchgeführten Arbeiten wurde nach „Silencing“-Ansätzen mit *LeThiC*-Fragmenten zumindest keine verminderte Resistenz von *BsI*-Paprikapflanzen gegenüber AvrBs1 translozierenden *Xcv*-Stämmen beobachtet. Es ist denkbar, dass für die *BsI* vermittelte Erkennung von AvrBs1 Vitamin B1 keine Rolle spielt. Der nach durchgeführtem VIGS von *LeThiC* spezifisch veränderte Phänotyp der Paprikablätter deutet an, dass das „Silencing“ erfolgreich war. Möglich ist aber, dass durch das „Silencing“ des Paprika-*ThiC*-Gens die Thiaminmenge nicht ausreichend reduziert war, um einen Einfluss auf die AvrBs1-Bs1-Erkennung beobachten zu können. Die Überexpression von LeThiC hatte vermutlich keinen Einfluss auf die durch AvrBs3 ausgelösten Reaktionen, da es sich bei LeThiC nur um ein Enzym zu Beginn einer Biosynthesekaskade handelt. Alle folgenden, an der Thiaminsynthese beteiligten, Enzyme bestimmen die Reaktionsgeschwindigkeit der Biosynthese.

Neben den beschriebenen *in planta*-Studien, könnte ein weiterer, einfacher experimenteller Ansatz in *E. coli* klären, ob LeThiC von AvrBs3 inhibiert wird. Dafür sollte *LeThiC* zunächst in mutanten *E. coli*-Stämmen, in welchen *ThiC* deletiert ist (21), exprimiert werden. Diese Stämme zeigen vermutlich ein stark reduziertes Wachstum. Erfolgt eine Komplementation der *ThiC*-Mutation durch *LeThiC*, so sollten die *LeThiC*-

exprimierenden Zellen ohne Vitamin B1-Zugabe ähnlich wie der Wildtyp-Stamm wachsen. Ist dies der Fall, könnte im selben Stamm auf einem weiteren Plasmid *avrBs3* exprimiert und das Bakterienwachstum beobachtet werden. Ist das Wachstum ohne Vitamin B1-Zugabe in diesem Stamm wieder reduziert, so ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass AvrBs3 tatsächlich das Enzym LeThiC blockiert. Die Tatsache, dass die AvrBs3-LeThiC-Interaktion in GST-„pull-down“-Experimenten nach Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* gezeigt werden konnte, zeigt, dass ein solcher Ansatz in *E. coli* prinzipiell erfolgreich verlaufen könnte. Tatsächlich wurden derartige Komplementationsanalysen bereits für andere pflanzliche Enzyme der Vitamin B1-Synthese erfolgreich angewendet (184).

4.1.5. Interagiert AvrBs3 im Zellkern mit pflanzlichen Proteinen?

Sowohl die in Vorarbeiten identifizierten Interaktoren von AvrBs3 (324; B. Szurek, Doktorarbeit, 2001) als auch das neu gefundene LeThiC-Protein sind zytoplasmatische Proteine. Das Zielkompartiment von AvrBs3 ist jedoch der Zellkern der Pflanzenzelle, in welchem es die Expression verschiedener Gene induziert (221; S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Bisher ist nicht bekannt, ob AvrBs3 selbst oder innerhalb eines Proteinkomplexes an Promotoren bindet. Da in AvrBs3 keine offensichtliche, bekannte DNA-Bindedomäne enthalten ist, wurde spekuliert, dass AvrBs3 mit einem Pflanzenprotein interagiert, welches an DNA binden kann. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein solches DNA-bindendes Protein in einem erneuten Hefe-Di-Hybrid-Ansatz zu identifizieren, wurde das putative LZ-Motiv als Köder verwendet. LZ-enthaltende Transkriptionsfaktoren binden über dieses Motiv als dimere Komplexe an DNA (199, 311). Die Analysen zur AvrBs3-AvrBs3-Interaktion zeigten, dass der putative AvrBs3-LZ nicht an einer Homodimerisierung des Effektors beteiligt ist. Wie in diesem Zusammenhang bereits diskutiert, ist es jedoch denkbar, dass AvrBs3 über das putative LZ-Motiv mit pflanzlichen Transkriptionsregulatoren der bZIP-Familie interagiert.

Unter Verwendung von AvrBs3-LZ als Köder wurden zwei potentielle, spezifische Virulenzzielproteine von AvrBs3 identifiziert. Einer der Interaktoren zeigt Homologie zu einer reduzierenden Koenzym-F₄₂₀-Hydrogenase aus *Arabidopsis* (*Aip7*). Das andere mit AvrBs3 interagierende Protein zeigt Homologie zu dem Homeoboxprotein MERISTEM LAYER L1 aus *Arabidopsis* (*Aip8*). Homeoboxproteine sind Transkriptionsregulatoren,

welche demzufolge kernlokalisiert sind. Innerhalb des interagierenden Fragmentes befindet sich auch ein LZ-Motiv. Aip8 stellt somit einen potentiellen Kandidaten eines kernlokalisierten AvrBs3-Virulenzzielproteins dar, mit dessen Hilfe AvrBs3 an Promotoren, z.B. der identifizierten *upa*-Gene binden könnte. Das Homolog AtML1 ist vermutlich an der Differenzierung der Epidermis beteiligt (217). Northernblotanalysen mit *Arabidopsis* zeigten, dass *AtML1* nur in Knospen exprimiert wird (214). Die cDNA-Bank, aus welcher *Aip8* isoliert wurde, wurde aber nur mit RNA aus Laubblättern von Tomate erstellt. Später erfolgte, vergleichende RT-PCR-Studien mit 16 Genen der Homeodomäne-LZ-Familie zeigten jedoch, dass *AtML1* auch in Blättern und Stängeln von 40 Tage alten Pflanzen exprimiert wird (243). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass Aip8 nicht nur in der frühen Embryoentwicklung eine Rolle spielt, sondern auch in bereits ausdifferenzierten Geweben älterer Pflanzen. Welche Funktion Aip8 dabei hat und wie diese von AvrBs3 beeinflusst werden könnte, ist unklar. Denkbar ist, dass AvrBs3 im Komplex mit Aip8 an die Promotorsequenz eines Transkriptionsfaktors bindet, welcher die Hypertrophie induziert. Da Aip8 nur zu 64% identisch mit AtML1 ist, ist es auch möglich, dass beide Proteine unterschiedliche Funktionen haben.

Die vollständigen cDNA-Moleküle beider neu identifizierten spezifischen AvrBs3-Interaktoren wurden bereits isoliert (M. Egler und U. Bonas, unveröffentlichte Daten; A. Raschke, 2006 Diplomarbeit). Aufgrund der Ähnlichkeit von Aip8 zu einem Transkriptionsregulator scheint dieser AvrBs3-Interaktor besonders interessant. Aip8 lokalisiert tatsächlich, wie für Transkriptionsregulatoren erwartet, im Zellkern der Pflanzenzelle (M. Egler und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise interagiert Aip8 nicht nur mit AvrBs3, sondern auch mit HpaA, einem Protein aus *Xcv*, welches ebenfalls in den pflanzlichen Zellkern lokalisiert (O. Kirchner, M. Egler und U. Bonas, 154)). Eine verminderte HR in Paprika ECW-30R-Pflanzen nach „Silencing“ von *Aip8* lässt eine Relevanz der Protein-Interaktion für die *Bs3* vermittelte Erkennung von AvrBs3 vermuten (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit). Bisher konnte eine Interaktion von Aip8 und AvrBs3 weder *in vitro* noch *in planta* gezeigt werden (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit). Da die Interaktionsstudien aufgrund nicht detektierbarer Proteinmengen nicht erfolgen konnten (A. Raschke, 2006, Diplomarbeit), kann jedoch derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass AvrBs3 und Aip8 tatsächlich in der Pflanze interagieren.

4.2. Virulenzaktivitäten der Typ-III-Effektoren AvrBs1, AvrBs3 und AvrBs4 aus *Xcv*: unterschiedliche Proteine mit ähnlicher Wirkung?

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von *avrBs1*, *avrBs3* und *avrBs4* in *N. benthamiana* zu sichtbaren pflanzlichen Reaktionen führt. Diese potentiellen Virulenzfunktionen der untersuchten Effektoren stellen im Gegensatz zu deren Avirulenzaktivitäten in resistenten Pflanzen Primärfunktionen der Proteine dar. Bisher ist jedoch nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, wie Effektoren zur Virulenz eines Pathogens beitragen. Während die Avirulenzaktivitäten der Effektoren aufgrund der meist induzierten HR leicht zu verfolgen sind, bleiben die Virulenzaktivitäten einzelner Effektoren oft unsichtbar. Dies liegt z.B. an der Vielzahl injizierter Effektoren, welche teilweise redundante Funktionen aufweisen. So transloziert *Xcv*, z.B., mindestens 20 verschiedene Effektorproteine in die Pflanzenzellen (329). Für weiterführende Analysen, z.B. nach Identifizierung von Virulenzzielen, sind jedoch sichtbare oder messbare Virulenzfunktionen notwendig. Veränderungen solcher sichtbaren Reaktionen nach „Silencing“ oder Überexpression eines Virulenzziel-protein kodierenden Gens können z.B. Aufschluss über die biologische Relevanz eines solchen Virulenzzielproteins geben. Die Verwendung der *Agrobacterium* vermittelter Expression erlaubte hier das isolierte Studium spezifisch durch AvrBs1, AvrBs3 oder AvrBs4 ausgelöster Effekte.

4.2.1. AvrBs3 und AvrBs4 können vermutlich der pflanzlichen Abwehr entgegenwirken

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass *Xcv*-Stämme, welche sowohl AvrBs1 als auch AvrBs3 translozieren, keine *Bs1*-spezifische HR in *C. annuum* cv. ECW-10R induzieren. Bei gleichzeitiger Translokation von AvrBs1 und dem nicht funktionalen AvrBs3 Δ AD wurde hingegen eine *Bs1*-spezifische HR ausgelöst. Diese Daten deuten darauf hin, dass AvrBs3, in Abhängigkeit der AD die AvrBs1-Erkennung in Paprika supprimiert. Die Notwendigkeit der AD legt die Vermutung nahe, dass die HR-Unterdrückung Folge der Aktivität von AvrBs3 als Transkriptionsaktivator ist, d.h. die Aktivierung bestimmter Gene durch AvrBs3 führt zur Unterdrückung der AvrBs1-spezifischen HR.

Interessanterweise wurde bereits für eine Anzahl von T3-Effektoren aus dem phytopathogenen Bakterium *P. syringae* eine Aktivität als Zelltods Suppressoren beobachtet (cell death suppressing (CDS) activity; 1, 77, 231). Darunter waren Effektoren, die als Protease, Tyrosinphosphatase oder E3-Ligase fungierten (2, 50, 95, 182). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint auch AvrBs3 aus *Xcv* eine solche CDS-Aktivität zu besitzen. Arbeiten von Keshavarzi und Mitarbeitern deuteten bereits an, dass Effektorproteine aus *Xcv* basale Abwehrmechanismen der Pflanze unterdrücken können, welche durch LPS hervorgerufen wurden (180). In den dabei erfolgten Studien wurde der *Xcv*-Stamm 85-10 verwendet, in welchem weder *avrBs3* noch *avrBs4* enthalten sind. Demnach scheinen in *Xcv* 85-10 andere Effektoren als Abwehrsuppressoren zu fungieren.

Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnissen zeigten kürzlich Studien von Fujikawa und Mitarbeitern, dass Mitglieder der AvrBs3-Familie die Basalabwehr der Pflanze, welche durch *P. fluorescens* induziert wird, unterdrücken können (110). In der vorliegenden Arbeit wurde die CDS-Aktivität von AvrBs3 unter natürlicheren Bedingungen bei Infiltration mit *Xanthomonas* gezeigt. Die HR-Unterdrückung wurde jedoch nur beobachtet, wenn der langsam wachsende *Xcv*-Stamm I74A verwendet wurde und nicht bei Infiltration mit dem Wildtyp-Stamm 85-10. Vermutlich transloziert *Xcv* 85-10 eine größere Anzahl an AvrBs1-Molekülen, so dass die, durch AvrBs1 induzierte, *Bs1* vermittelte HR zu schnell induziert wird, um effektiv durch AvrBs3 blockiert zu werden. Des Weiteren wurde der Effekt, ähnlich wie in anderen Studien, nur bei Infektion mit geringer Bakteriendichte beobachtet (171, 212). Diese Bedingungen könnten die natürlichen Bedingungen im Feld reflektieren, in welchen die Bakterien in geringer Dichte in die Pflanze gelangen.

Die Tatsache, dass auf Reis pathogene *Xoo*-Stämme eine Vielzahl von *avrBs3*-Homologen im Genom enthalten und viele *Xcv*-Stämme kein oder nur ein AvrBs3-Mitglied enthalten, deutet darauf hin, dass *Xcv* AvrBs3 bzw. AvrBs4 durch horizontalen Gentransfer erworben hat. Diese Hypothese unterstreichend werden beide *avr*-Gene auf Plasmiden kodiert (45, 47). Da *avrBs3* in *Xcv* positiv selektiert wurde, muss das Effektorprotein für das Pathogen von Vorteil sein. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine CDS-Aktivität von AvrBs3 *Xcv* befähigt, auch *Bs1* exprimierende Paprikapflanzen zu besiedeln, indem die Erkennung von AvrBs1 unterdrückt wird.

In aktuellen Studien wurde außerdem gezeigt, dass T3SS abhängig translozierte Proteine aus *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) die Gen-für-Gen-Erkennung AvrBs3-homologer Effektoren aus *Xoo* supprimieren (218). Auch der dabei untersuchte *Xoc*-Stamm exprimiert

mehrere *avrBs3*-homologe Gene (366). Daher ist es vorstellbar, dass in diesem Fall AvrBs3-Familienmitglieder eine Verzögerung der R-Protein vermittelten Zelltodreaktion verursachen. Die CDS-Aktivität von AvrBs3 könnte auch zur Verzögerung der nekrotischen Läsionen führen, welche im Endstadium der bakteriellen Fleckenkrankheit sichtbar werden. Dies wurde z.B. für HopPtoN aus *P. syringae* gezeigt (1, 212). Es wird angenommen, dass der programmierte Zelltod in Pflanzen quantitativ, durch eine bestimmte Signalanzahl, ausgelöst wird (309, 328). Daher ist es wahrscheinlich, dass Effektoren verschiedene positive und negative Regulatoren des PCD beeinflussen, um in der Summe effektiv die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu blockieren (1). Auch die bereits erwähnten Arbeiten von Kesharvazi *et al.* mit *Xcv* 85-10 deuten darauf hin (180). Tatsächlich wurden innerhalb der letzten Jahre, neben AvrBs3, weitere Effektoren von *Xcv* identifiziert, die eine CDS-Aktivität zeigen (L. Escolar, A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die molekularen Mechanismen der Zelltodsuppression sind allerdings noch unklar.

In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant die molekularen Mechanismen der HR-Unterdrückung aufzuklären. HopPtoD2 muss z.B. als Tyrosinphosphatase aktiv sein, um die durch *P. syringae* ausgelöste Pflanzenabwehr unterdrücken zu können (50, 95).

Die gleichzeitige Translokation von AvrBs1- und AvrBs3-Derivaten, denen NLS, LZ oder Teile der „Repeat“-Region fehlen, aus *Xcv*, könnten zunächst Aufschluss geben, welche Proteinbereiche für die HR-Unterdrückung notwendig sind. Da die AD von AvrBs3 für die CDS-Aktivität wichtig zu sein scheint, induziert AvrBs3 vermutlich die Expression verschiedener Pflanzengene, wodurch die AvrBs1-Erkennung blockiert wird. Eines der durch AvrBs3 induzierten Gene („genes upregulated by AvrBs3“, *upa*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor der ERF/AP2 („Ethylene Responsive Element Binding Factors/APETALA2“-)Familie (256). Transkriptionsfaktoren dieser Familie sind häufig an der Aktivierung der *PR*-Genexpression beteiligt. Das identifizierte Upa-Protein (Upa12) enthält jedoch ein EAR („ERF-associated“-)Repressormotiv (255), welches möglicherweise die *PR*-Gen-Aktivierung hemmt. Upa12 ist somit ein guter Kandidat, welcher nach Induktion durch AvrBs3, die pflanzliche Abwehr blockieren könnte. Demnach könnte getestet werden, ob Pflanzen, welche *upa12* exprimieren, in der Lage sind, AvrBs1 zu erkennen. Da *Bs1* noch nicht kloniert wurde und die Generierung transgener Paprikapflanzen sehr schwierig ist, muss ein entsprechendes Experiment in Paprika mittels *Agrobacterium* vermittelter Expression von *upa12* erfolgen. Anschließend könnte dann der AvrBs1 translozierende Stamm I74A mit niedriger Dichte infiltriert

werden. Um die Problematik der gleichzeitigen Infektion von Pflanzenteilen mit *Agrobacterium* und *Xanthomonas* zu umgehen, sollte *avrBs1* ebenfalls mittels *Agrobacterium* in der Pflanze exprimiert werden. Die Verwendung eines schwachen Promotors, z.B. des minimalen *Bs4*-Promotors (299), könnte dabei die Synthese einer niedrigeren Anzahl an AvrBs1-Molekülen ermöglichen, da von *Xcv I74A* auch nur wenige Effektormoleküle transloziert werden. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob auch andere Zelltodreaktionen von AvrBs3, bzw. von Upa12, unterdrückt werden. So könnten Ansätze mit *P. fluorescens* gewählt werden, um zu testen, ob AvrBs3 bzw. Upa12 die Basalabwehr der Pflanze unterdrücken, wie es für AvrXa7, AvrXa10 und Apl1 gezeigt wurde (110). Ebenso könnten andere *R*-Gen-spezifische Zelltodreaktionen untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien deuten auch für das AvrBs3-homologe Effektorprotein AvrBs4 eine die Abwehr supprimierende Funktion an. So zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass Blatt-Peroxisomen *avrBs4* exprimierender Zellen auffällig große Kristalle enthalten. Diese Kristalle, auch als „crystalline core“ bezeichnet, sind Anhäufungen des Enzyms Katalase (106). Katalase ist ein Enzym, welches das als Zellgift wirkende Wasserstoffperoxid durch Disproportionierung zu Sauerstoff und Wasser beseitigt. Wasserstoffperoxid wird in den Peroxisomen durch verschiedene Oxidationsprozesse sowie durch die Disproportionierung von Sauerstoffradikalen gebildet (79). Pathogenbefall induziert eine verstärkte Produktion von H₂O₂ und ROS, welche Zellschäden verursachen können, da die antioxidativen Enzyme, wie z.B. die Katalase, die erhöhte H₂O₂-Menge nicht abbauen können (79). Dadurch kann das gebildete H₂O₂ aus den Peroxisomen in das Zytoplasma gelangen (78). H₂O₂ bewirkt Zelltodreaktionen während der HR, wirkt direkt toxisch auf Pathogene, ist Substrat für strukturelle Schutzbarrieren sowie Signalmolekül für die pflanzliche Abwehr (13, 17, 117, 237, 361). Speziell die systemisch erworbene Resistenz (SAR) aber auch lokale Abwehrreaktionen benötigen H₂O₂ (295). So wurde beispielsweise festgestellt, dass exogen zugegebene Katalase nekrotische Reaktionen bei Pathogenbefall verhindert und die Bildung von ROS während des „oxidative burst“ inhibiert (82, 223, 361). Interessanterweise wurde auch beobachtet, dass Tabakpflanzen mit reduziertem Katalasegehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenbefall zeigen (61, 235). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Signalmoleküle, welche die pflanzliche Abwehr induzieren, wie z.B. SA, die Katalaseaktivität in Tabak hemmen können (70).

Die bekannten Daten über pflanzliche Katalasen berücksichtigend, liegt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung des Katalasegehaltes in Peroxisomen von Pflanzenzellen eine Virulenzfunktion von AvrBs4 darstellt. Die durch AvrBs4 möglicherweise verursachte, vermehrte Produktion von Katalase könnte den genannten Effekten entgegenwirken und so die Abwehrreaktionen der Pflanze unterdrücken. Da die Kristalle nur nach Expression von *avrBs4* beobachtet wurden, handelt es sich um eine spezifisch durch AvrBs4 ausgelöste Katalasebildung und ist nicht auf *Agrobacterium* selbst zurückzuführen. In weiterführenden Experimenten könnte geprüft werden, ob AvrBs4 direkt die Expression des Katalasegens beeinflusst. Mit sensitiven Methoden wie quantitativen RT-PCR sollte die Expression des Katalasegens nach transienter Expression unterschiedlicher Effektorgene verglichen werden. Bei Induktion des Katalasegens durch AvrBs4 wäre auch interessant zu prüfen, ob AvrBs4 direkt an dessen Promotorregion binden kann. Des Weiteren könnte für verschiedene Pathogen-Wirt-Interaktionen getestet werden, ob bei gleichzeitiger Anwesenheit von AvrBs4 spezifische Abwehrreaktionen verzögert oder unterdrückt werden. Dabei sollte nicht nur die HR beobachtet, sondern auch die Katalaseaktivität wie in der Literatur beschrieben, bestimmt werden (84, 217). Interessanterweise wurde in Studien an dem Pilzpathogen *Botrytis cinerea* und dessen Interaktion mit Tomate eine Abnahme der Katalaseaktivität mit Beginn der Krankheitssymptome festgestellt. *Botrytis* ist jedoch anders als *Xcv* ein nekrotrophes Pathogen, welches sich von totem Pflanzenmaterial ernährt. Somit ist es durchaus denkbar, dass verschiedene Pathogene unterschiedlich auf die Katalase wirken. In den weiteren Analysen sollte daher die Katalasemenge und deren Aktivität nicht nur nach Expression von *avrBs4* in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium*, sondern auch nach Infektion von Paprika- und Tomatenpflanzen mit AvrBs4-translozierender *Xcv*-Stämmen untersucht werden.

4.2.2. AvrBs1 und AvrBs3 induzieren eine Hypertrophie der Mesophyllzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde in den mikroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass AvrBs1 eine ähnliche Vergrößerung von Mesophyllzellen verursacht wie AvrBs3, obwohl beide Proteine keinerlei Homologie aufweisen. Das AvrBs3-homologe AvrBs4 hingegen induziert nur sehr geringe, kaum mikroskopisch sichtbare Vergrößerungen der Mesophyllzellen. Dies zeigt, dass die geringen Unterschiede der Aminosäuresequenzen

innerhalb der „Repeat“-Region stark voneinander abweichende Virulenzaktivitäten bedingen. Es zeigt aber auch, dass AvrBs4 einen Effekt, wenn auch einen geringen, auf die infizierten Zellen hat.

Die Vergrößerung von Pflanzenzellen benötigt (i) ein Wachstum der Zellwand, (ii) ein Wachstum der Zentralvakuole, um die Zelle zu stabilisieren sowie (iii) Energie für die genannten Aufbauprozesse. Die mikroskopischen Studien, in welchen die Zellwand und die Chloroplasten angefärbt wurden, nicht jedoch die Zentralvakuole, zeigten, dass *avrBs1* und *avrBs3* eine Vergrößerung der Vakuole und ein Streckenwachstum der Zellwand verursachen. Wird ein Zellstreckungswachstum induziert, so erfolgt zunächst ein Ionenstrom in die Vakuole, welcher einen Wassereinstrom zufolge hat. Dadurch werden der Tonoplast, die Plasmamembran und die Zellwand gedehnt. Interessanterweise wurden neben kleinen Vesikeln, welche wahrscheinlich Stoffe für den Zellwandaufbau enthalten, auch Membranstrukturen innerhalb der Zentralvakuolen beobachtet. Diese könnten möglicherweise nach der Streckung der Zentralvakuole mit dem Tonoplasten fusionieren.

Die Chloroplasten von vergrößerten Pflanzenzellen, welche *avrBs1* oder *avrBs3* exprimieren, enthielten keine Stärkekörner. Nicht oder kaum vergrößerte Zellen von unbehandelten Pflanzen, *uidA* bzw. *avrBs4* exprimierenden Blattbereichen oder der Epidermis hingegen enthielten stets Stärkekörner. Dies deutet an, dass die Effektoren AvrBs1 und AvrBs3 auch einen Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben. Möglich ist, dass keine Speicherstärke gebildet wird, da die Kohlenhydrate zur Energiegewinnung für das Zellwachstum verwendet werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass bereits vorhandene Stärkekörner zur Energiegewinnung abgebaut werden.

Epidermiszellen zeigten keine Vergrößerung, obwohl *Agrobacterium* anders als *Xcv* auch dieses Gewebe infiziert. Das könnte dadurch erklärt werden, dass die Epidermiszellen sehr dicht angeordnet sind und von einer stabilen, dicken Kutikula nach außen begrenzt werden. Interzellularräume, in welche sich die Zellen ausdehnen könnten, fehlen.

Interessanterweise induzierte der *Xcv*-Stamm I74A(*avrBs3ΔAD*), welcher AvrBs1 und nicht funktionale AvrBs3ΔAD-Moleküle transloziert, in Paprika ECW einige Pusteln an der Blattoberfläche. Diese Pusteln könnten durch AvrBs1 ausgelöst worden sein. Überraschenderweise wurden in Paprika ECW-30R keine Pusteln beobachtet. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bewirkt AvrBs1 jedoch kaum Verlängerungen der Mesophyllzellen, sondern hauptsächlich deren Verbreiterung. Dies könnte erklären, wieso makroskopisch nicht immer Pusteln zu beobachten sind. Im Gegensatz dazu verursacht

AvrBs3 immer auch makroskopisch sichtbare Pusteln. Damit übereinstimmend waren in den hier erfolgten Analysen AvrBs3-synthetisierende Mesophyllzellen doppelt so lang wie *avrBs1*-exprimierende Mesophyllzellen von *N. benthamiana*.

Da I74A ein Derivat von *Xcv* 85-10 ist, welcher mindestens 20 Effektoren enthält (329), ist nicht auszuschließen, dass nicht AvrBs1, sondern ein anderer, noch nicht identifizierter Effektor für die Induktion der Pusteln verantwortlich ist.

Möglicherweise lösen nicht nur AvrBs1 und AvrBs3 Hypertrophiesymptome aus. Aufgrund der schnellen Etablierung der wässrigen Läsionen und der sich anschließenden Zerstörung des Gewebes bei Infektion durch Wildtyp-*Xcv*-Sämme bleibt dies jedoch vermutlich unentdeckt. Die Erstellung multipler Mutanten könnte dabei helfen, weitere Effektoren zu identifizieren, die eine Hypertrophie induzieren können.

Es bleibt zu klären, wie und vor allem warum Effektoren eine Hypertrophie induzieren. Eine Möglichkeit ist, dass die Hypertrophie eine Freisetzung der bakteriellen Zellen an die Oberfläche der infizierten Pflanze ermöglicht. Das Pathogen könnte anschließend in neue, nicht-infizierte Bereiche eindringen. Für AvrB6 aus *X. campestris* pv. *malvacearum* und PthA aus *X. citri*, zwei Mitglieder der AvrBs3-Familie, wurde z.B. gezeigt, dass diese eine Freisetzung des Pathogens an die Pflanzenoberfläche bewirken (368). PthA induziert eine Hyperplasie des Gewebes, d.h., eine Vermehrung der Mesophyllzellen, so dass Tumore entstehen und das Gewebe zerstört wird, was die Freisetzung der Bakterien erklärt (53, 132, 322). AvrB6, jedoch, verursacht keine Hyperplasie, sondern eine Verstärkung der wässrigen Läsionen. Es wurde aber auch gezeigt, dass die *Agrobacterium* vermittelte Expression von *pthA* in *Citrus* nicht nur zu Hyperplasie, sondern auch zu Hypertrophie der Zellen führt (87). Auch für andere Xanthomonaden wurde eine Induktion von Hypertrophiesymptomen in der Pflanze beobachtet (167, 323). Es ist denkbar, dass während der Hypertrophie die Epidermiszellen, welche bedeckt von der Kutikula nicht ausweichen können, durch das Wachstum der Mesophyllzellen ebenfalls zerstört werden. Dies wurde jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Analysen nach Expression von *avrBs3* und *avrBs1* nicht beobachtet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bakterien nach ihrer Vermehrung durch die aus dem Zellwachstum folgende Reduktion des Interzellularraumes durch Stomata an die Blattoberfläche gedrückt werden. Um dies zu überprüfen sollten entsprechende Experimente nach Yang *et al.* (1994) erfolgen. Feldstudien beschrieben tatsächlich eine durch AvrBs3 bedingte bessere Verbreitung von *Xcv* (360).

Interessanterweise wurden auch bei der Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nematoden *Meloidogyne javanica* und Tomate stark vergrößerte Zellen („giant cells“) beobachtet, welche vom Gallengewebe umgeben sind (113). An dem Wachstum dieser so genannten „Riesenzellen“ sind Expansine beteiligt, die eine Auflockerung der Zellwand bewirken (113, 225). Auch bei der Induktion der Hypertrophie durch AvrBs3 spielen vermutlich Expansine eine Rolle. So wurde gezeigt, dass AvrBs3 die Expression von Paprikagenen induziert, deren Produkte Homologie zu α -Expansinen aufweisen (221). Ob auch AvrBs1 diese Gene induziert, könnte in weiterführenden Studien mittels RT-PCR-Ansätzen geklärt werden. Die „Riesenzellen“ sind Teil der so genannten „Futterstelle“ („feeding site“), welche durch *M. javanica* induziert wird und den Nematoden mit Nährstoffen versorgt (362). Es ist demnach denkbar, dass auch die durch AvrBs3 und AvrBs1 induzierte Zellvergrößerung eine verbesserte Nährstoffzufuhr für *Xcv* bewirkt. Im Unterschied zu den vergrößerten „Riesenzellen“, welche mehrere Zellkerne enthalten, induzieren die *Xcv*-Effektoren jedoch keine Zellkernteilung in den Mesophyllzellen.

4.2.3. AvrBs3 induziert stärkere Transkriptionsaktivitäten in den Nukleoli als AvrBs4

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ultrastruktur der Peroxisomen, Mitochondrien, des ER und des Golgi-Apparates mikroskopisch untersucht. Dabei wurden keine, durch AvrBs1, AvrBs3 oder AvrBs4 ausgelösten Veränderungen deren Struktur beobachtet. Die untersuchten Organellen scheinen demnach intakt zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Organellen in ihrer Funktion nicht gestört sind.

Auffällig war, dass die Zellkerne, im Besonderen die darin befindlichen Nukleoli, in Zellen, welche *avrBs3* exprimierten, vergrößert waren. Des Weiteren enthielten vor allem die Nukleoli der *avrBs3* exprimierenden Zellen so genannte nukleoläre Vakuolen. In den Nukleoli erfolgt die Synthese der rRNA-Moleküle für den Aufbau von Ribosomen. Eine Vergrößerung der Nukleoli und die Entstehung nukleolärer Vakuolen weisen auf eine erhöhte Transkription der rRNA-Gene hin (120, 168, 308). Dies lässt darauf schließen, dass in der Pflanzenzelle eine erhöhte Anzahl an Ribosomen notwendig ist. Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass in den Zellen eine verstärkte Translation erfolgt. Übereinstimmend damit wurde in früheren Studien gezeigt, dass AvrBs3 im Zellkern lokalisiert und die Transkription pflanzlicher Gene induziert (221, 325; S. Kay und U.

Bonas, unveröffentlichte Daten). Überraschenderweise führte die Expression von *GFP-avrBs3* in *N. benthamiana* zu GFP-fluoreszierenden Bereichen in den Nukleoli der Zellkerne (Abschnitt 3.2.1.). Interessanterweise ergaben Proteom-Analysen anderer Arbeitsgruppen sowie Sichtungen mit cDNA-Banken, welche zur Expression von *GFP*-Fusionen führten, eine Reihe unerwarteter im Nukleolus lokalisierter Proteine (308). Darunter waren auch Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang wurde der Nukleolus auch als „Parkplatz“ regulatorischer Proteine diskutiert (308). Diese Daten berücksichtigend, kann spekuliert werden, dass die Vergrößerung der Nukleoli teilweise auch durch eine Anhäufung des Effektorproteins AvrBs3 hervorgerufen wird. Dagegen spricht jedoch, dass die Nukleoli *avrBs4* exprimierender Zellen nicht vergrößert sind, obwohl auch *GFP-avrBs4* in den Nukleoli detektiert wurde. Für AvrBs1 wurde weder eine Kernlokalisierung vorhergesagt noch wurden GFP-Fusionsproteine dieses Effektors im Zellkern nachgewiesen (R. Szczesny und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). AvrBs1 könnte aber auch indirekt Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie der Pflanze nehmen, indem es pflanzliche Transkriptionsregulatoren modifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen lassen jedoch nicht auf eine durch AvrBs1 verursachte, erhöhte Transkriptionsaktivität schließen. Diese Resultate deuten darauf hin, dass AvrBs1 andere molekulare Mechanismen nutzt als AvrBs3, um eine Hypertrophie zu induzieren.

Interessanterweise, wurden in Zellen, die das hoch-homologe *avrBs4* exprimierten, keine vergrößerten Nukleoli und kaum nukleoläre Vakuolen beobachtet, obwohl AvrBs4 einige der durch AvrBs3 induzierten Gene ebenfalls aktiviert (221). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass AvrBs4 die Genexpression weniger stark beeinflusst als AvrBs3.

4.2.4. Ein erhöhter Austritt von Ionen aus Wirtszellen erfolgt nicht nur während der HR

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass AvrBs1 und AvrBs3, die beide eine Hypertrophie induzieren, auch eine Erhöhung des Ionenaustritts bewirken, wie er normalerweise bei einer HR in inkompatiblen Interaktionen gemessen wird (233). Im Falle von AvrBs1 wurden tatsächlich mikroskopisch und makroskopisch Zelltodreaktionen in *N. benthamiana* beobachtet. Dies deutet an, dass der Ionenaustritt nach Expression von *avrBs1* durch das Absterben einzelner Mesophyllzellen, ähnlich wie bei einer HR, ausgelöst wird. AvrBs3 löst jedoch einen ähnlich veränderten Ionenaustritt wie AvrBs1

aus, obwohl kaum nekrotische Reaktionen bei Expression von *avrBs3* beobachtet wurden. Eine Erhöhung des Ionenaustritts könnte demnach nicht nur das Resultat der Induktion einer HR in inkompatiblen Interaktionen, sondern auch eine Virulenzaktivität von T3-Effektoren sein, jedoch unabhängig von der Hypertrophie. Damit übereinstimmend wurde gezeigt, dass ein pflanzliches Protein, dessen Synthese von AvrBs3 induziert wird, für die Hypertrophie der Mesophyllzellen verantwortlich ist, aber keinen verstärkten Ionenaustritt bewirkt (S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Vorstellbar ist, dass die von der Pflanze freigesetzten Ionen direkt vom Pathogen für Aufbauprozesse genutzt werden. AvrBs4 induziert keinen verstärkten Ionenaustritt.

Es ist bemerkenswert, dass AvrBs4, welches eine hohe Ähnlichkeit zu AvrBs3 aufweist, weder eine starke Chlorose, noch eine stark ausgeprägte Hypertrophie, noch einen erhöhten Ionenaustritt oder eine mikroskopisch sichtbar erhöhte Translationsaktivität induziert, dafür aber vermutlich eine erhöhte Katalaseproduktion.

Die beobachteten, spezifisch von AvrBs1, AvrBs3 bzw. AvrBs4 induzierten Veränderungen in *N. benthamiana* sind hilfreich für weitere Analysen zur molekularen Funktion der Effektorproteine. Für jeden dieser Effektoren wurden bereits putative Interaktoren mittels Hefe-Di-Hybrid-Ansatz identifiziert (B. Szurek, D. Gürlebeck, J. Piprek, R. Szczesny, T. Lahaye, U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Für AvrBs3 wurde außerdem eine Vielzahl an induzierten Genen isoliert (221; E. Marois, S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Um die Relevanz der Interaktoren und induzierten Gene für die Pathogen-Wirt-Interaktion zu untersuchen, erfolgen vor allem „Silencing“- und Überexpressionsstudien. Bisher wurde dabei analysiert, ob die verminderte oder erhöhte Expression des untersuchten Gens einen Einfluss auf die Genotyp-spezifische HR hat. Für AvrBs3 konnten außerdem Veränderungen der Hypertrophie untersucht werden. In zukünftigen Studien könnte das Methodenspektrum erweitert werden und nun auch mikroskopische Analysen und Messungen des Ionenaustritts erfolgen. Es könnte außerdem überprüft werden, ob Interaktoren von AvrBs4 einen Einfluss auf den Katalasegehalt der Peroxisomen haben.

Die durchgeführten Arbeiten geben weitere Einblicke in die Funktionsweise von AvrBs3 aus *Xcv*. Abbildung 55 zeigt ein abschließendes Modell, in welchem bereits bekannte Daten und neue Resultate zusammengefasst dargestellt sind. In weiterführenden Arbeiten ist es nun interessant, (i) wie AvrBs3 von HpaB dissoziiert und durch den T3-Pilus gelangt,

(ii) ob AvrBs3 tatsächlich durch Bindung an LeThiC dessen Aktivität hemmt, (iii) ob AvrBs3 als Homodimer oder als Heterodimer mit LeML1 im pflanzlichen Zellkern agiert und (iv) welche Rolle weitere AvrBs3-Interaktoren spielen. Letztlich induziert AvrBs3 bestimmte pflanzliche Gene. Eines dieser kürzlich isolierten Gene (*upa20*) ist für die Induktion der Hypertrophie verantwortlich (S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Es kann nun mikroskopisch untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen spezifisch durch Upa20 ausgelöst werden. Außerdem ist es interessant zu prüfen, ob *upa20* auch von AvrBs1 und AvrBs4 induziert wird.

Von besonderem Interesse ist vor allem die Identifizierung der AvrBs3-responsiven DNA-Bereiche. Dabei sollte getestet werden, ob AvrBs3 allein oder in einem größeren Proteinkomplex, z.B. an Aip8 (LeML1) gebunden, an die Promotorelemente bindet. Für AvrXa7 aus *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) wurde beispielsweise gezeigt, dass es direkt an DNA binden kann (366). Bisher wurde jedoch kein spezifisches DNA-Motiv identifiziert. Sowohl in Reis als auch in Paprika wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, welche durch AvrBs3-Familienmitglieder (auch als TAL („transcription activator-like“ bezeichnet; (364)) induziert werden (221, 364; E. Marois, S. Kay und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die Isolierung der Promotoren dieser Gene und DNA-Protein-Interaktionsstudien mittels Hefe-Mono-Hybrid-Ansatz und „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) könnten ein spezifische DNA-Sequenz identifizieren, an welche AvrBs3 oder andere TAL-Effektoren binden.

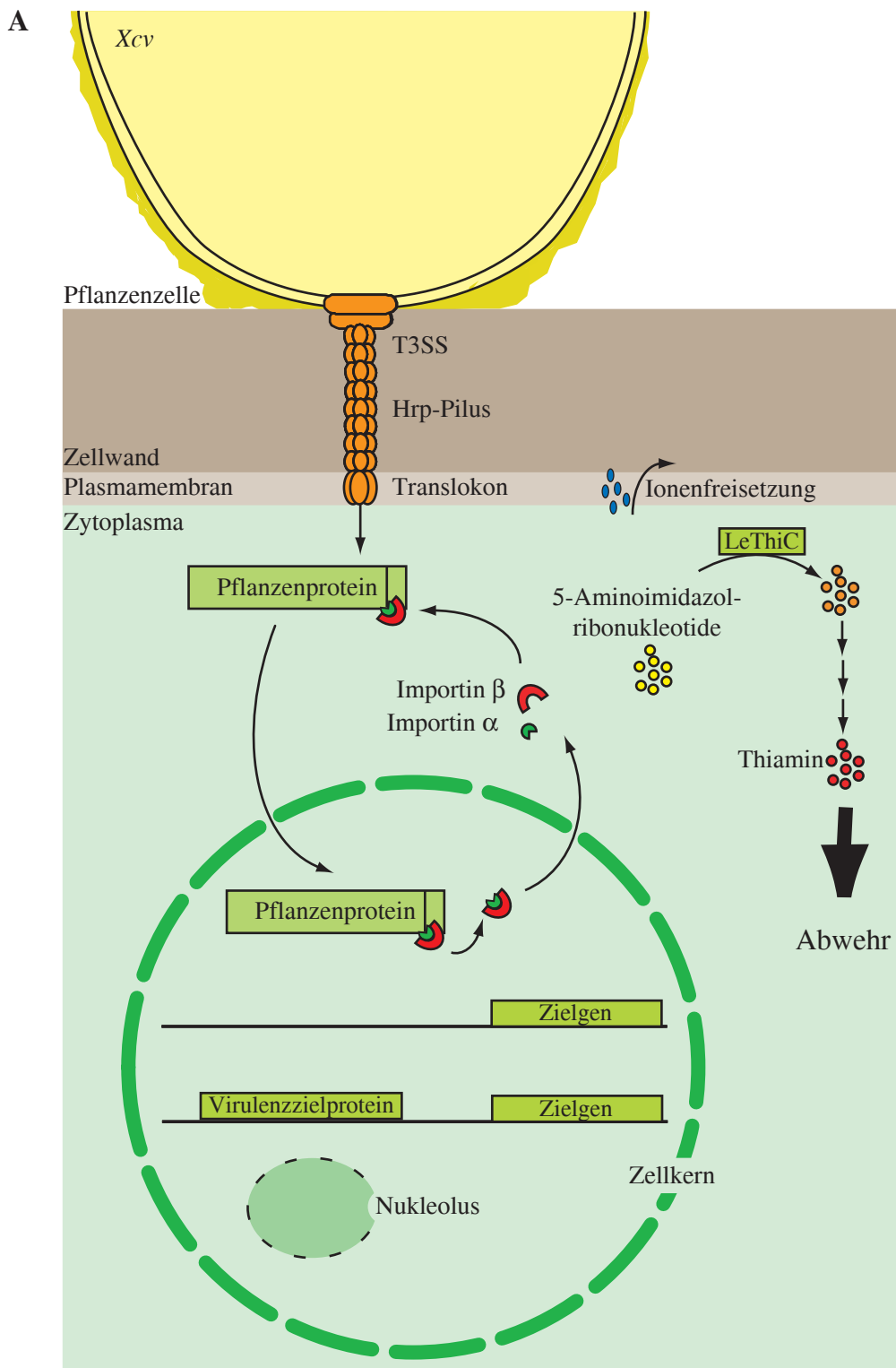
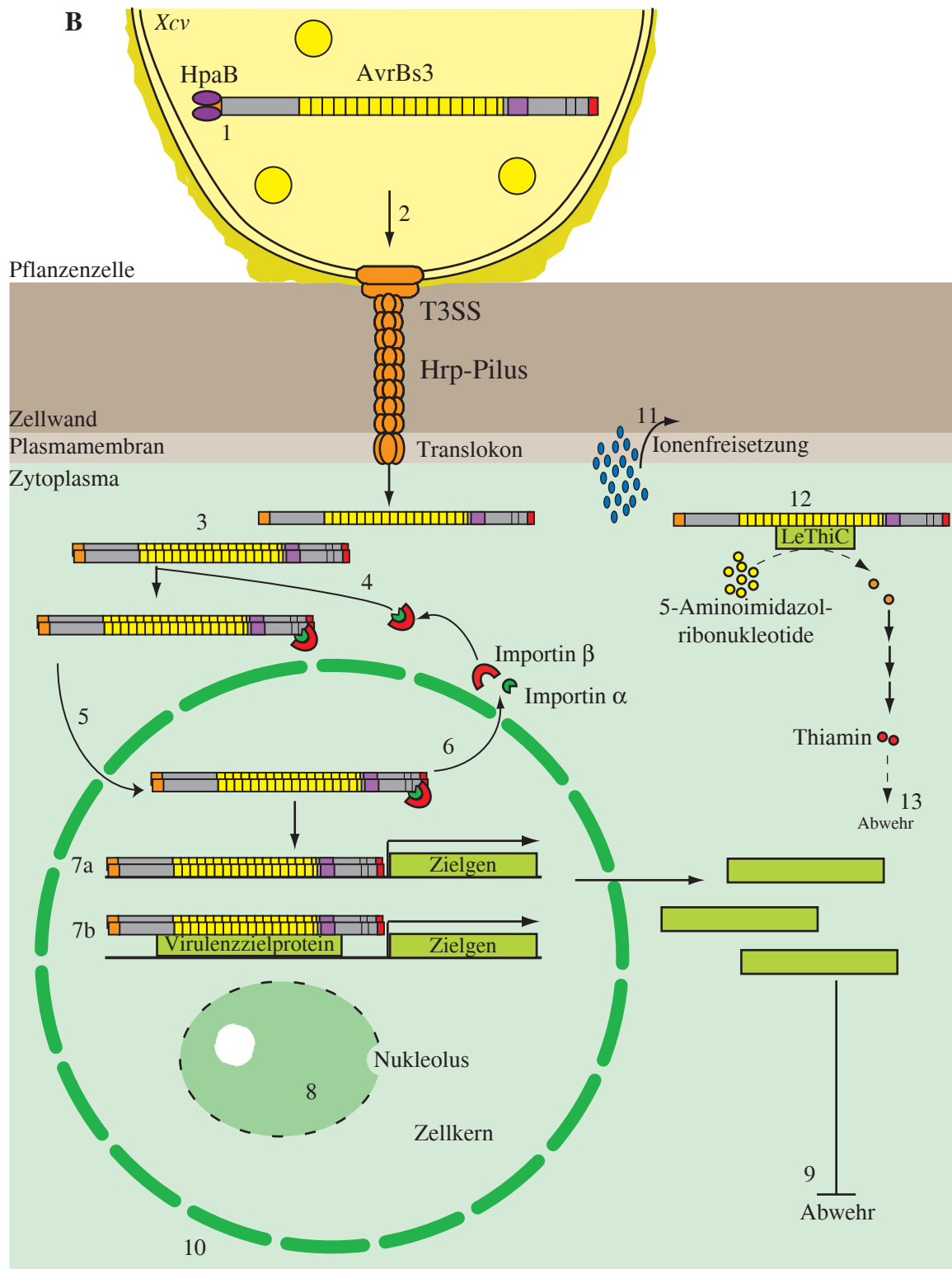


Abbildung 55: Aktuelles Modell zur Wirkungsweise von AvrBs3 aus *Xcv*. (A) zeigt die mögliche Situation nach Befall einer Pflanze mit *Xcv* ohne AvrBs3. (B) zeigt die molekulare Wirkungsweise von AvrBs3 und mögliche, durch AvrBs3 ausgelöste Veränderungen in der Pflanzenzelle: HpaB unterstützt vermutlich die Translokation von AvrBs3 durch Bindung an die N-terminalen 50 Aminosäuren des Effektors im Zytoplasma von *Xcv* (1-2). Im Zytoplasma der Wirtszelle dimerisiert AvrBs3 (3) und Importin α , gebunden an Importin β , bindet an die NLS des Effektors (4), wodurch der Kernimport von AvrBs3 vermittelt wird (5). Im Zellkern dissoziieren Importin α und β und werden in das Zytoplasma entlassen (6).



AvrBs3 agiert als Transkriptionsaktivator (7). Dafür könnte *AvrBs3* direkt an Promotoren vor Virulenzzielgenen (7a) oder im Komplex mit einem gebundenen Virulenzzielprotein (z.B. LeML1, 7b) binden. Die resultierende erhöhte Genexpression in den Zellen führt zur verstärkten rRNA-Synthese und dadurch zur Vergrößerung der Nucleoli und zur Entstehung nucleolärer Vakuolen (8). Die Genprodukte könnten eine Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr (9), die Vergrößerung der Pflanzenzelle (10) und den verstärkten Ionenaustritt (11) bewirken. Ein Teil der *AvrBs3*-Moleküle könnte vor dem Kernimport mit LeThiC interagieren (12) und dadurch die Vitamin B1-Synthese inhibieren. Dies könnte zusätzlich zu einer verminderten Abwehr der Pflanze führen (13).