

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE
ARBEITSGRUPPE PFLANZENMETABOLISMUS

Funktionelle Charakterisierung des *Xanthomonas* Typ-III Effektorproteins XopS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Molekulare Pflanzenphysiologie"

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Margot Raffener

Potsdam, 30. September 2021

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.
Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Betreuer und 1. Gutachter: Prof. Dr. Frederik Börnke (Universität Potsdam)
Gutachter: PD Dr. Marcel Wiermer (Georg-August-Universität Göttingen)
apl. Prof. Dr. Jörg Fettke (Universität Potsdam)

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-52553>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-525532>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	VI
Summary	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Das pflanzliche Immunsystem.....	1
1.1.1. Die induzierte basale Abwehr	2
1.1.1.1. Die Erkennung mikrobieller molekularer Muster durch PRRs.....	3
1.1.1.2. Präinvasive Immunität	4
1.1.1.3. Postinvasive Immunität.....	6
1.1.2. Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien.....	8
1.1.2.1. Phytotoxine	8
1.1.2.2. Das Typ-III Sekretionssystem und seine Effektoren	9
1.1.3. Die Effektor-vermittelte Abwehr	14
1.1.4. Gemeinsamkeiten der PTI-und ETI-Antwort.....	15
1.2. Die Rolle von Phytohormonen in der pflanzlichen Immunantwort.....	16
1.2.1. Salicylsäure und ihre Rolle in der pflanzlichen Immunantwort.....	16
1.2.2. Jasmonsäure und ihre Rolle in der pflanzlichen Immunantwort.....	18
1.2.3. Hormonelle Wechselwirkungen während der pflanzlichen Immunantwort	20
1.3. WRKY Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Immunantwort.....	22
1.4. Ubiquitinierung und das Ubiquitin-26S Proteasom System (UPS).....	23
1.5. Das Phytopathogen <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	26
1.6. Vorarbeiten	27
1.6.1. Identifikation potentieller XopS Zielproteine	27
1.6.2. XopS beeinflusst den proteasomalen Abbau von WRKY40	29
1.7. Zielsetzung der Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Material	31
2.1.1. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme	31
2.1.2. Oligonukleotide und DNA-Sequenzierung	31
2.1.3. Vektoren und Plasmide	31
2.1.4. Antikörper	31
2.1.5. Nährmedien	32

2.1.6.	Antibiotika.....	33
2.1.7.	Bakterien-und Hefestämme.....	34
2.1.8.	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	34
2.2.	Methoden	36
2.2.1.	Pflanzentransformation	36
2.2.1.1.	Stabile Transformation von Arabidopsis	36
2.2.1.2.	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i>	37
2.2.1.3.	Virus-induzierte Genstilllegung (VIGS) in Paprika und <i>N. benthamiana</i> ..	37
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	38
2.2.2.1.	Anzucht und Transformation von Bakterien.....	38
2.2.2.2.	Anzucht und Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.3.	Hefe Transaktivierungs-Assay	39
2.2.2.4.	Infektion von Pflanzen mit <i>Xcv</i> und <i>PstΔhrcC</i>	40
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1.	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	41
2.2.3.2.	Klonierungsstrategien	42
2.2.3.3.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial.....	42
2.2.3.4.	DNase Verdau und reverse Transkription der RNA.....	42
2.2.3.5.	Semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	43
2.2.3.6.	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR).....	44
2.2.4.	Biochemische und physiologische Methoden.....	45
2.2.4.1.	Induktion und Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine aus <i>E. coli</i>	45
2.2.4.2.	<i>In vitro</i> Ubiquitinierungs-Assay.....	47
2.2.4.3.	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	48
2.2.4.4.	Ko-Immunopräzipitation von Proteinen über <i>GFP-Trap</i> [®]	48
2.2.4.5.	Immunopräzipitation-Massenspektrometrie (IP-MS).....	48
2.2.4.6.	Proteingelelektrophorese und Western Blot Analyse	49
2.2.4.7.	Elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Analyse (EMSA).....	50
2.2.4.8.	Bakterienwachstums-Analysen in infiziertem Pflanzengewebe.....	51
2.2.4.9.	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	51
2.2.4.10.	Messung der Ionen-Leckage.....	52
2.2.4.11.	Messung der Phytohormongehalte in Arabidopsis und Paprika.....	52
2.2.4.12.	Vermessung der Stomata Öffnungen.....	53
2.2.4.13.	<i>In planta</i> GUS Aktivitäts-Assay	54

2.2.5. Statistische Analysen und Darstellung der Daten	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Das Typ-III Effektorprotein XopS	56
3.1.1. XopS interferiert mit PTI-Antworten in Arabidopsis	56
3.1.2. Die ektopische Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg des JA-Gehalts in Arabidopsis	58
3.1.3. Untersuchung der Virulenzfunktion von XopS während einer kompatiblen Interaktion zwischen <i>Xcv</i> und seiner Wirtspflanze Paprika	61
3.1.3.1. XopS trägt zur bakteriellen Vermehrung von <i>Xcv</i> in Paprika bei.....	63
3.1.3.2. XopS beeinflusst die Schließung der Stomata während der präinvasiven Immunantwort.....	65
3.1.3.3. XopS ist ein wichtiger Virulenzfaktor in der kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion während der präinvasiven Immunantwort	68
3.1.4. XopS beeinflusst die Expression Phytohormon-abhängiger Abwehrgene und stört möglicherweise das phytohormonelle Gleichgewicht	69
3.1.5. XopS interagiert in Hefe mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40 aus verschiedenen Pflanzenspezies	71
3.1.6. Biochemische Analyse des <i>Xcv</i> Typ-III Effektors XopS	73
3.1.6.1. XopS stabilisiert den Transkriptionsfaktor <i>NbWRKY40</i> während einer transienten Ko-Expression in <i>N. benthamiana</i>	74
3.1.6.2. Etablierung eines <i>in vitro</i> Ubiquitinierungs-Assays.....	75
3.1.6.3. XopS besitzt <i>in vitro</i> unter getesteten Bedingungen keine E3 Ligase Aktivität	78
3.2. WRKY40 und seine Rolle in der kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion	80
3.2.1. Eine Infektion mit <i>Xcv</i> induziert die Transkription von <i>CaWRKY40a</i> in suszeptiblen Paprika Pflanzen.....	80
3.2.2. <i>CaWRKY40a</i> ist an der Abwehr von <i>Xcv</i> während einer kompatiblen <i>Xcv</i> - Paprika Interaktion beteiligt.....	81
3.2.3. Die Genstilllegung von <i>CaWRKY40a</i> beeinflusst die Symptomentwicklung während einer kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion	84
3.2.4. Die Genstilllegung von <i>CaWRKY40a</i> fördert die Akkumulation von SA während einer kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion.....	85
3.2.5. WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assoziierten Genexpression....	87

3.2.5.1.	Die mit XopS interagierenden WRKY40 TFs besitzen keine Transaktivierungs-Aktivität in Hefe	87
3.2.5.2.	WRKY40 besitzt eine Repressoraktivität <i>in planta</i>	88
3.2.5.3.	<i>CaWRKY40a</i> beeinflusst die Expression Abwehr-assoziiierter Gene während einer kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion.....	90
3.2.5.4.	<i>CaWRKY40a</i> bindet an Promotorregionen potentieller Zielgene.....	92
3.2.5.5.	WRKY40 reprimiert die vom <i>CaPR4</i> Promotor kontrollierte Genexpression <i>in planta</i>	94
3.2.6.	Das Typ-III Effektorprotein XopS interferiert mit der stomatären Immunität in Abhängigkeit von WRKY40.....	96
3.3.	Identifikation weiterer <i>in planta</i> Interaktionspartner von XopS und WRKY40....	99
3.3.1.	IP-MS Analyse zur Identifikation potentieller <i>in planta</i> Interaktionspartner	99
3.3.2.	<i>NtUBP12</i> interagiert <i>in planta</i> direkt mit XopS und <i>NbWRKY40</i>	101
3.3.3.	Eine transiente Expression von XopS und <i>NbWRKY40</i> führt zur Akkumulation von <i>NtUBP12</i>	103
3.3.4.	Die Genstilllegung von <i>NbUBP12</i> führt zur Stabilisierung seines Interaktionspartners <i>NbWRKY40</i>	104
3.3.5.	UBP12 beeinflusst pflanzliche Immunantworten während einer kompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion	106
3.3.6.	Bestätigung der biochemischen Funktion von <i>NtUBP12</i>	109
3.4.	Identifikation post-translationaler Modifikationen von XopS und <i>NbWRKY40</i>	110
3.4.1.	Identifikation von Phosphorylierungsstellen an XopS.....	110
3.4.2.	Identifikation post-translationaler Modifikationen an <i>NbWRKY40</i>	112
4.	Diskussion	115
4.1.	Das <i>Xanthomonas</i> Typ-III Effektorprotein XopS.....	115
4.1.1.	Die Virulenzfunktion des Typ-III Effektors XopS	116
4.1.2.	XopS beeinträchtigt die SA-abhängige Genexpression zugunsten von JA-vermittelten Immunantworten	121
4.1.3.	XopS interagiert mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40	127
4.1.4.	Untersuchungen zur biochemischen Funktion von XopS	129
4.2.	Die Rolle des WRKY40 TFs in der kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion	135
4.2.1.	Die Virus-induzierte Genstilllegung von <i>CaWRKY40a</i> fördert die Abwehr von <i>Xcv</i> in Paprika.....	136
4.2.2.	WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assoziierten Genexpression..	138

4.2.3. Der WRKY40 TF vermittelt die XopS-abhängige Manipulation der stomatären Immunantwort und beeinflusst dabei möglicherweise Phytohormon-Signalnetzwerke	143
4.3. Die Deubiquitinase UBP12 als <i>in planta</i> Interaktionspartner von XopS und WRKY40.	146
4.3.1. UBP12 interagiert <i>in planta</i> sowohl mit XopS als auch mit dem WRKY40 TF	147
4.3.2. UBP12 beeinflusst die kompatible <i>Xcv</i> -Wirtsinteraktion	148
4.3.3. Die Genstilllegung von <i>UBP12</i> beeinflusst die Stabilität des WRKY40 TFs .	149
4.4. Ein Modell zur Darstellung der XopS-vermittelten Virulenz von <i>Xcv</i>	151
5. Literaturverzeichnis.....	153
6. Anhang	174
6.1. Abbildungsverzeichnis.....	179
6.2. Tabellenverzeichnis	181
7. Abkürzungsverzeichnis.....	182
8. Eidesstattliche Erklärung	184
9. Danksagung.....	185

Zusammenfassung

Angepasste Pathogene besitzen eine Reihe von Virulenzmechanismen, um pflanzliche Immunantworten unterhalb eines Schwellenwerts der effektiven Resistenz zu unterdrücken. Dadurch sind sie in der Lage sich zu vermehren und Krankheiten auf einem bestimmten Wirt zu verursachen. Eine essentielle Virulenzstrategie Gram-negativer Bakterien ist die Translokation von sogenannten Typ-III Effektorproteinen (T3Es) direkt in die Wirtszelle. Dort stören diese die Immunantwort des Wirts oder fördern die Etablierung einer für das Pathogen günstigen Umgebung. Eine kritische Komponente der Pflanzenimmunität gegen eindringende Pathogene ist die schnelle transkriptionelle Umprogrammierung der angegriffenen Zelle. Viele adaptierte bakterielle Pflanzenpathogene verwenden T3Es, um die Induktion Abwehr-assoziiierter Gene zu stören. Die Aufklärung von Effektor-Funktionen, sowie die Identifikation ihrer pflanzlichen Zielproteine sind für das Verständnis der bakteriellen Pathogenese essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Typ-III Effektorprotein XopS aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) funktionell charakterisiert werden. Zudem lag hier ein besonderer Fokus auf der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen XopS und seinem in Vorarbeiten identifizierten pflanzlichen Interaktionspartner WRKY40, einem transkriptionellen Regulator der Abwehr-assoziierten Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass XopS ein essentieller Virulenzfaktor des Phytopathogens *Xcv* während der präinvasiven Immunantwort ist. So zeigten *xopS*-defiziente *Xcv* Bakterien bei einer Inokulation der Blattoberfläche susceptibler Paprika Pflanzen eine deutlich reduzierte Virulenz im Vergleich zum *Xcv* Wildtyp. Die Translokation von XopS durch *Xcv*, sowie die ektopische Expression von XopS in *Arabidopsis* oder *N. benthamiana* verhinderte das Schließen von Stomata als Reaktion auf Bakterien bzw. einem Pathogen-assoziierten Stimulus, wobei zudem gezeigt werden konnte, dass dies in einer WRKY40-abhängigen Weise geschieht. Weiter konnte gezeigt werden, dass XopS in der Lage ist, die Expression Abwehr-assoziiierter Gene zu manipulieren. Dies deutet darauf hin, dass XopS sowohl in die prä-als auch in die postinvasive, apoplastische Abwehr eingreift. Phytohormon-Signalnetzwerke spielen während des Aufbaus einer effizienten pflanzlichen Immunantwort eine wichtige Rolle. Hier konnte gezeigt werden, dass XopS mit genau diesen Signalnetzwerken zu interferieren scheint. Eine ektopische Expression des Effektors in *Arabidopsis* führte beispielsweise zu einer signifikanten Induktion des Phytohormons Jasmonsäure (JA), während eine Infektion von susceptiblen Paprika Pflanzen mit einem *xopS*-defizienten *Xcv* Stamm zu einer ebenfalls signifikanten Akkumulation des Salicylsäure (SA)-Gehalts führte.

So kann zu diesem Zeitpunkt vermutet werden, dass XopS die Virulenz von *Xcv* fördert, indem JA-abhängige Signalwege induziert werden und es gleichzeitig zur Unterdrückung SA-abhängiger Signalwege kommt. Die Virus-induzierte Genstilllegung des XopS Interaktionspartners *WRKY40a* in Paprika erhöhte die Toleranz der Pflanze gegenüber einer *Xcv* Infektion, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Protein um einen transkriptionellen Repressor pflanzlicher Immunantworten handelt. Die Hypothese, dass WRKY40 die Abwehr-assoziierte Genexpression reprimiert, konnte hier über verschiedene experimentelle Ansätze bekräftigt werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression von verschiedenen Abwehrgenen einschließlich des SA-abhängigen Gens *PRI* und die des Negativregulators des JA-Signalwegs *JAZ8* von WRKY40 gehemmt wird. Um bei einem Pathogenangriff die Abwehr-assoziierte Genexpression zu gewährleisten, muss WRKY40 als Negativregulator abgebaut werden. Vorarbeiten zeigten, dass WRKY40 über das 26S Proteasom abgebaut wird. In der hier vorliegenden Studie konnte weiter bestätigt, dass der T3E XopS zu einer Stabilisierung des WRKY40 Proteins führt, indem er auf bislang ungeklärte Weise dessen Abbau über das 26S Proteasom verhindert. Die Ergebnisse aus der hier vorliegenden Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die Stabilisierung des Negativregulators der Immunantwort WRKY40 seitens XopS dazu führt, dass eine darüber vermittelte Manipulation der Abwehr-assoziierten Genexpression, sowie eine Umsteuerung phytohormoneller Wechselwirkungen die Ausbreitung von *Xcv* auf suszeptiblen Paprikapflanzen fördert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, weitere potentielle *in planta* Interaktionspartner von XopS zu identifizieren die für seine Interaktion mit WRKY40 bzw. für die Aufschlüsselung seines Wirkmechanismus relevant sein könnten. So konnte die Deubiquitinase UBP12 als weiterer pflanzlicher Interaktionspartner sowohl von XopS als auch von WRKY40 gefunden werden. Dieses Enzym ist in der Lage, die Ubiquitinierung von Substratproteinen zu modifizieren und seine Funktion könnte somit ein Bindeglied zwischen XopS und dessen Interferenz mit dem proteasomalen Abbau von WRKY40 sein. Während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion führte die Virus-induzierte Genstilllegung von *UBP12* zu einer reduzierten Resistenz der Pflanze gegenüber des Pathogens *Xcv*, was auf dessen positiv-regulatorische Wirkung während der Immunantwort hindeutet. Zudem zeigten Western Blot Analysen, dass das Protein WRKY40 bei einer Herunterregulierung von *UBP12* akkumuliert und dass diese Akkumulation von der Anwesenheit des T3Es XopS zusätzlich verstärkt wird. Weiterführende Analysen zur biochemischen Charakterisierung der XopS/WRKY40/UBP12 Interaktion sollten in Zukunft durchgeführt werden, um den genauen Wirkmechanismus des XopS T3Es weiter aufzuschlüsseln.

Summary

Adapted pathogens have acquired a number of virulence mechanisms to suppress plant immune responses below a threshold of effective resistance and are thus able to replicate and cause disease on a given host. Virulence mechanisms include the translocation of so-called type-III effector proteins (T3Es) directly into the host cell, where they disrupt immune responses or assist the pathogen to establish a beneficial environment. A critical component of plant immunity against invading pathogens is rapid transcriptional reprogramming of the targeted cell to minimize virulence. Many adapted bacterial plant pathogens use T3Es to interfere with the induction of defense-associated genes. Due to the fact that for most of the T3Es studied to date their target proteins in the host are unknown, it is often unclear by which mechanisms these defense responses are disrupted. Thus, the elucidation of effector functions, as well as the identification of their plant target proteins, are necessary for the understanding of bacterial pathogenesis. In this work, the type-III effector protein XopS from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) was functionally characterized. In addition, a particular focus of this characterization was to investigate the interaction between XopS and its plant interaction partner WRKY40, a transcriptional regulator of defense-associated gene expression, identified in preliminary work. XopS was shown to be an essential virulence factor of the phytopathogen *Xcv* during the preinvasive immune response. Thus, *xopS*-deficient *Xcv* bacteria showed significantly reduced virulence when inoculated on the leaf surface of susceptible pepper plants compared to *Xcv* wild type. Translocation of XopS by *Xcv*, as well as ectopic expression of XopS in *Arabidopsis* or *N. benthamiana*, prevented stomatal closure in response to bacteria or a pathogen-associated stimulus, respectively, and it was further shown that this occurs in a WRKY40-dependent manner. Additionally, XopS was shown to be able to manipulate the expression of defense-associated genes. This suggests that XopS interferes with both preinvasive and postinvasive apoplastic defense mechanisms. Phytohormone signaling networks play an important role during the establishment of an efficient plant immune response. Here, it was shown that XopS appears to interfere with these signaling networks. For example, ectopic expression of the effector in *Arabidopsis* led to a significant induction of the phytohormone jasmonic acid (JA), while infection of susceptible pepper plants with a *xopS*-deficient *Xcv* strain resulted in an equally significant accumulation of the salicylic acid (SA) content. Thus, at this stage it can be speculated that XopS promotes the virulence of *Xcv* by inducing JA-dependent signaling pathways and simultaneously suppressing SA signaling pathways via it.

In this work, it was confirmed that XopS interacts not only with WRKY40 from *N. benthamiana* but also with its orthologous proteins from Arabidopsis (*AtWRKY40*) and pepper (*CaWRKY40a*). Virus-induced gene silencing of *WRKY40a* in bell pepper increased plant tolerance to *Xcv* infection, suggesting that this protein is a transcriptional regulator that suppresses induction of plant immune responses. The hypothesis that WRKY40 is a transcriptional repressor of defense-associated gene expression was corroborated here via several experimental approaches. For example, the expression of several defense genes including the SA-dependent gene *PR1* and that of the negative regulator of the JA pathway *JAZ8* was shown to be inhibited by WRKY40. To ensure defense-associated gene expression during pathogen attack, WRKY40 as a negative regulator must be removed to allow expression of defense genes. Preliminary work showed that WRKY40 is degraded via the 26S proteasome. The present study further confirmed that the T3E XopS leads to stabilization of WRKY40 protein by preventing its proteasomal degradation in a yet unexplained manner. The results from the work presented here suggest that stabilization of the negative regulator of immune responses WRKY40 by XopS leads to the manipulation of defense-associated gene expression, as well as a redirection of phytohormonal interactions, which in turn promotes the spread of *Xcv* on susceptible pepper plants. Another goal of this work was to identify other potential *in planta* interaction partners of XopS that might be relevant for its interaction with WRKY40 or for the deciphering of its mechanism of action. This identified the deubiquitinase UBP12 as another plant interaction partner of both XopS and WRKY40. UBP12 is able to modify the ubiquitination of substrate proteins and its function could thus represent a link between XopS and its interference with the proteasomal degradation of WRKY40. During a compatible *Xcv*-host interaction, virus-induced gene silencing of *UBP12* resulted in reduced plant resistance to the pathogen *Xcv*, suggesting its positive regulatory effect during the immune response. Moreover, Western blot analyses showed that the protein WRKY40 accumulates upon down-regulation of *UBP12* and that this accumulation is further enhanced by the presence of the T3E XopS. Further analysis on the biochemical characterization of the XopS/WRKY40/UBP12 interaction should be performed in the future to further elucidate the exact mode of action of the XopS T3E.

1. Einleitung

Mithilfe der Photosynthese sind Pflanzen in der Lage aus anorganischen Vorläufermolekülen Kohlenhydrate herzustellen, die entweder direkt oder indirekt eine Energiequelle für heterotrophe Lebewesen darstellen. Aufgrund ihrer autotrophen Lebensweise gelten Pflanzen als Primärproduzenten und stehen somit weit oben in der Nahrungskette.

Pflanzenkrankheiten führen zu großen Ernteverlusten in der Landwirtschaft und stellen einen Hauptfaktor für die Limitierung des Ertragspotentials von Nutzpflanzen dar. Angesichts einer immer weiter ansteigenden Bevölkerungszahl und dem damit einhergehenden wachsenden Bedarf an Nahrungsmitteln, ist die Erforschung von Pflanzenkrankheiten und einer daraus resultierenden Strategieentwicklung zu deren Eindämmung unbedingt notwendig, um die Ertragssicherheit in der Landwirtschaft zu verbessern.

Pflanzen sind sessile Organismen und demnach nicht in der Lage den sie umgebenden, teils ungünstigen Umweltbedingungen zu entfliehen. So sind sie im Laufe ihres Lebenszyklus einer Vielzahl an Stressoren, sowohl abiotischer als auch biotischer Natur, ausgesetzt. Zu den abiotischen Stressfaktoren zählen beispielsweise Hitze, Kälte oder Trockenheit, während man einen Pathogenbefall wie z.B. durch Bakterien, Pilze oder Oomyceten als biotischen Stress bezeichnet.

Im Laufe der Koevolution zwischen Pflanzen und potentiellen pathogenen Mikroorganismen haben Pflanzen ein effektives, mehrschichtiges Immunsystem entwickelt, welches sie vor einem Befall durch nicht-adaptierte Pathogene schützt.

1.1. Das pflanzliche Immunsystem

Während höhere Vertebraten im Kampf gegen Invasoren sowohl auf ein angeborenes Immunsystem, als auch auf ein, aus spezialisierten Immunzellen und Antikörpern bestehendes, adaptives Immunsystem zurückgreifen können, verfügen Pflanzen lediglich über Ersteres.

Aufgabe des Immunsystems ist es einen Überwachungsapparat zu bilden, welcher es Organismen ermöglicht, vom Feind, aber auch vom eigenen Organismus ausgesendete Gefahrensignale zu erkennen und daraufhin entsprechende Abwehrmaßnahmen einzuleiten, um letztendlich Krankheiten zu verhindern (Gust *et al.*, 2017).

Dabei weist das angeborene Immunsystem von Pflanzen und Vertebraten einige Parallelen auf, wobei jenes der Pflanzen umfangreicher ist, um das Fehlen eines adaptiven Immunsystems auszugleichen (Nürnberger *et al.*, 2004).

Grundsätzlich kann angenommen werden, dass die meisten Pflanzen resistent gegenüber den meisten potentiellen mikrobiellen Invasoren sind, eine Tatsache, die auf die Vielschichtigkeit der Abwehrmechanismen zurückzuführen ist. Eine erste effektive Barriere, der Mikroorganismen beim Versuch eine Pflanze zu kolonisieren begegnen, ist die konstitutive, präformierte Abwehr. Zur präformierten Abwehr, die den Zugang zum Pflanzengewebe erschweren soll, gehören physikalische Barrieren wie Dornen, Trichome, die auf der Epidermis liegende Wachsschicht (Kutikula) u.a., aber auch die Produktion von toxischen Sekundärmetaboliten, Phytoanticipine genannt, wie z.B. Saponine oder Glukosinolate (Gill *et al.*, 2015; Piasecka *et al.*, 2015).

Trotz konstitutiver Barrieren stellt die pflanzliche Phyllosphäre, bestehend aus der Blattoberfläche sowie den Mesophyllzellen, einigen vaskulären Geweben und dem Apoplasten im Blattinneren, einen günstigen Lebensraum für eine Vielzahl an Mikroben dar (Lindow & Brandl, 2003). Epiphytische Mikroben besiedeln ausschließlich die Blattoberfläche und sind dabei nicht in der Lage bis in den Apoplasten im Blattinneren vorzudringen, ganz im Gegensatz zu endophytischen Mikroben, die zumindest einen Teil ihres Lebenszyklus im Inneren des Pflanzengewebes vollziehen. Dazu gehören beispielsweise der parasitäre Pilz *Cladosporium fulvum* oder auch die phytopathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris* (Mendgen *et al.*, 1996; Melotto *et al.*, 2008). Beim Vorherrschen günstiger Bedingungen wie Starkregen, hoher Luftfeuchtigkeit und milder Temperaturen, können phytopathogene Bakterien das Blattinnere über natürliche Öffnungen wie Hydatoden, Stomata, Nektarthoden oder Lentizellen, oder aber über Verwundungsstellen erreichen und sich dort vermehren. Um eine aggressive Kolonisation nach dem Durchbrechen der konstitutiven Barrieren und die daraus resultierende Krankheitsentwicklung zu verhindern, haben Pflanzen eine zweite, induzierbare Stufe der Abwehr ausgebildet.

1.1.1. Die induzierte basale Abwehr

Die Aktivierung dieser Abwehrstufe basiert auf der Erkennung spezifischer molekularer Muster, welche entweder Pathogen- oder Mikroben-assoziiert (PAMPs/MAMPs; von *Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns*), oder aber Verwundungs-assoziiert (DAMPs; von *Damage Associated Molecular Patterns*) sein können.

Bei PAMPs/MAMPs handelt es sich um mikrobielle Strukturen oder Moleküle mit essentiellen Funktionen, die dementsprechend unter pathogenen und nicht-pathogenen Mikroben hochkonserviert sind, wobei sie im Wirt allerdings nicht vorkommen (Newman *et al.*, 2013).

Wichtige Beispiele hierfür sind das bakterielle Flagellin, der Elongationsfaktor TU (EF-Tu), Peptidoglycan oder Lipopolysaccharide, sowie Chitin oder β -Glucan aus Pilzen (Darvill & Albersheim, 1984; Felix *et al.*, 1993, 1999; Newman *et al.*, 1995; Kunze *et al.*, 2004; Erbs *et al.*, 2008). DAMPs hingegen sind pflanzenendogene Elizitoren wie Oligogalacturonide, Cutin oder das Peptid Systemin, deren Entstehung durch ein angreifendes Pathogen ausgelöst wird (Nothnagel *et al.*, 1983; Schweizer *et al.*, 1996; Narváez-Vásquez & Ryan, 2004; Kraft *et al.*, 2005). Die Erkennung solcher molekularer Muster erfolgt über pflanzliche Rezeptorproteine, auch PRRs (für *Pattern Recognition Receptors*) genannt, und löst damit die basale PAMP-oder *Pattern*-vermittelte Immunität (PTI, von *Pattern-Triggered Immunity*) aus (Zipfel, 2008).

1.1.1.1. Die Erkennung mikrobieller molekularer Muster durch PRRs

PRRs sind Rezeptoren, welche in der Plasmamembran pflanzlicher Zellen verankert sind. Sie bestehen meist aus (1) einer Ectodomäne im Apoplasten über die entsprechenden Liganden gebunden werden können, (2) einer einzelnen Transmembrandomäne und (3) einer intrazellulären Kinasedomäne. In dieser Konformation werden PRRs als Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs, für *Receptor-Like Kinases*) bezeichnet. Andere PRRs hingegen besitzen eine ähnliche Grundstruktur, sind aber durch das Fehlen der intrazellulären Kinasedomäne ausgezeichnet und werden als Rezeptor-ähnliche Proteine (RLPs, für *Receptor-Like Proteins*) definiert (Couto & Zipfel, 2016). Um in diesem Falle die intrazelluläre Signalweiterleitung zu gewährleisten, sind solche Proteine auf weitere regulatorische Rezeptorkinasen angewiesen. Basierend auf der Struktur ihrer Ectodomäne, lassen sich PRRs in verschiedene Klassen unterteilen. LRR-RLKs (von *Leucin-Rich Repeat Receptor-Like Kinases*), deren Ectodomäne aus Leucin-reichen Wiederholungen besteht, binden vorzugsweise an Proteine oder Peptide. Dazu gehören Proteine wie Flagellin und EF-Tu, oder aber das endogene Peptid *AtPep1* (Chinchilla *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006). Die Bindung an Kohlenhydrat-basierte Liganden wie Chitin oder Peptidoglycan wird von Rezeptoren mit Lysin-Motiv enthaltenden Ectodomänen (LysM-PRRs) übernommen (Wan *et al.*, 2008; Willmann *et al.*, 2011). Lektin-Typ PRRs hingegen sind hauptsächlich für das Binden an extrazellulärem ATP und bakteriellen Lipopolysacchariden zuständig, während PRRs mit einer EGF-ähnlichen (von *Epidermal Growth Factor*) Ectodomäne wiederum Zellwand-abgespaltene Oligogalacturonide binden können (Brutus *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2014; Ranf *et al.*, 2015). Das wohl bekannteste und am besten charakterisierte Beispiel eines PRRs ist die LRR-RLK *Flagellin Sensitive 2* (FLS2) aus *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), welche erstmals im Jahre 2000 beschrieben werden konnte (Gómez-Gómez & Boller, 2000).

FLS2 erkennt ein hochkonserviertes, aus 22 Aminosäuren bestehendes Peptid des bakteriellen Flagellins, welches durch mehrfache Hydrolyse entsteht und unter dem Namen flg22 bekannt ist (Chinchilla *et al.*, 2006).

Die Erkennung und Bindung von flg22 an FLS2 führt zu einer Heterodimerisierung mit der Rezeptorkinase BAK1 (von *Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1*) (Chinchilla *et al.*, 2007). Diese Interaktion führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptorkomplexes, und dementsprechend zur Weiterleitung nachgeschalteter Signale (Schulze *et al.*, 2010). Da es sich bei PRRs um in der Plasmamembran verankerte Proteine handelt, bedarf es für die intrazelluläre Signalweiterleitung wiederum zytosolischer Partner. So assoziiert BIK1 (von *Botrytis Induced Kinase 1*), eine Rezeptor-ähnliche zytoplasmatische Kinase (RLCK, von *Receptor-Like Cytoplasmic Kinase*) sowohl mit FLS2 als auch mit BAK1. Es konnte gezeigt werden, dass BIK1 nach flg22-Bindung von BAK1 phosphoryliert wird, was wiederum zu einer Phosphorylierung von FLS2 und BAK1 führt. In Folge dessen spaltet sich BIK1 vom Rezeptorkomplex FLS2-BAK1 ab und ermöglicht somit eine auf die PAMP-Erkennung zugeschnittene intrazelluläre Antwort (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). BIK1 assoziiert nicht ausschließlich mit FLS2 und BAK1, sondern fungiert auch mit anderen PRRs als nachgeschaltete RLCK (Zhang *et al.*, 2010; Lal *et al.*, 2018).

1.1.1.2. Präinvasive Immunität

Die in der Blattepidermis eingebetteten Spaltöffnungen oder Stomata, bestehend aus zwei Schließzellen, sind hauptsächlich für den Gasaustausch und die Transpiration verantwortlich. Dabei wird die Öffnung dieser Poren strikt von externen Faktoren wie Lichtqualität, CO₂-Gehalt und Wasserverfügbarkeit, sowie von internen, hormonellen Signalen wie Abscisinsäure (ABA) geregelt (Sawinski *et al.*, 2013). Ein aus Pflanzensicht negativer Aspekt der Öffnung ist allerdings, dass phytopathogene Bakterien diese Poren als Haupttroute auf dem Weg ins Blattinnere nutzen. Schon im Jahre 1987 konnten Ramos und Volin z.B. zeigen, dass die durch eine ABA Behandlung ausgelöste Schließung der Stomata zu einer deutlich reduzierten Krankheitsausprägung in mit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infizierten Tomatenpflanzen führte (Ramos and Volin, 1987). Über einen langen Zeitraum hinweg wurden Stomata als eine Art passives Eingangstor angesehen, was ein einfaches Eindringen pathogener Mikroben zur Folge hätte. In den letzten Jahrzehnten konnte durch eine Vielzahl an Studien allerdings gezeigt werden, dass Pflanzen die Möglichkeit haben ihre Stomata als Antwort auf einen Pathogenangriff aktiv zu schließen.

Die daraus resultierende Limitierung mikrobieller Ausbreitung lässt sich als präinvasive oder stomatare Immunität definieren. Dabei spielt sowohl die Erkennung verschiedenster MAMPs über die in der Plasmamembran von Schließzellen verankerten PRRs, als auch die Regulation von ABA und Abwehr-induzierten Phytohormonen wie Salicyl- und Jasmonsäure, auf welche im Paragraphen 1.2 genauer eingegangen wird, eine entscheidende Rolle (Melotto *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* lassen Studien vermuten, dass der PRR FLS2, zusammen mit BIK1, eine tragende Rolle in der Früherkennung des phytopathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) spielt (Melotto *et al.*, 2006; Mersmann *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Nach MAMP Erkennung wird die Schließung der Stomata über verschiedene Sekundärsignale eingeleitet. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, für *Reactive Oxygen Species*) wie H₂O₂ werden mithilfe der NADPH-Oxidase RBOHD (von *Respiratory Burst Oxidase Homologue D*) gebildet, wobei dieser Prozess von einer weiteren Oxidase, der Aspartat-Oxidase, abhängig ist (Macho *et al.*, 2012). Zwei weitere Sekundärsignale sind die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und ein Anstieg des zytosolischen Calcium-Spiegels ([Ca²⁺]_{cyt}), wobei letzterer die vermutlich wichtigste Rolle einnimmt (Klüsener *et al.*, 2002; Melotto *et al.*, 2006). Um Stomata als Reaktion auf MAMPs oder ABA zu schließen, muss der Turgordruck in Schließzellen verringert werden, was von einem Efflux an Anionen und Kaliumionen durch membranständige Kanäle ermöglicht wird (Geiger *et al.*, 2011; Hedrich, 2012; Guzel Deger *et al.*, 2015). Neben Membrankanälen, regulieren auch Transporter wie die H⁺-ATPase 1 (AHA1/OST2, von *Open Stomata 2*) aus *Arabidopsis* den ABA- und MAMP-abhängigen Ionenfluss durch die Plasmamembran (Merlot *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Der alleinige Fluss von Anionen und Ionen reicht jedoch nicht aus um die Schließung von Stomata herbeizuführen. Die Aktivität von intrazellulären Proteinkinasen aus den Familien der Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs, von *Calcium-Dependent Protein Kinases*) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs, von *Mitogen-Activated Protein Kinases*) sind hierfür unerlässlich (Arnaud & Hwang, 2015). Die zwei MAP-Kinasen MPK9 und MPK12 sind beispielsweise vorzugsweise in Schließzellen exprimiert und agieren einerseits stromabwärts von ROS und [Ca²⁺]_{cyt}, während sie andererseits der Aktivität von Anionenkanälen vorgeschaltet sind (Jammes *et al.*, 2011). Kürzlich konnte auch der Pseudokinase TARK1 aus (von *Tomato Atypical Receptor Kinase 1*) aus Tomate eine Rolle in der präinvasiven Abwehr zugewiesen werden (Guzman *et al.*, 2020).

1.1.1.3. Postinvasive Immunität

Mikroben denen es gelingt, trotz präinvasiver Immunantworten bis in den Apoplasten vorzudringen, treffen dort erneut auf Abwehrmechanismen, die in diesem Falle unter der Bezeichnung postinvasive Immunität zusammengefasst werden können und den Mechanismen der präinvasiven Immunität stark ähneln. Hier können die in der Plasmamembran von Mesophyllzellen verankerten PRRs MAMPs und DAMPs erkennen und diese binden. Wie in der stomatären Immunantwort auch, sind Proteinkinasen wie RLCKs, CDPKs und MAPKs Schlüsselkomponenten für die erfolgreiche intrazelluläre Signalweiterleitung während postinvasiver Immunreaktionen. Nach MAMP/DAMP-Erkennung kommt es binnen weniger Minuten zu einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Levels, welcher von der RLCK BIK1, die auch für die Phosphorylierung der Rezeptorkomplexes FLS2/BAK1 zuständig ist, abhängig ist (Ranf *et al.*, 2014). Dieser Anstieg, auch Ca^{2+} -burst genannt, bringt die Öffnung anderer Membrankanäle mit sich. Dadurch wird der Ionenfluss von H^+ , K^+ , Cl^- und Nitrat verändert, der Apoplast alkalisiert, die Plasmamembran depolarisiert und das Zytoplasma angesäuert (Bigeard *et al.*, 2015). Die Produktion von ROS, auch ROS-burst genannt, ist eine weitere sehr schnelle Antwort auf die MAMP/DAMP-Erkennung. BIK1 phosphoryliert hierbei den N-Terminus von RBOHD um die ROS Produktion einzuleiten (Kadota *et al.*, 2015). RBOHD kann zusätzlich auch z.B. von der Calcium-abhängigen Proteinkinase CPK5 phosphoryliert und demnach aktiviert werden (Dubiella *et al.*, 2013). Um eine MAP Kinase zu aktivieren, muss diese immer von einer weiteren, ihr übergeordneten MAP Kinase phosphoryliert werden. Eine Kette von meist drei hierarchisch angeordneten Proteinkinasen bezeichnet man als MAPK Kaskade. Die in Serie geschalteten Proteine werden MAP Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K oder MEKK), MAP Kinase-Kinase (MKK oder MEK) und MAP Kinase (MAPK oder auch MPK) genannt. Die Aktivierung von CDPKs und MAPK Kaskaden verlagert die Immunantwort in den Zellkern. Dort kommt es beispielsweise zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TFs), die die Expression von Abwehrgenen steuern (Asai *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2008; Bi *et al.*, 2018). Neben der Produktion von ROS oder der Induktion von Abwehrgenen, dienen auch spätere Immunreaktionen der erfolgreichen Pathogenabwehr. Als wichtige späte Immunantwort ist definitiv die Ablagerung von Callose an der Zellwand zu nennen. Das pflanzliche β -1,3-Glukan wird mit Phenolen und Hydroxyprolin-reichen Glycoproteinen quervernetzt und bildet in dieser Zusammensetzung sogenannte Papillen, welche für eine effiziente Zellwandverstärkung sorgen und die laufende Infektion im Umkehrschluss limitieren können (Abramovitch & Martin, 2004).

Während man viele der Signalkaskaden, die in Folge eines Pathogenbefalls angeschaltet werden, bereits gut charakterisieren konnte, ist bislang wenig darüber bekannt, wie genau es letztlich zur Verhinderung bzw. Eindämmung einer Infektion durch die PTI-Antworten kommt. Neben der Zellwandverstärkung durch Calloseablagerungen ist die Produktion von Proteinen mit antimikrobieller Wirkung ein weiteres Resultat aus der Aktivierung PTI-assoziierter Signalkaskaden. So wird nach Pathogenbefall beispielsweise die Expression von *PR*-Genen (von *Pathogenesis-Related*) induziert, die unter anderem zur Produktion von Defensinen oder antimikrobiellen Sekundärmetaboliten, den Phytoalexinen, führt (Kombrink & Somssich, 1997; Nürnberger *et al.*, 2004). Zum Beispiel vermittelt eine Signalkaskade über die MAP Kinasen MPK3/MPK6 die Produktion des Phytoalexins Camalexin, welches die Integrität von Bakterienmembranen stört und dadurch die bakterielle Kolonisation eindämmt (Glawischnig, 2007; Mao *et al.*, 2011). In der Abbildung 1.1 werden die Ereignisse während der prä- und postinvasiven Immunantwort schematisch dargestellt.

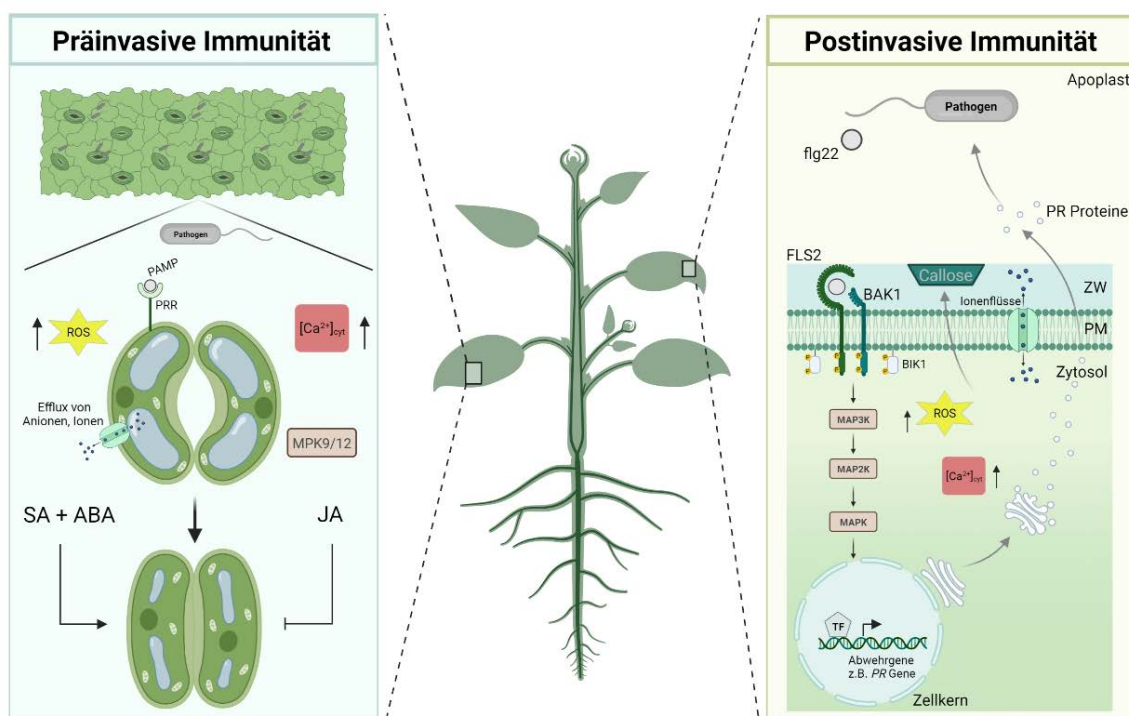


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der basalen pflanzlichen Immunreaktionen.

Bei Ankunft eines phytopathogenen Bakteriums auf der Blattoberfläche können die in Schließzellen verankerten PRRs PAMPs wahrnehmen, was zur Einleitung nachgeschalteter Abwehrreaktionen führt. Dabei kommt es zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zum Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels $[Ca^{2+}]_{cyt}$, einem Efflux von Anionen und verschiedenen Ionen wie z.B. Kaliumionen, sowie zur Aktivierung von MAPK Kaskaden. Dies führt dazu, dass Stomata aktiv geschlossen werden, um das Eindringen der Phytopathogene in den Apoplasten zu verhindern. Die Phytohormone Salicylsäure (SA) und Abscisinsäure (ABA) spielen dabei eine positiv-regulierende Rolle, während Jasmonsäure (JA) als Negativregulator der pathogen-induzierten Stomata-Schließung beschrieben wird.

Dringen phytopathogene Bakterien trotz dieser ersten induzierten Abwehrreaktion bis in den Apoplasten vor um sich dort zu vermehren, können wiederum die in der Plasmamembran von Mesophyllzellen verankerten PRRs freigesetzte PAMPs erkennen. So wird z.B. flg22 vom PRR FLS2 erkannt, welcher daraufhin einen Komplex mit BAK1 bildet. Über eine Phosphorylierungskaskade werden sowohl FLS2, BAK1 als auch die assoziierte Kinase BIK1 reguliert. Dies hat die Produktion von ROS, den Anstieg von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oder die Aktivierung von MAPK Kaskaden zur Folge. Über letztere werden Transkriptionsfaktoren im Zellkern reguliert, was die Expression von Abwehr-assoziierten Genen ermöglicht. So wird z.B. die Ablagerung von Callose an der Zellwand oder die Produktion von PR-Proteinen mit antimikrobieller Wirkung eingeleitet. Dadurch kann die Vermehrung des Phytopathogens eingeschränkt werden. ZW = Zellwand; PM = Plasmamembran.

1.1.2. Virulenzfaktoren Gram-negativer Bakterien

Wie wird ein Pathogen zu einem erfolgreichen Pathogen? Dafür mussten Pflanzen-, genauso wie Tierpathogene, im Laufe der Evolution Strategien entwickeln, die es ihnen ermöglichen, PTI-Antworten zu unterdrücken (Galán, 2009). Um sowohl prä-als auch post-invasive Immunantworten zu manipulieren, können Gram-negative Bakterien auf ein breitgefächertes Repertoire an Virulenzfaktoren zurückgreifen.

1.1.2.1. Phytotoxine

Die Produktion von Phytotoxinen nimmt gerade in der Unterdrückung der stomatären Immunität eine wichtige Rolle ein, ist aber auch aus der Manipulation postinvasiver Immunantworten nicht weg zu denken.

Mehrere Pathovaren des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas syringae*, so auch *Pst* DC3000, können über die Produktion von Coronatin (COR) die Wiederöffnung der Stomata induzieren und eine bakterielle Ausbreitung im Apoplasten fördern (Melotto *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2012a). Dieses Phytotoxin ist zwar nicht für die Pathogenität von Pseudomonaden notwendig, ist aufgrund genannter Charakteristika dafür aber ein höchst wirksamer Virulenzfaktor. COR führt bei einer *Pseudomonas* Infektion zu einer bedeutend ausgeprägteren Symptomentwicklung in erkrankten Pflanzen und einem erhöhten Bakterientiter im Vergleich zu der Infektion mit einer *cor*-defizienten Mutante (Bender *et al.*, 1987). Studien haben gezeigt, dass auch COR-insensitive Mutanten wie *Arabidopsis coil* (von *Coronatine Insensitive 1*) oder *jail* (von *Jasmonic Acid Insensitive 1*) aus Tomate resistenter sind und zudem phänotypische Merkmale aufweisen, die große Ähnlichkeit zu Pflanzen mit einem Defekt im Jasmonsäure-Signalweg haben (Kloek *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003).

Mittlerweile gilt Coronatin auch als eine molekulare Mimikry der biologisch aktiven Jasmonsäure-Form JA-Isoleucin (JA-Ile), wodurch sich die beobachteten Effekte erklären lassen (Staswick & Tiryaki, 2004). Coronatin interagiert mit Repressorproteinen des JA vermittelten Signalweges und führt zu deren Abbau über das 26S Proteasom (Katsir *et al.*, 2008).

Dadurch werden reprimierende Transkriptionsfaktoren von ihren Zielgenen losgelöst, um JA-abhängige Veränderungen der Genexpression zuzulassen (Zhang *et al.*, 2017). Die Auslösung solcher Veränderungen hat eine antagonistische Wirkung auf PTI-assoziierte Signalwege, was eine Etablierung des Pathogens innerhalb seines Wirts zulässt. *Pseudomonas syringae* kann neben Coronatin auch weitere Toxine wie Syringomycin produzieren. Dieses löst eine Porenformation durch pflanzliche Membranen aus und ermöglicht dadurch die Freisetzung von Pflanzenmetaboliten.

Zusätzlich fungiert es als anionisches Tensid, welches dafür sorgt, dass die Blattoberfläche stärker befeuchtet wird, um die bakterielle Motilität zu begünstigen (Hutchison *et al.*, 1995). Das Peptid Syringolin A aus *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* wirkt als Proteasominhibitor, mithilfe dessen das Phytopathogen die nach PAMP Erkennung geschlossenen Stomata wieder zu öffnen vermag (Groll *et al.*, 2008; Schellenberg *et al.*, 2010).

Für andere Gram-negative phytopathogene Bakterien, wie jene aus der Gattung *Xanthomonas* konnten bisher nur wenige Komponenten mit phytotoxischer Aktivität identifiziert werden. Allerdings konnten in den letzten Jahren Studien zeigen, dass *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* beispielsweise einen diffusionsfähigen Signalfaktor DSF (von *Diffusible Signaling Factor*) produziert und *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ein natriuretisches Peptid-ähnliches Protein synthetisiert, welche beide zu einer Wiederöffnung der Stomata führen (Gottig *et al.*, 2008; Gudesblat *et al.*, 2009).

1.1.2.2. Das Typ-III Sekretionssystem und seine Effektoren

Ein unter sowohl pflanzlichen-als auch tierischen Gram-negativen Pathogenen konservierter und sehr weit verbreiteter Virulenzmechanismus ist die Einschleusung von Typ-III Effektorproteinen (T3Es) über das Typ-III Sekretionssystem (T3SS) in das Zytosol der Wirtszelle (Ghosh, 2004). Die ersten für das T3SS kodierenden Gene konnten über Studien an nicht-pathogenen *Pseudomonas syringae* Mutanten identifiziert werden (Niepold *et al.*, 1985; Lindgren *et al.*, 1986). Komponenten des T3SS werden von einem Gen-Cluster kodiert, welche als *hrp* (von *hypersensitive response and pathogenicity*, hypersensitive Antwort und Pathogenität) Gene bezeichnet werden. Das *hrp* Gen-Cluster hat seinen Namen dadurch erhalten, dass die untersuchten *Pseudomonas syringae* Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp weder einen Zelltod im infizierten Gewebe hervorrufen konnten, noch virulent waren (Lindgren *et al.*, 1986). Die Gene dieses Clusters kodieren für über 20 Proteine, von welchen mindestens 11 in Pflanzen-und Tierpathogenen zu finden sind, und dementsprechend als *hrc* Proteine (von *hrp-conserved*) definiert werden (Bogdanove *et al.*, 1996).

Eine genauere strukturelle Aufbau des T3SS wurde 1998 erstmalig im Human- und Tierpathogen *Salmonella typhimurium* beschrieben (Kubori *et al.*, 1998). Das T3SS von phytopathogenen Bakterien ist, wie das der tierpathogenen Vertreter, in einem supramolekularen Komplex angeordnet.

Es besteht aus einer aus Proteinen gebildeten Substruktur, welche in der Bakterienmembran verankert ist und dabei die innere Membran, die Peptidoglycan-Schicht und somit den periplasmatischen Raum, sowie die äußere Membran durchspannt (Galán *et al.*, 2014). Von diesem Proteinkomplex geht ein nadelartiger Hrp Pilus aus, durch den Typ-III Effektoren in die Wirtszelle injiziert werden. Das letzte Glied des T3SS besteht aus einer Protein basierten Translokationspore, die in die Plasmamembran des Wirts eingebettet ist und über die T3Es schlussendlich in den zytoplasmatischen Raum befördert werden (Büttner & Bonas, 2002). In Abbildung 1.2 wird der Aufbau des T3SS in vereinfachter Form gezeigt.

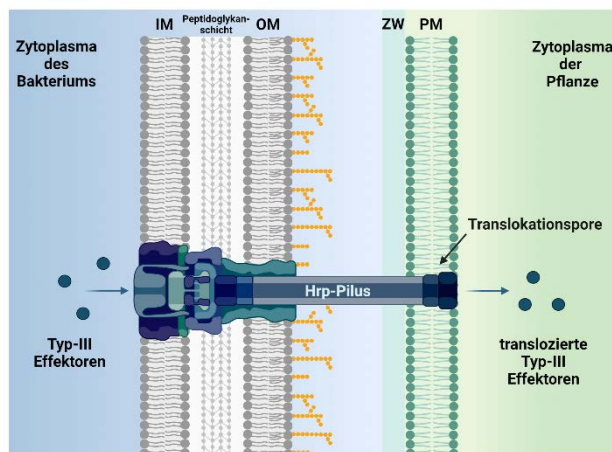


Abbildung 1.2: Der Aufbau des T3SS Gram-negativer Bakterien.

Schematische Darstellung des Sekretionsapparats, welcher sowohl die gesamte Bakterienmembran als auch die pflanzliche Zellwand und Plasmamembran durchspannt. Dabei werden Typ-III Effektoren aus dem bakteriellen Zytoplasma über den Hrp-Pilus und der damit verbundenen Translokationspore in der pflanzlichen Plasmamembran direkt in das Zytoplasma der Pflanze injiziert. IM: Innere Membran; OM: Äußere Membran; ZW: Zellwand; PM: Plasmamembran. Die Abbildung wurde nach He *et al.*, 2004 vereinfacht.

Natürlich werden nicht nur Typ-III Effektoren durch das T3SS transportiert, sondern auch Bestandteile des T3SS selbst. Um über das T3SS vermittelt zu werden, sind dessen Substrate auf den Besitz eines Export- bzw. Sekretionssignals angewiesen, welches sich in der Regel aus den ersten 15-25 Aminosäureresten ihrer N-terminalen Region zusammensetzt (Mudgett *et al.*, 2000; He *et al.*, 2004). Ein weiterer wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Beförderung durch das T3SS ist das Vorhandensein zytoplasmatischer Hilfsproteine, auch Chaperone genannt, welche an Substrate binden, diese oftmals stabilisieren und ihre Erkennung von Seiten des Sekretionsapparates unterstützen (Tucker & Galán, 2000; Gaudriault *et al.*, 2002; Feldman & Cornelis, 2003).

Mehrere Studien, vor allem durchgeführt an tierischen Organismen, bekräftigen heute die Annahme, dass die Sekretion von T3SS Komponenten und die Translokation von T3Es aufeinander folgend abläuft, und dass auch Effektorproteine zeitlich versetzt in das

Wirtszytosplasma injiziert werden (Magdalena *et al.*, 2002; Van Engelenburg & Palmer, 2008; Lara-Tejero *et al.*, 2011). Die zeitliche Trennung könnte funktionelle Interferenzen zwischen unterschiedlichen Effektoren, sowie eine potentielle Verstopfung der Translokationspore unterbinden (Büttner, 2016).

So groß wie die Vielfalt Gram-negativer Pathogene, ist auch der Unterschied in der Anzahl der von ihnen translozierten Effektoren. So besitzen verschiedene *Pseudomonas syringae* Stämme beispielsweise zwischen neun und 39 Typ-III Effektoren, während *Ralstonia solanacearum* Stämme über 60 bis 70 T3Es verfügen (Lindeberg *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2013).

Über das T3SS in die Wirtszelle eingebrachte Effektoren können Immunantworten ihrer Wirtspflanze auf unterschiedlichste Art und Weise beeinflussen. Alle fünf Hauptsäulen der PTI-Antwort (Abbildung 1.3) sind von ihrer manipulativen Funktionsweise betroffen: Die Signaltransduktion im Allgemeinen, die Regulation von Signalkomponenten über das Proteasom, die Signalwirkung von Phytohormonen, die Veränderungen bestimmter Genexpressionsmuster, sowie auch die Veränderungen am Zytoskelett (Büttner, 2016).

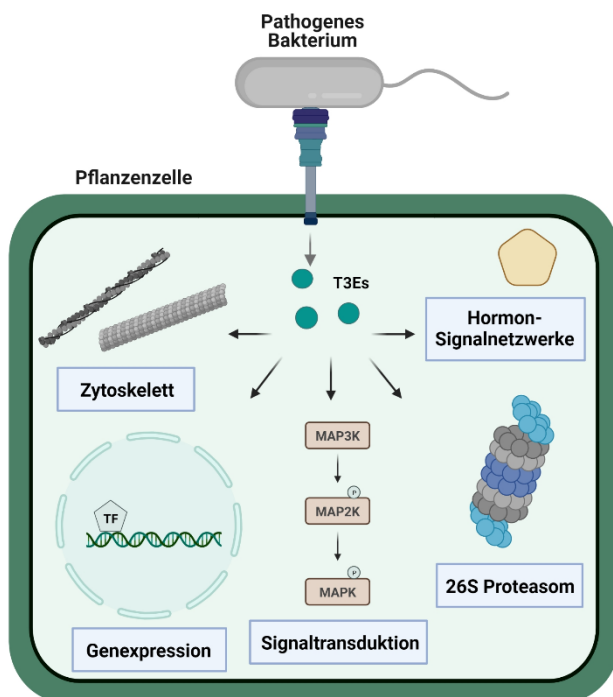


Abbildung 1.3: Die fünf Hauptsäulen der PTI als Angriffsziel phytopathogener T3Es.

Die in das Zytoplasma von Wirtszellen eingeschleusten T3Es manipulieren nach ihrer Translokation unterschiedliche zelluläre Prozesse der Pflanze. So können Hormon-Signalnetzwerke, der proteasomale Abbau von Proteinen über das 26S Proteasom, die Signaltransduktion, die Genexpression und auch die Assemblierung des Zytoskeletts von ihrer Wirkungsweise betroffen sein. Die Abbildung wurde nach Büttner, 2016 verändert.

Die Wirkungsweise einiger T3Es soll im Folgenden beschrieben werden.

T3Es manipulieren PRRs und Komponenten der PTI-Signalkaskade

PRRs sind die ersten Proteine über die Pflanzen eine bakterielle Invasion wahrnehmen können und aus diesem Grund sind sie ein strategisch günstiges Angriffsziel für Typ-III Effektoren. Eines der bekanntesten Beispiele dafür ist der T3E AvrPto aus *Pst* DC3000, obwohl seine biochemische Funktion bisher noch nicht aufgedeckt werden konnte.

In *Arabidopsis* interagiert dieser Effektor z.B. mit den Kinasedomänen der PRRs FLS2 und EFR um deren Autophosphorylierung und damit ihre Aktivierung zu verhindern (Xiang *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel aus dem Effektorenrepertoire von *Pst* DC3000 ist die Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase (ADP-RT) HopF2. Der Effektor interagiert mit BAK1 und verhindert die flg22-induzierte Phosphorylierung der RLCK BIK1 (Wu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014). HopF2 manipuliert auch die Aktivität stromabwärts-geschalteter MAP Kinasen indem er beispielsweise die MAP2K MKK5 mit ADP-Ribose versieht, um eine erfolgreiche Signalweiterleitung zu beeinträchtigen (Wang *et al.*, 2010). Ein ebenso interessantes Merkmal dieses T3Es ist, dass er einer der wenigen bisher charakterisierten Effektoren ist, die auf der Ebene der stomatären Immunantworten wirken. So ist er, vermutlich unabhängig von seiner ADP-RT Aktivität, in der Lage eine Schließung der Stomata nach flg22 Behandlung zu verhindern, wobei der dahinterstehende Wirkmechanismus noch aufzuklären ist (Hurley *et al.*, 2014). Bekannte Effektoren aus der Gattung *Xanthomonas* sind z.B. AvrAC und XopN. AvrAC aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* besitzt eine Uridyl-Transferase Aktivität und kann die RLCK BIK1 über eine Uridylierung an konservierten Phosphorylierungsstellen inaktivieren. Zudem interagiert AvrAC mit den RLCKs RIPK (von *RPM1-Induced Protein Kinase*) und PBL2 (*PBS1-Like 2*) (Feng *et al.*, 2012). XopN aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* interagiert in Tomate unter anderem mit der Pseudokinase TARK1, wodurch sowohl Callose-Ablagerungen, als auch die Expression bestimmter Abwehrgene inhibiert werden sollen (Kim *et al.*, 2009).

T3Es manipulieren die Regulation von Signalkomponenten über das 26S Proteasom

Die optimale Regulation von PTI-Antworten wird häufig durch den Abbau ihrer Komponenten über das 26S Proteasom gewährleistet. Dabei spielen Enzyme, bekannt als E3 Ligasen, eine wichtige Rolle. Während manche Effektoren an E3 Ligasen binden, imitieren andere deren Funktion stets mit dem übergeordneten Ziel, spezifische, positiv auf die Immunantwort wirkende, pflanzliche Proteine abzubauen.

Der Effektor AvrPtoB aus *Pseudomonas syringae* kann über seine E3 Ligase Domäne Ubiquitinmoleküle auf verschiedene PRRs wie FLS2 oder CERK1 transferieren und sie somit für den proteasomalen Abbau markieren (Göhre *et al.*, 2008; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009).

Ein weiterer Effektor mit E3 Ligase Aktivität ist XopL aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Dessen Substrate waren lange nicht ermittelt, doch kürzlich konnte das Protein SH3P2 als solches identifiziert werden. SH3P2 ist Teil des Autophagie-Signalweges, welcher sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen neben der Gewährleistung zellulärer Homöostase, unter anderem eine anti-mikrobielle Rolle einnimmt (Leong et al., 2021).

Effektoren, die zwar keine bestätigte E3 Ligase Aktivität besitzen, trotzdem aber mit der Aktivität des 26S Proteasoms interferieren, sind beispielsweise XopJ aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und HopZ4 aus *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Sie interagieren beide mit der Proteasom-Untereinheit RPT6 (von *Regulatory Particle ATPase 6*) und inhibieren dadurch dessen fehlerfreie Funktion (Üstün et al., 2013, 2014; Üstün & Börnke, 2015).

T3Es manipulieren die transkriptionelle Aktivität

Diverse Typ-III Effektoren haben die Möglichkeit Genexpression sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene zu Gunsten der Phytopathogene zu verändern. Einige Vertreter werden direkt in den Zellkern geleitet, um dort an DNA oder an Komponenten der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie zu binden. Mikroben der Gattung *Xanthomonas* verfolgen diese Virulenzstrategie in suszeptiblen Pflanzen erfolgreich mit der Einschleusung von TAL Effektoren (TALEs, von *Transcription Activator-Like Effectors*). Auch andere Gram-negative Bakterien wie *Ralstonia solanacearum* und *Burkholderia rhizoxinica* besitzen Effektoren mit großer Ähnlichkeit zu TAL Effektoren (Li et al., 2013a; de Lange et al., 2013; Juillerat et al., 2014). Die Mitglieder der TALE Familie besitzen eine für sie charakteristische Grundstruktur. Diese beinhaltet die Präsenz einer C-terminalen, sauren Aktivierungsdomäne, sowie die einer Kernlokalisierungssequenz (NLS, von *Nuclear Localization Signal*), welche beide für den Import in den Zellkern notwendig sind (Boch & Bonas, 2010). Dort angekommen, können diese Effektoren anhand einer im Zentrum ihrer Sequenz gelegenen DNA Bindedomäne einen pflanzlichen Transkriptionsfaktor nachahmen, um darüber die transkriptionelle Aktivität umzugestalten. Die DNA Bindedomäne besteht aus einer zwischen unterschiedlichen Effektoren stark schwankenden Anzahl an Wiederholungen von je 33 bis 35 Aminosäuren, wobei diese in einigen Fällen auch aus kürzeren Aminosäuresequenzen bestehen können (Boch & Bonas, 2010). Die Aminosäuren an Position 12 und 13 einer jeden Wiederholung sind polymorph, also hypervariabel, und sorgen dementsprechend für die Spezifität der TALE-DNA Bindung (Boch et al., 2009; Deng et al., 2012; Mak et al., 2012). Beispiele aus der TAL Effektor Familie sind AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* oder PthXo1 aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

AvrBs3 induziert in suszeptiblen Paprikapflanzen die Expression von *Upa20*, was wiederum eine Hypertrophie in Mesophyllzellen auslöst (Kay *et al.*, 2007). Interessanterweise konnte in einer neueren Studie von 2017 gezeigt werden, dass AvrBs3 über eigene Signalkomponenten den Weg in den pflanzlichen Wirt findet und dabei nicht auf ein funktionierendes T3SS angewiesen ist. Dies lässt vermuten, dass der Effektor bereits in einem sehr frühen Stadium der Infektion transloziert wird, noch bevor das T3SS überhaupt vollständig assembliert wurde (Scheibner *et al.*, 2017). Zielgene von PthXo1 sind hingegen *SWEET* Gene wie *OsSWEET11* aus Reis, deren Induktion zu einem erhöhten Zuckerexport in den Apoplasten führt und somit zu einer besseren Energieversorgung der Mikroben beiträgt (Yang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). Neben den prominenten TALEs gibt es auch Effektoren die auf andere Art und Weise in die Transkription von Genen eingreifen und diese umlenken können. So kann XopD aus dem *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 in Tomatenpflanzen beispielsweise über seine biochemische Funktion als SUMO (für *S*mall *U*biquitin *M*odifier) Cystein-Protease die Expression von Seneszenz- und Abwehrgenen unterdrücken (Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008). Interessant sind auch Effektoren, die mit der Aktivität von Transkriptionsfaktoren Abwehr-assoziiierter Gene interferieren. Ein gut beschriebenes Beispiel hierfür ist der T3E PopP2 aus *Ralstonia solanacearum*. Ihm ist es möglich durch eine Acetylierung von Lysinresten in der Sequenz bestimmter WRKY Transkriptionsfaktoren deren Bindung an ihre Zielgene zu verhindern, was die Repression deren Transkription zur Folge hat (Le Roux *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2015).

1.1.3. Die Effektor-vermittelte Abwehr

Im Laufe der Evolution hat sich zwischen Pflanzen und ihren pathogenen Gegnern ein regelrechter Wettlauf im Kampf um das bessere Überleben entwickelt. Hierbei konnten einige Pflanzen durch die Entwicklung von Resistenzproteinen (R-Proteinen) einen enormen Vorteil erlangen. Die meist verbreitete Klasse von pflanzlichen R-Proteinen ist die der NB-LRRs (für *N*ucleotide *B*inding-*L*eucin-*R*ich *R*epeats, Nukleotid-bindende Leucin-reiche Wiederholungen) (Meyers *et al.*, 2003). R-Proteine können bestimmte Typ-III Effektoren erkennen und sie als Virulenzfaktoren unwirksam machen. Dementsprechend werden diese spezifischen T3Es als Avirulenzproteine, und die daraus resultierende Immunantwort als Effektor-vermittelte Immunität (ETI, von *E*ffector-*T*riggered *I*mmunity) bezeichnet (Jones & Dangl, 2006). Darüber wird die basale induzierte Immunantwort auf eine neue Stufe gehoben, was in der Wirtspflanze auf den Erwerb einer Resistenz hinausläuft.

Das wohl wichtigste Merkmal dieser neuen Abwehrstufe ist dabei die Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion bzw. Antwort (HR, von *Hypersensitive Response*), die sich als Form programmierten Zelltodes beschreiben lässt und damit der Verbreitung von Pathogenen entgegen wirkt (Stakman, 1915; Goodman & Novacky, 1994; Heath, 1998; Hofius *et al.*, 2007).

1.1.4. Gemeinsamkeiten der PTI- und ETI-Antwort

Die zwei Stufen des induzierbaren pflanzlichen Immunsystems, PTI und ETI, haben erstaunlich viele Gemeinsamkeiten und unterscheiden sich nur in wenigen Punkten. So sind zwar unterschiedliche Rezeptoren, PRRs in der PTI und NB-LRRs in der ETI, dafür verantwortlich, mikrobielle Strukturen wie PAMPs oder eben Effektorproteine zu erkennen, die stromabwärts gelegenen Signalkaskaden und Reaktionen ähneln sich aber in beiden Fällen stark und involvieren dementsprechend oft die gleichen Signalmoleküle. Um eine erfolgreiche Umprogrammierung der Genexpression herbei zu führen, greifen beide beispielsweise auf die Signaltransduktion über MAP Kinase Kaskaden zurück (Asai *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 2013; Nitta *et al.*, 2014). Transkriptomanalysen konnten zeigen, dass viele der Abwehr-induzierten Gene zwischen PTI und ETI überlappend reguliert werden, wobei bei der ETI-Antwort höhere Transkriptmengen produziert werden (Tao *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004). Sowohl PTI als auch ETI behelfen sich Ca²⁺-abhängiger Proteinkinasen um die Produktion des wichtigen Signalmoleküls ROS zu induzieren oder ebenfalls Genexpressionmuster zu verändern (Boudsocq *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). Auch Phytohormone spielen in beiden Stufen der induzierten Immunantwort eine Schlüsselrolle (Tsuda *et al.*, 2009). Die einzigen zwei wesentlichen Unterschiede zwischen PTI und ETI sind einerseits die Dauer der jeweiligen Immunreaktionen, und andererseits die Möglichkeit zur Ausprägung einer HR während der ETI. Vermutlich kommt es bei der PTI zu keiner HR, weil ihre Immunreaktionen zu schwach dafür sind und nicht lange genug andauern (Underwood *et al.*, 2007). Andererseits wird mittlerweile auch vermutet, dass eine HR durch die Porenformation in der Plasmamembran induziert wird, nachdem NB-LRRs durch eine Konformationsänderung und Oligomerisierung aktiviert wurden (Wang *et al.*, 2019a,b). Da es während der PTI zu keiner Porenformation dieser Art kommt, gibt diese Hypothese einen weiteren Hinweis darauf, weshalb die HR ein Alleinstellungsmerkmal der ETI ist.

All die Jahre ist man davon ausgegangen, dass es sich bei der PTI und der ETI um zwei aufeinander folgende, nicht unbedingt zusammengeschaltete Prozesse handelt, und es konnten wenige Erklärungen dafür gefunden werden, warum sie sich so stark ähneln.

Licht ins Dunkel brachten zwei Studien vom März diesen Jahres die zeigten, dass eine vollständige Ausbildung der ETI nur in Anwesenheit von PRRs und deren Co-Rezeptoren möglich war (Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021). Außerdem wurde die NADPH-Oxidase RBOHD, die hauptverantwortlich für eine ROS-Bildung und abhängig von der RLCK BIK1 während der PTI ist, als molekularer Schlüssel-Knotenpunkt zwischen PTI und ETI identifiziert.

Auch eine effiziente Modulation ETI-abhängiger Expression immunrelevanter Gene über die Regulation essentieller WRKY Transkriptionsfaktoren wie *WRKY22* oder *WRKY29* war in Abwesenheit bestimmter PRRs nicht möglich. Die Erkenntnisse aus beiden Studien führten zu dem Schluss, dass PTI und ETI keineswegs zwei voneinander unabhängige Stufen der induzierten Immunantwort sind, sondern dass deren interaktives Zusammenspiel für die effiziente Abwehr von Pathogenen unbedingt von Nöten ist (Yuan *et al.*, 2021).

Auch in tierischen Organismen wurde ein synergistisches Wirken von Rezeptoren an der Zelloberfläche und intrazellulären Rezeptoren beschrieben, was wiederum auf eine systemübergreifende Funktion von Immunrezeptoren hindeutet (Cao, 2016).

1.2. Die Rolle von Phytohormonen in der pflanzlichen Immunantwort

Pflanzen haben, wie alle anderen Lebewesen auch, begrenzte Energieressourcen die ihnen für die Aufrechterhaltung aller zellulären Prozesse zur Verfügung stehen. Kommt es zu einem Pathogenbefall, müssen sie daher die Aktivierung einer effizienten Immunantwort über andere Bedürfnisse wie Wachstum oder Vermehrung stellen. Eine Priorisierung der Abwehr-Induktion als Antwort auf einen biotischen Stress wird hauptsächlich durch enge Wechselwirkungen zwischen Phytohormonen gewährleistet, die dadurch u.a. eine drastische Umprogrammierung auf transkriptioneller Ebene erlauben. Auf die eine oder andere Art und Weise haben alle Phytohormone einen Einfluss auf die Regulation von biotischen Stressantworten, wobei die Hormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) allerdings als wichtigste Schlüsselkomponenten gelten (Browse, 2009; Corina Vlot *et al.*, 2009).

1.2.1. Salicylsäure und ihre Rolle in der pflanzlichen Immunantwort

Typischerweise ist der Salicylsäure Signalweg in Immunantworten gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene involviert (Glazebrook, 2005). Bei Ersteren handelt es sich um mikrobielle Pathogene, die auf Nährstoffe aus lebendem Pflanzenmaterial angewiesen sind und deshalb bei Infektion ihr Wirtsgewebe nicht töten.

Hemibiotrophe Pathogene hingegen durchleben während ihres Lebenszyklus nur eine kurze biotrophische Phase, die mit Fortschreiten der Infektion in eine nekrotrophe Phase übergeht, welche ein Absterben des Wirtsgewebes zur Folge hat.

Die Salicylsäure ist eine phenolische Verbindung, welche über zwei verschiedene enzymatische Wege aus dem Primärmetaboliten Chorismat gebildet werden kann (Chen *et al.*, 2009). Auslöser für eine gesteigerte SA-Biosynthese ist in erster Linie ein durch den Pathogenbefall entstandener, veränderter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel (Du *et al.*, 2009).

Zusätzlich sind für die SA-Bildung während der PTI und der NB-LRR-assoziierten ETI die Lipase-ähnlichen Proteine EDS1 (von *Enhanced Disease Susceptibility 1*) und PAD4 (von *Phytoalexin Deficient 4*), oder auch das Protein NDR1 (von *Non-Race Specific Disease Resistance 1*) erforderlich (Wiermer *et al.*, 2005; Bernoux *et al.*, 2011). Stromabwärts der SA-Biosynthese wird dieser Botenstoff von verschiedenen Proteinen perzipiert, um daraufhin die Transkription SA-abhängiger immunrelevanter Gene zu regulieren (Moore *et al.*, 2011).

So konnten im Jahre 2012 drei Proteine der NPR (von *Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes*) Familie, nämlich NPR1, NPR3 und NPR4, als SA Rezeptoren identifiziert werden, die, wie sich später herausstellte, gegenteilige Funktionen haben (Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2018). NPR1 gilt als Haupt-Co-Aktivator einer ganzen Reihe an Abwehrgenen. Dazu gehört beispielsweise die Gruppe der PR (von *Pathogenesis-Related*) Gene, von welcher einige Vertreter, wie bereits erwähnt, für Proteine mit antimikrobieller Wirkung kodieren (Van Loon *et al.*, 2006). Damit es nicht zu einer fälschlichen Induktion von Immunantworten kommt, muss die Aktivität von NPR1 streng geregelt werden, was hauptsächlich über eine Reihe an post-translationalen Modifikationen gewährleistet wird (Tada *et al.*, 2008; Spoel *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2009; Skelly *et al.*, 2019). Im Gegensatz zu NPR1 sind NPR3 und NPR4 transkriptionelle Ko-Repressoren SA-abhängiger Gene mit voraussichtlich redundanter Funktion. So konnten Ding und Kollegen z.B. zeigen, dass NPR3/NPR4 über eine Interaktion mit den TGA Transkriptionsfaktoren 2, 5 und 6 die Expression wichtiger Regulatoren der Immunantwort wie *SARD1* (von *SAR Deficient 1*) und *WRKY70* inhibiert. Die Bindung von SA an NPR3/4 inhibiert ihre Repressorfunktion, was wiederum die Expression ihrer immunrelevanten Substrate erlaubt (Ding *et al.*, 2018). Durch diese strikte Regulation der SA-Antwort über mehrere Regulationsmechanismen kann einer schädlichen Autoimmunantwort vorgebeugt werden. Eine neuere Studie aus dem Jahr 2019 konnte mittels einer genomweiten Transkriptomanalyse über RNA-seq (von *RNA-sequencing*) 9524 SA-responsive Gene in *Arabidopsis* identifizieren, was das Ausmaß der regulatorischen Funktion dieses Phytohormons verdeutlicht (Hickman *et al.*, 2019).

Wie wichtig SA für die Abwehrreaktion gegen Phytopathogene ist, zeigt nicht nur die Tatsache, dass auch die beschriebenen *PR*-Gene, deren Genprodukte antimikrobielle Wirkung haben, zu den SA responsiven Genen gehören.

Weiter konnten beispielsweise Studien an SA-defizienten *NahG*-Tomaten Pflanzen, die aufgrund der NahG Hydroxylase Aktivität, welche den Abbau von SA katalysiert, zeigen, dass das Fehlen von SA zu einer reduzierten Abwehr gegen das Phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* führte indem die Ausprägung einer HR nicht mehr gewährleistet werden konnte (O'Donnell *et al.*, 2001).

Zudem ist SA ein wichtiges Langstreckensignal in der systemischen Abwehr, die als systemisch-erworbene Resistenz (SAR, von *S*ystemic *A*cquired *R*esistance) definiert wird (Gao *et al.*, 2015). Dabei wird nicht-infiziertes Pflanzengewebe nach einem Pathogenbefall durch eben solche mobilen Signale wie SA auf einen möglichen Angriff vorbereitet, was im Falle einer tatsächlichen Infektion des distalen Gewebes eine verstärkte Immunreaktion ermöglicht (Pieterse *et al.*, 2012; Conrath *et al.*, 2015).

1.2.2. Jasmonsäure und ihre Rolle in der pflanzlichen Immunantwort

Im Gegensatz zur Salicylsäure wird die Jasmonsäure meist im Zusammenhang mit der Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene und Herbivore als essentielles Phytohormon genannt (Glazebrook, 2005; Wu & Baldwin, 2010). Bei JA und ihren strukturverwandten Metaboliten handelt es sich um Lipid Derivate die nach Pathogen-oder Herbivorangriff über den Oxylin-Biosyntheseweg gebildet werden (Gfeller *et al.*, 2010). Dabei wird anfangs α -Linolensäure über die Enzyme 13-Lipoxygenase (13-LOX), Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxidcyclase (AOC) in das Zwischenprodukt 12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgewandelt (Wasternack, 2007). Ausgehend von OPDA können im Anschluss über das Enzym Oxyphytodiensäure-Reduktase 3 (OPR3) JA und verschiedene JA-Derivate gebildet werden (Kombrink, 2012). JA in seiner Reinform wird selten als biologisch aktive Form des Phytohormons beschrieben, weshalb sie nach ihrer Biosynthese direkt weiter prozessiert wird. Mithilfe des Enzyms JA-Carboxyl Methyltransferase (JMT) wird sie beispielsweise in die aktive Form Methyl-Jasmonat (MeJA) umgewandelt, wohingegen das Enzym JAR1 (von *J*asmonate *R*esistant *1*) eine Konjugation der Aminosäure Isoleucin (Ile) an JA katalysieren kann und somit zur Entstehung des biologisch höchst aktiven Enantiomers JA-Ile führt (Seo *et al.*, 2001; Staswick & Tiryaki, 2004; Fonseca *et al.*, 2009). Wie der SA-Signalweg, muss auch der JA-Signalweg streng reguliert werden.

In Abwesenheit eines Stimulus fungieren JAZ (von *Jasmonate ZIM* Domäne) Proteine als transkriptionelle Repressoren des JA-Signalweges, indem sie an Positivregulatoren wie z.B. Vertreter der bHLH (von *Basis Helix-Loop-Helix*) Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren-Familie MYC binden und deren Aktivität inhibieren (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011).

Auch das Adapterprotein NINJA (von *Novel Interactor of JAZ*), welches mit der ZIM Domäne der meisten JAZ Proteine interagiert, nimmt hier eine regulierende Rolle ein (Pauwels *et al.*, 2010). NINJA rekrutiert den Co-Repressor Topless (TPL), wodurch eine zusätzliche Sicherheitsstufe zur Vermeidung der vorzeitigen JA-Signalwegsaktivierung eingebaut wird (Pauwels *et al.*, 2010). Wird durch einen Pathogen-oder Herbivorenbefall das bioaktive JA-Ile synthetisiert, wird es über den JA-Transporter JAT1 in den Zellkern transportiert (Li *et al.*, 2017). Dort bindet JA-Ile an das F-box Protein COI1 (von *Coronatine Insensitive 1*). COI1 ist der Hauptakteur in der Regulation des JA-Signalweges. Dieses Protein ist Teil des SKP1-Cullin-F-box E3 Ligase Komplexes SCF^{COI1} und fungiert als Substrat-Rekrutierungsmodul (Sheard *et al.*, 2010). Die Bindung von JA-Ile an COI1 favorisiert eine Komplexbildung zwischen SCF^{COI1} und JAZ Repressoren, was wiederum zu deren Ubiquitinierung und Abbau über das 26S Proteasom führt (Thines *et al.*, 2007; Pauwels & Goossens, 2011). Dadurch kann die JAZ-abhängige Repression des JA-Signalweges aufgehoben werden und die Expression JA-responsiver Abwehrgene kann induziert werden (Memelink, 2009). Unter den in JA Abhängigkeit induzierten Genen befinden sich auch solche, die eine neue Synthese von JAZ Proteinen initiieren, ein Rückkopplungsmechanismus der die Abschaltung der Abwehrantwort ermöglicht, sobald sie nicht mehr gebraucht wird (Kombrink, 2012). In Arabidopsis gibt es zwei unterschiedliche JA-Signalwege, die sich anhand der jeweiligen involvierten Transkriptionsfaktoren in den MYC-Zweig und den ERF-Zweig unterteilen lassen.

Der MYC-Zweig reguliert über die MYC Transkriptionsfaktoren JA-abhängige Gene wie z.B. *VSP2* (von *Vegetative Storage Protein 2*) und ist hauptsächlich in die Abwehr von Herbivoren Fraßfeinden involviert, während der ERF-Zweig von Transkriptionsfaktoren der Familie AP2/ERF (von *APETALA 2/Ethylene Response Factor*) reguliert wird. Für die Aktivierung des ERF-Zweiges wird auch das Phytohormon Ethylen benötigt, was wiederum die Annahme bekräftigt, dass hormonelle Wechselwirkungen für den Aufbau einer effizienten Immunantwort ausschlaggebend sind. Der ERF-Zweig ermöglicht beispielsweise die Expression des bekannten JA Markergens *PDF1.2* (von *Plant Defensin 1.2*) und spielt hauptsächlich in der Abwehr nekrotropher Pathogene eine Rolle (Lorenzo *et al.*, 2003; McGrath *et al.*, 2005; Dombrecht *et al.*, 2007).

1.2.3. Hormonelle Wechselwirkungen während der pflanzlichen Immunantwort

Die wohl bekannteste Wechselwirkung, auch *cross talk* genannt, zwischen Phytohormonen während der Etablierung eines Immunitäts-assoziierten Signalnetzwerkes findet zwischen SA und JA statt. In der freien Natur werden Pflanzen häufig entweder gleichzeitig oder nacheinander von Pathogenen mit verschiedenen Lebensstilen angegriffen. So geht man davon aus, dass anhand eines antagonistischen SA-JA *cross talks* die Priorisierung des jeweils am besten passenden Signalweges ermöglicht werden kann (Pieterse *et al.*, 2012).

Erste Hinweise auf einen solchen Wirkantagonismus gab es bereits Ende der 80er Jahre/ Anfang der 90er Jahre, als Studien zeigten, dass die Applikation von SA oder Acetyl-SA auf Tomatenpflanzen sowohl die JA Produktion, als auch die JA-abhängige Transkription wichtiger Protease Inhibitoren verhinderte (Doherty *et al.*, 1988; Pena-Cortés *et al.*, 1993; Doares *et al.*, 1995). Am Anfang der gegenläufigen Regulation steht die MAP Kinase MPK4, die auf der einen Seite die Einleitung einer SA-abhängigen Signalkaskade unterdrückt, auf der anderen Seite jedoch die Initiierung einer JA-abhängigen Signalkaskade fördert (Petersen *et al.*, 2000). Stromabwärts von MPK4 spielt vor allem NPR1 eine Schlüsselrolle in diesem Prozess. Dabei unterdrückt es nicht nur die Expression der Lipoxygenase 2 (*LOX2*), einem essentiellen Enzym zur Synthese von JA, sondern auch die weiterer JA-Markergene wie *VSP* und *PDF1.2* (Spoel *et al.*, 2003).

Zusätzlich dazu wurde beispielsweise der Transkriptionsfaktor WRKY70, der im Zusammenhang mit der SA Regulation bereits als Positivregulator SA-abhängiger Genexpression genannt wurde, als Repressor JA-responsiver Gene beschrieben (Li *et al.*, 2004). Viele Pathogene haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt um sich diese antagonistische Wechselwirkung zu Nutze zu machen. Ein interessantes Beispiel dafür ist die *Pseudomonas syringae*-assoziierte Perturbation von SA-, JA-, aber auch ABA-Signalnetzwerken während der präinvasiven Immunantwort. Sowohl SA als auch ABA gelten als Positivregulatoren der stomatären Immunität, indem sie als Antwort auf einen Pathogenbefall die Schließung der Stomata einleiten (Melotto *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015). JA-Ile bzw. ihr molekulares Mimikry COR hingegen wurden in mehreren Studien als Negativregulatoren der stomatären Immunität beschrieben (Okada *et al.*, 2009; Panchal *et al.*, 2016b,a). Um die stomatäre Immunantwort zu überkommen, produziert *Pst* Coronatin, welches über die Bindung an COI1 die Aktivität der NAC Transkriptionsfaktoren ANAC019, ANAC055 und ANAC072 induziert (Zheng *et al.*, 2012).

Diese TFs reprimieren SA Biosynthesegene und induzieren Gene zur SA Verstoffwechslung, womit *Pst* die Akkumulation von SA in Schließzellen unterdrücken und dementsprechend die Wiederöffnung von Stomata fördern kann (Du *et al.*, 2014; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017). Abbildung 1.4 zeigt die wichtigsten Schritte der SA- und JA Signalwege mit Schwerpunkt auf bestehende negativ-regulatorische Wechselwirkungen.

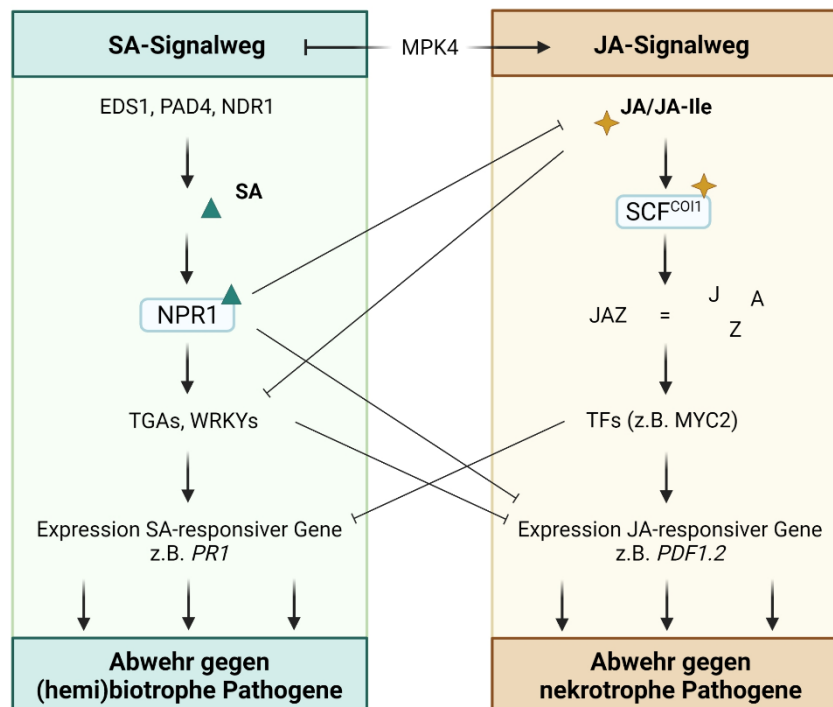


Abbildung 1.4: Die Signalwege der Phytohormone SA und JA in der pflanzlichen Immunantwort.

Hier sind die wichtigsten Schritte und Komponenten des Salicylsäure (SA)-Signalwegs (links in grün) und des Jasmonsäure (JA)-Signalwegs (rechts in braun) dargestellt. Zudem werden negative Wechselwirkungen zwischen den zwei Signalwegen gezeigt. EDS1 = *Enhanced Disease Susceptibility 1*; PAD4 = *Phytoalexin Deficient 4*; NDR1 = *Non-Race Specific Disease Resistance 1*; NPR1 = *Non-Expressor of Pathogenesis Related Genes 1*; PR1 = *Pathogenesis Related 1*; JAZ = *Jasmonate ZIM Domain*; SCF^{COI1} = SKP1-Cullin-F-box E3 Ligase Komplex; PDF1.2 = *Plant Defensin 1.2*.

Nicht in jedem Falle haben SA und JA eine antagonistische Wirkung aufeinander. So gibt es mittlerweile einige Studien, die zeigen, dass sowohl SA als auch JA die Ausbildung der ETI-Antwort begünstigen (Mur *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016; Betsuyaku *et al.*, 2018).

Damit Pflanzen, die durch die HR während der ETI die Verbreitung biotropher und hemibiotropher Pathogene erfolgreich eindämmen können, nicht nekrotrophen Pathogenen gegenüber angreifbar werden, könnte der Synergismus zwischen SA und JA in diesem Fall von großem Vorteil sein (Liu *et al.*, 2016).

1.3. WRKY Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Immunantwort

Mit Erkennung eines Pathogenbefalls wird in Pflanzenzellen eine schnelle und massive transkriptionelle Umprogrammierung benötigt, um induzierbare Immunantworten auszulösen. Diese Umprogrammierung wird über ein komplexes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren und Kontext-spezifischen Ko-Regulatoren gesteuert (Moore *et al.*, 2011).

Die Regulation biotischer Stressantworten wird in Pflanzen hauptsächlich von sechs großen TF-Familien, AP2/ERF, bHLH, NAC, TGA/bZIP (von *TGA/Basic Domain Leucin Zipper*), TCP (von *Teosinte Branched 1/Cycloidea/PCF*) und WRKY, übernommen, wobei WRKY TFs als wichtigste Schlüsselkomponenten gelten (Rushton *et al.*, 2010; Tsuda & Somssich, 2015; Birkenbihl *et al.*, 2017b). Die WRKY TF-Familie stellt mit die größte Familie transkriptioneller Regulatoren dar und ist, mit Ausnahme des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* und des humanpathogenen Einzellers *Gardia lamblia*, ausschließlich in Pflanzen zu finden (Ülker & Somssich, 2004). So konnten bisher in Arabidopsis beispielsweise 75 WRKY TFs identifiziert werden, während das Reis Genom für über 100 Mitglieder dieser Familie kodiert (Ross *et al.*, 2007; Song & Gao, 2014). Das bedeutendste Merkmal dieser Transkriptionsfaktoren ist deren aus ca. 60 Aminosäuren bestehende DNA-Bindedomäne (WRKY-DBD, von *WRKY DNA-Binding Domain*). Diese enthält an ihrem N-Terminus das namensgebende, von sieben Aminosäureresten gebildete, Heptadenmotiv WRKYGQK, während an ihrem C-Terminus konservierte Cystein- und Histidinreste durch Bindung an Zinkatome ein Zinkfinger-Motiv formen (Maeo *et al.*, 2001; Rushton *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011).

Zwar besitzen alle WRKY-DBDs eine ähnliche Grundstruktur, ein bestimmter Grad an Variabilität besteht aber dennoch, wodurch sich WRKY TFs in die Gruppen I bis IV einteilen lassen (Xie *et al.*, 2005). Mitglieder der Gruppe II besitzen neben des WRKYGQK Motivs zusätzliche konservierte Domänen und werden aufgrund dessen nochmals in die Untergruppen II a-e unterteilt (Eulgem *et al.*, 2000). Über die WRKY-DBD wird ein *cis*-Element in der Promotorregion von Zielgenen gebunden, welches typischerweise aus der Kern-Nukleotidsequenz 5'-(T)TGAC(C/T)-3' besteht und W-Box genannt wird (Rushton *et al.*, 1996; Chen & Chen, 2000; Ciolkowski *et al.*, 2008).

Die Spezifität mit der WRKY TFs an Promotoren verschiedenster Zielgene binden können, wird dabei mit zunehmender Sicherheit von den W-Box flankierenden Nukleotidsequenzen vermittelt (Ciolkowski *et al.*, 2008). Zudem binden WRKY TFs häufig an W-Boxen in ihren eigenen Promotorregionen oder in Promotorregionen anderer WRKY TFs, um eine Selbst- und Querregulation zu ermöglichen (Mao *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2021b).

Die Funktion von WRKY TFs wird allerdings auch über post-translationale Modifikationen (PTMs, von *Post-Translational Modifications*) wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung strikt reguliert (Ishihama *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2011; Matsushita *et al.*, 2013). WRKY TFs sind sehr universell einsetzbare Transkriptionsfaktoren.

Sie können je nach Zielgen sowohl reprimierende als auch aktivierende Funktionen einnehmen und in der Tat enthalten unzählige in die PTI- und ETI-Antwort involvierte Abwehrgene W-Boxen in ihren Promotorregionen (Wani *et al.*; Birkenbihl *et al.*, 2017a). Neben den bereits erwähnten WRKY TFs, kann als gut charakterisiertes Beispiel das WRKY TF-Paar WRKY18/WRKY40 aus Arabidopsis genannt werden. Es handelt sich hierbei um zwei Transkriptionsfaktoren mit teils redundanter Funktion, die als Negativregulatoren in der Immunantwort gegen *Pseudomonas syringae* sowie *Golovinomyces orontii*, einem biotrophen Pilz, fungieren (Xu *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu nehmen sie in der ETI und in der Immunantwort gegen den Herbivoren *Spodoptera littoralis* eine wichtige positiv-regulatorische Rolle ein (Schweizer *et al.*, 2013; Schön *et al.*, 2013). Über ein Genom-übergreifendes ChIP-Seq (von *Chromatin-Immunoprecipitation DNA-Sequencing*) Verfahren konnten Birkenbihl und Kollegen ca. 1300 potentielle direkte WRKY18 und ca. 1500 potentielle direkte WRKY40 Zielgene identifizieren (Birkenbihl *et al.*, 2017a). Darunter ließen sich RLK-kodierende Gene, Hormon-Signalweg-assoziierte Gene oder auch Gene zur Kodierung von weiteren Transkriptionsfaktoren finden. Dies bestätigt erneut wie vielschichtig die Regulation von Stressantworten über ein gut ausgebautes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren ist.

1.4. Ubiquitinierung und das Ubiquitin-26S Proteasom System (UPS)

Die Ubiquitinierung ist eine zentrale post-translationale Modifikation worüber in Eukaryoten viele zelluläre Prozesse, so auch die pflanzliche Immunantwort, reguliert wird.

Identifiziert und charakterisiert wurde anfangs ihre Funktion im Degradationsprozess von Proteinen und der Erhaltung einer zellulären Homöostase, wobei mittlerweile bekannt ist, dass sie auch einen Einfluss auf viele andere nicht-proteolytische Prozesse wie z.B. die DNA-Reparatur hat (Goldstein *et al.*, 1975; Goldberg, 2005; Wen *et al.*, 2006; Komander & Rape, 2012). Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes, 8,5 kDa schweres Polypeptid, was unter eukaryotischen Organismen höchst konserviert ist (Özkaynak *et al.*, 1984; Zuin *et al.*, 2014). Die Ubiquitinierungsreaktion ist eine dreistufige Kaskade die von mindestens drei Enzymen katalysiert wird. Der erste Schritt dieser Kaskade ist ATP abhängig und dient der Aktivierung des Ubiquitins und dessen Bindung an das E1-aktivierende Enzym (E1).

Dabei wird Ubiquitin zunächst an seinem C-terminalen Glycinrest adenyliert und anschließend über eine Thioester-Verknüpfung unter Abspaltung von AMP an die Cystein-Sulphydrylgruppe der E1 gebunden. In der zweiten Stufe dieser Kaskade können E2-konjugierenden Enzyme (E2s) Ubiquitinmoleküle über eine Trans-Thioesterifizierung von der E1 auf ein Cystein in ihrem eigenen aktiven Zentrum übertragen.

Im letzten Schritt der Ubiquitinierungskaskade spielen E3 Ligasen (E3s) die Hauptrolle. E3s sind sowohl für eine spezifische Selektion der Substrate, als auch für die eigentliche Katalyse der Ubiquitin-Übertragung auf das dementsprechende Substrat verantwortlich. Hier kommt es zu der Entstehung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Substratprotein (Furlan & Trujillo, 2017).

Substrate können auf verschiedenste Art und Weise ubiquitiniert werden, und genau das ist ausschlaggebend für die äußerst vielseitige Nutzung dieser PTM in zellulären Prozessen ist.

So werden manche Substrate beispielsweise nur mit einem Ubiquitinmolekül bestückt (Monoubiquitinierung), während andere mit Polyubiquitinketten, die teilweise sogar unterschiedlich verzweigt sein können, markiert werden (Pickart & Fushman, 2004; Zhou & Zeng, 2017). Ubiquitin selbst besitzt sieben Lysinreste in seiner Sequenz, über deren Verknüpfung solche Polyubiquitinketten entstehen können (Xu *et al.*, 2009). Nach Erkennung der dementsprechenden Modifikation, wird der dazugehörige zelluläre Prozess eingeleitet. Wird ein Substrat beispielsweise mit einer über Lysin48 (K48)-verbundenen Polyubiquitinkette markiert, so wird es im Anschluss zum proteasomalen Abbau über das 26S Proteasom geleitet (Adams & Spoel, 2018). Lysin63 (K63)-verbundene Polyubiquitinketten führen hingegen meist zur Einleitung von Prozessen wie z.B. die DNA-Reparatur (Wen *et al.*, 2008). Während in Arabidopsis bisher lediglich zwei E1-aktivierende Enzyme identifiziert werden konnten, scheint es mindestens 38 E2-konjugierende Enzyme zu geben, die unter anderem einen Einfluss auf die Art der Polyubiquitinverbindung sowie deren Kettenlänge haben können (Hatfield *et al.*, 1997; Kraft *et al.*, 2005; Ye & Rape, 2009). Die größte Enzymgruppe mit ca. 1500 Vertretern in Arabidopsis stellt die aus vier Untergruppen bestehende Familie der E3 Ligasen dar (Mazzucotelli *et al.*, 2006; Trujillo & Shirasu, 2010).

Um dem Prozess der Ubiquitinierung nebst Einsatzes bestimmter E1-E2-E3 Kombinationen einen weiteren Grad an Spezifität zu verleihen, wird dieser von zwei weiteren wichtigen Enzymgruppen, den E4 Ligasen und den Deubiquitinierungsenzymen (DUBs) beeinflusst, wobei diese noch weniger erforscht sind als die kanonischen E1, E2 und E3 Enzyme (Miricescu *et al.*, 2018).

E4 Ligasen sind zwar nicht in der Lage die Ubiquitinierung eines Substrats zu initiieren, können bereits bestehende Ubiquitinketten allerdings verlängern (Huang *et al.*, 2014). Die Aufgabe von DUBs ist es hingegen, Polyubiquitinketten zu spalten um dadurch beispielsweise Substrate vor einem proteasomalen Abbau zu schützen (Jeong *et al.*, 2017; Skelly *et al.*, 2019). Der Ablauf der Ubiquitinierungskaskade ist in Abbildung 1.5 vereinfacht dargestellt.

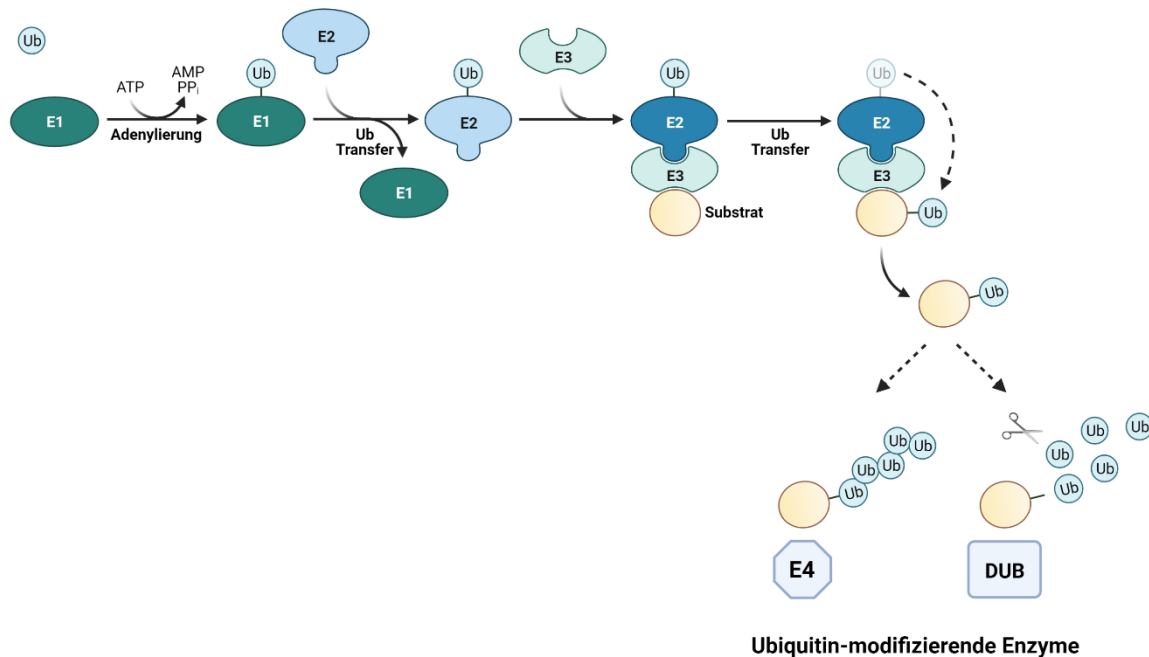


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der Ubiquitinierungskaskade.

Die klassische Ubiquitinmarkierung von Substratproteinen erfolgt über eine dreistufige enzymatische Kaskade. Dabei werden im ersten Schritt Ubiquitinmoleküle (Ub) über Adenylierung an ein E1-aktivierendes Enzym (E1) gebunden. Darauf folgt der Ub-Transfer von der E1 auf ein E2-konjugierendes Enzym (E2). Im letzten Schritt bindet die E3 Ligase (E3) an das entsprechende Substrat und über eine weitere Bindung an die E2 wird der Ub-Transfer von der E2 auf das Substrat vermittelt. Weitere Enzyme wie E4 Ligasen (E4) oder Deubiquitinasen (DUBs) können eine unterstützende Funktion bei der Polyubiquitinierung von Substratproteinen (E4) haben oder aber die Abspaltung von Ubiquitinmolekülen vom Substrat katalysieren (DUBs).

Wird ein Protein mit einer K48-Polyubiquitinkette versehen, kann dieses vom 26S Proteasom erkannt, und dessen Abbau vollzogen werden. Das 26S Proteasom ist ein ca. 2.5 MDa (Megadalton) großer, ATP-abhängiger Protease Komplex, der aus 31 Untereinheiten besteht und in zwei Subkomplexe unterteilt werden kann. Der 20S Kernkomplex (CP, von *C*ore *P*article) verfügt über die tatsächliche Proteaseaktivität, während der 19S Regulationskomplex (RP, von *R*egulatory *P*article) die Erkennung ubiquitinerter Substrate sowie die Öffnung des CP-Kanals unterstützt (Smalle & Vierstra, 2004; Üstün *et al.*, 2016).

1.5. Das Phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*), synonym auch als *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xe*) bezeichnet, ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges γ -Proteobakterium der Gattung *Xanthomonas*, das als Haupterreger der Fleckenkrankheit (*Bacterial Spot Disease*) auf suszeptiblen Paprika (*Capsicum* spp.)- und Tomatenpflanzen (*Lycopersicon* spp.) gilt (Jones *et al.*, 2004; Thieme *et al.*, 2005).

Gelangt *Xcv* beispielsweise über Regentropfen auf eine Blattoberfläche, durchlebt es dort, wie andere Blattpathogene auch, eine kurze epiphytische Phase, bevor es über natürliche Öffnungen wie Stomata oder aber Verwundungsstellen bis in den Apoplasten vordringt (McGuire, 1991). Die aggressive Ausbreitung des hemibiotrophen Pathogens während der endophytischen Phase führt zur Ausprägung typischer Krankheitssymptome wie Chlorosen und wässrigen Läsionen (*Water-Soaked Lesions*) bis hin zu Nekrosen des infizierten Gewebes. Eine Infektion der Früchte bringt die Entstehung nekrotischer Flecken mit sich, die der Fleckenkrankheit ihren Namen gaben. Resistente Pflanzengenotypen besitzen R-Proteine die nach Erkennung bestimmter eingeschleuster *Xcv* Avirulenzfaktoren eine HR auslösen können (Yu *et al.*, 1995; Ciardi *et al.*, 2000). Obwohl *Xcv* alle aus Gram-negativen Bakterien bekannten Protein-Transporter Systeme wie z.B. die Sekretionssysteme I-VI besitzt, erlangt es seine Pathogenität hauptsächlich durch das vorhandene Typ-III Sekretionssystem (T3SS), welches vom *hrp* Gen-Cluster *hrpA* bis *hrpF* kodiert wird (Bonas, 1994; Thieme *et al.*, 2005).

Über das T3SS kann *Xcv* ca. 35 Effektorproteine in die Wirtszelle einschleusen, von denen einige zwischen unterschiedlichen *Xcv* Stämmen oder gar innerhalb der Gattung *Xanthomonas* konserviert sind und dementsprechend als Kerneffektoren (*Core Effectors*) bezeichnet werden (Potnis *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2015). Fehlt eines der T3Es aus dem Kernrepertoire, so bringt dies in jedem Falle einen Virulenzverlust des Bakteriums mit sich (Ryan *et al.*, 2011).

T3Es aus *Xcv* haben, wie die anderer Pathogene auch, unterschiedlichste Zielgene in der Wirtspflanze, um im Kampf gegen die induzierten Immunantworten möglichst breit aufgestellt zu sein. Ein strategisch günstiger Angriffspunkt scheint z.B. die transkriptionelle Regulation wichtiger Abwehrmechanismen zu sein. So besitzen einige *Xcv* Stämme beispielsweise TAL Effektoren wie AvrBs3, oder aber das Effektorprotein XopD, welches eine Ethylen-abhängige Expression von Abwehrgenen inhibiert (Kay *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Für andere T3Es bleibt der Wirkmechanismus bisher unerforscht.

Das Typ-III Effektorprotein XopS

XopS (von *Xanthomonas Outer Protein S*) ist ein weiteres, im *Xcv* Genom des Stammes 85-10 kodiertes, transloziertes Typ-III Effektorprotein (Schulze *et al.*, 2012; Teper *et al.*, 2016). Es handelt sich hierbei um ein ca. 34 kDa großes Protein ohne jegliche Sequenzhomologie zu anderen charakterisierten T3Es, worüber Rückschlüsse auf dessen Struktur, Funktion oder biochemische Aktivität gezogen werden könnten.

Bisher war fast ausschließlich bekannt, dass der Verlust von XopS in einer *Xcv*Δ*xopS* Deletionsmutante zu einer signifikanten Verminderung von Krankheitssymptomen auf suszeptiblen Paprikapflanzen führte, ohne jedoch das Bakterienwachstum des Pathogens im infizierten Gewebe negativ zu beeinflussen (Schulze *et al.*, 2012).

1.6. Vorarbeiten

Aufgrund mangelnder Kenntnisse über die Struktur und Funktionsweise des T3Es XopS aus *Xcv* konnte bisher nicht aufgeklärt werden, wie er die Ausprägung von Krankheitssymptomen auf Paprikapflanzen einleiten kann.

1.6.1. Identifikation potentieller XopS Zielproteine

Um ein besseres Verständnis für den Wirkmechanismus von XopS zu erlangen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit potentielle pflanzliche Zielproteine (*targets*) über eine Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung (Y2H *screen*) gesucht (durchgeführt von Susanne Jeserigk). Dabei diente eine cDNA-Bibliothek aus *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) als Beute und XopS als Köderprotein. Als potentielles Zielprotein konnte ein WRKY TF identifiziert werden, der eine 64%ige Ähnlichkeit zu dem aus Arabidopsis bekannten WRKY40 TF hat und dementsprechend als *NtWRKY40* deklariert wurde. Eine direkte Interaktion in Hefe zwischen XopS und dem *NtWRKY40* orthologen Protein aus *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*), *NbWRKY40*, konnte bestätigt werden (Masterarbeit Dr. Daniela Spinti, 2016; Abb. 1.6A). Zudem bestätigten weitere *in vitro* und *in planta* durchgeführte Experimente wie die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC, von *Bimolecular Fluorescence Complementation*) und die *in planta*-und *in vitro*-Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) diese Interaktion (Dr. Suayb Üstün; Abb. 1.6B-D).

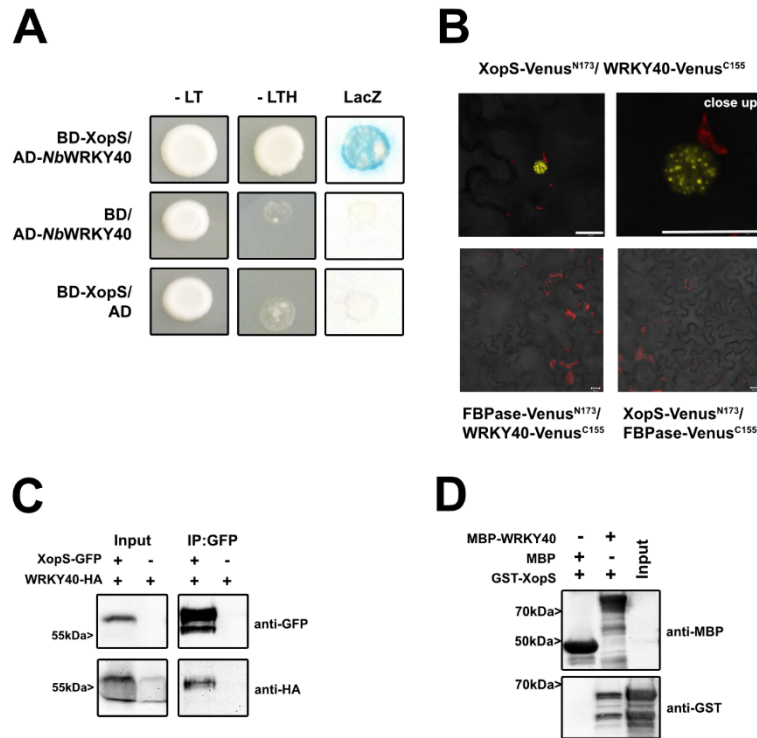


Abbildung 1.6: XopS interagiert mit NbWRKY40 *in vitro* und *in planta*.

(A) XopS (in pGBT9) wurde an die GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und in Kombination mit dem an die GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten NbWRKY40 Protein (in pGAD424) im Hefestamm Y190 exprimiert. Transformierte Hefezellen wurden auf Selektionsmedium gestempelt und anschließend wurde ein *LacZ-Filter-Assay* durchgeführt. Die Leervektoren pGAD424 (AD) und pGBT9 (BD) dienen als Negativkontrollen. NbWRKY40, *Nicotiana benthamiana* WRKY40. –LT, Hefe-Selektionsmedium ohne Leu und Trp. –LTH, Hefe-Selektionsmedium ohne Leu, Trp und His. Wachstum auf –LTH zeigt die Expression des Reportergens *HIS3*. Die Blaufärbung bei LacZ zeigt die Aktivität des LacZ Reportergens. (B) Visualisierung der *in planta* Protein-Protein Interaktion zwischen XopS und NbWRKY40 über Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Gelb fluoreszierendes Protein (YFP) konfokal-mikroskopische Bilder zeigen *N. benthamiana* Zellen in der Blattepidermis die transient XopS-Venus^{N173} mit NbWRKY40-Venus^{C155} exprimieren. Als Negativkontrolle wurde die Ko-Expression von XopS-Venus^{N173} mit FBPase-Venus^{C155} bzw. NbWRKY40-Venus^{C155} mit FBPase-Venus^{C155} konfokal-mikroskopisch untersucht. Die Bilder wurden 48 h nach Agrobakterien-vermittelter Transformation entsprechender Konstrukte aufgenommen. Die Maßstableiste entspricht 20 µM. (C) Ko-Immunopräzipitation von XopS-GFP mit NbWRKY40-HA. XopS-GFP und NbWRKY40-HA wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. 48 h nach der Agrobakterien-infiltration wurden Blattproben geerntet und einer Proteinextraktion unterzogen. Der somit gewonnene Rohextrakt (Input) wurde im Anschluss auf die Matrix der *GFP-Trap*[®] geladen um XopS-GFP über seine Affinitätsmarkierung aufzureinigen (IP:GFP). Zur Detektion von XopS und seinem möglicherweise gebundenen putativen Interaktionspartner NbWRKY40 wurde eine Western Blot Analyse mit anti-GFP und anti-HA Antikörpern durchgeführt. (D) *In vitro* Ko-Immunopräzipitation zur Bestätigung der direkten Interaktion zwischen XopS und NbWRKY40. Freies MBP (MBP), MBP-NbWRKY40 und GST-XopS wurden in *E. coli* exprimiert. Eine Amylose-Matrix wurde verwendet, um MBP (Negativkontrolle) bzw. MBP-NbWRKY40 zu binden. Gebundene Proteine wurden mit GST-XopS inkubiert und anschließend mit Maltose eluiert. Proteine wurden anhand eines Western Blots mit anti-MBP und anti-GST Antikörpern detektiert.

1.6.2. XopS beeinflusst den proteasomalen Abbau von WRKY40

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren über das 26S Proteasom abgebaut werden können, um die Regulation von Abwehrmechanismen zu gewährleisten. Ob auch *NbWRKY40* über das 26S Proteasom abgebaut wird, sollte im Rahmen der Vorarbeiten zu dieser Studie geklärt werden (Experimente durchgeführt von Dr. Suayb Üstün). In der Tat konnte die Behandlung mit dem bekannten Proteasominhibitor MG132 zu einer Akkumulation von transient exprimierendem *NbWRKY40*-HA Protein in *N. benthamiana* Blättern führen (Abb. 1.7A). Weiter konnte gezeigt werden, dass auch XopS in der Lage ist *NbWRKY40*-HA zu stabilisieren, wobei der Effektor selbst keinen negativen Einfluss auf die Proteasomaktivität hat (Abb. 1.7B und C).

Die Ubiquitinierung eines *NbWRKY40*-GFP Fusionsproteins als solche scheint weder durch MG132, noch durch die Ko-Expression von XopS-HA in *N. benthamiana* beeinträchtigt zu sein. Darüber konnte ein Ko-IP Experiment mit angeschlossener Western Blot Analyse, wobei ubiquitiniertes *NbWRKY40*-GFP über einen spezifischen anti-Ubiquitin Antikörper detektiert wurde, Aufschluss geben (Abb. 1.7D).

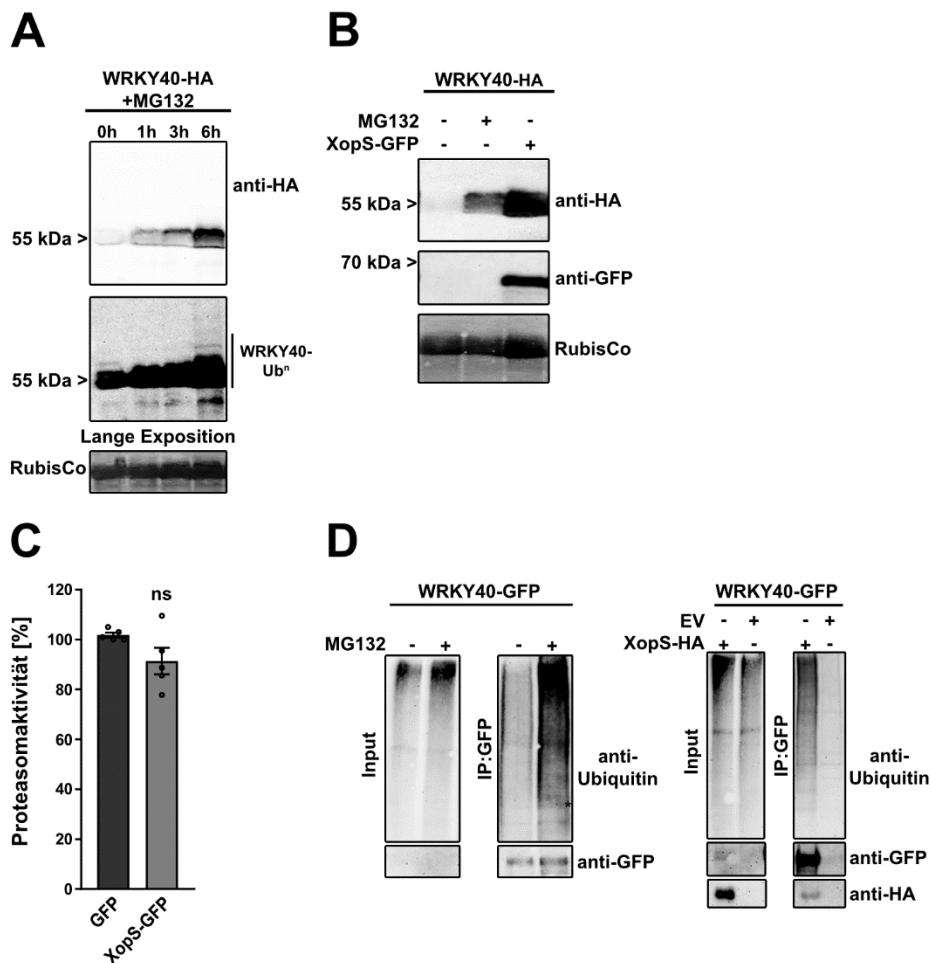


Abbildung 1.7: XopS beeinflusst den proteasomalen Abbau von NbWRKY40.

(A) Die Inhibition des 26S Proteasoms führt zu einer Akkumulation von NbWRKY40. NbWRKY40-HA wurde transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. 48 h später wurden infiltrierte Blätter mit 200 µM des Proteasominhibitors MG132 behandelt und Proben wurden zu angegebenen Zeiten genommen. Die NbWRKY40-HA Proteinmengen wurden im Zeitkurs über eine Western Blot Analyse mittels anti-HA Antikörper untersucht (oben: kurze Expositionszeit, unten: lange Expositionszeit). Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (B) NbWRKY40-HA wurde entweder alleine, mit dem Proteasominhibitor MG132 (200 µM für 6 h) oder mit XopS-GFP transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. Die Proteinexpression von NbWRKY40-HA und XopS-GFP wurde mittels Western Blot Analyse über einen anti-GFP oder anti-HA Antikörper detektiert. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (C) Freies GFP (GFP, Kontrolle) oder XopS-GFP wurden transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. 48 h später wurde die relative Proteasomaktivität in hergestellten Proteinextrakten bestimmt indem der Abbau des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC bei 30°C in einem Fluoreszenzspektrometer quantifiziert wurde. Die GFP Kontrolle wurde dabei auf 100% gesetzt. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 5 biologischen Replikaten ± Standardfehler SE. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt. ns = nicht signifikant. (D) Akkumulation von ubiquitiniertem NbWRKY40-GFP in Anwesenheit von MG132 oder XopS. NbWRKY40-GFP wurde transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert und das Protein wurde entweder durch Behandlung mit 200 µM MG132 oder einer Ko-Expression mit XopS-GFP stabilisiert (Input). Anschließend wurde das Protein über seine Affinitätsmarkierung mittels *GFP-Trap*[®] aufgereinigt (IP:GFP). Proteine wurden über eine Western Blot Analyse mit anti-Ubiquitin, anti-GFP oder anti-HA Antikörpern detektiert.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Typ-III Effektoren spielen in der Manipulation pflanzlicher-sowie tierischer Immunantworten eine ausschlaggebende Rolle. Die genaue Aufklärung ihrer Wirkmechanismen ist wichtig um zu verstehen, wie sich Pathogene erfolgreich in ihrem Wirt etablieren können. Darüber hinaus kann die Erforschung von T3Es für die Untersuchung der pflanzlichen Abwehr eine große Stütze sein.

So war es Ziel dieser Arbeit, das Typ-III Effektorprotein XopS aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* näher zu charakterisieren. Zunächst sollte getestet werden, ob XopS auch mit den NbWRKY40 orthologen Proteinen aus Arabidopsis und Paprika interagiert. Im Anschluss sollten weitere Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Inwieweit trägt XopS zur Virulenz von *Xcv* auf suszeptiblen Paprikapflanzen bei und welche Rolle spielt dabei die Interaktion zwischen XopS und WRKY40?
2. Ist der mit XopS interagierende TF WRKY40 aus Paprika ein Negativregulator pflanzlicher Immunantworten?
3. Gibt es weitere *in planta* Interaktionspartner von XopS die für die Interaktion mit WRKY40 wichtig sind bzw. Aufschluss über seinen Wirkmechanismus geben könnten?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen VWR International GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Hycultec GmbH (Bernsdorf), Agilent Technologies GmbH & Co. KG (Waldbronn), Merck Chemicals GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Schnelldorf), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), GE Healthcare (Freiburg), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Eppendorf GmbH (Wesseling-Berzdorf), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht), BioRad Laboratories (München), Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (NEB) GmbH (Frankfurt am Main), Thermo Fisher Scientific (Bonn) und Solis BioDyne (Tartu, Estland) bezogen.

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten und die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurden entsprechende Kits der Firma Quiagen GmbH (Hilden) verwendet.

2.1.2. Oligonukleotide und DNA-Sequenzierung

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen) synthetisiert und sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 im Anhang aufgelistet. Sequenzierungen wurden von den Firmen LGC Genomics GmbH (Berlin) und Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg) durchgeführt.

2.1.3. Vektoren und Plasmide

Zu Klonierungszwecken wurden Vektoren verwendet, die in Tabelle 6.3 im Anhang aufgelistet sind. Alle der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten oder verwendeten Plasmide sind in Tabelle 6.4 im Anhang aufgeführt.

2.1.4. Antikörper

Für die Immundetektion rekombinanter Proteine wurden in der Tabelle 2.1 aufgeführte Antikörper verwendet.

Tabelle 2.1 Antikörper.

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFP-HRP (B-2), monoklonal	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-HA-HRP (3F10), monoklonal	Ratte	1:500	Roche, Mannheim
Anti-myc, polyklonal	Kaninchen	1:1000	Abcam, Berlin
Anti-MBP, monoklonal	Maus	1:10000	NEB, Frankfurt am Main
Anti-GST-HRP (B-14), monoklonal	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Ubiquitin-HRP (P4D1), monoklonal	Maus	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
ImmunoPure® Ziege-anti Kaninchen-HRP	Ziege	1:10000	Thermo Fisher Scientific, Bonn
ImmunoPure® Ziege-anti Maus-HRP	Ziege	1:10000	Thermo Fisher Scientific, Bonn

HRP steht für *Horseradish peroxidase*, das heißt, dass die entsprechenden Antikörper für die Immundetektion mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt waren.

2.1.5. Nährmedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Nährmedien zur Anzucht von Pflanze, Bakterien und Hefen verwendet.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

Nährmedium	Organismus	Zusammensetzung
½ MS	<i>Arabidopsis</i>	2.2 g/L MS (Murashige-Skoog)-Salz, 500 mg/L MES, 10 g/L Saccharose, pH 5.7 mit KOH einstellen; bei Festmedium Zugabe von 0.8% (w/v) Pflanzenagar
Luria-Bertani (LB)	<i>E. coli</i>	10 g/L Bacto-Trypton, 10 g/L NaCl, 0.2 g/L 1 N NaOH, 5 g/L Hefeextrakt
YEB	<i>A. tumefaciens</i>	5 g/L Bacto-Trypton, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Bacto-Rinderextrakt, 5 g/L Saccharose, 2 mM MgSO ₄
King's B	<i>PstΔhrcC</i> und <i>Xcv</i>	20 g/L Glycerin, 40 g/L Pepton (aus Casein), 10 mL/L 10% (w/v) K ₂ HPO ₄ , 10 mL/L 10% (w/v) MgSO ₂
YPAD	<i>S. cerevisiae</i>	10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton (aus Casein), 20 g/L Glucose, 100 mg/L Adeninhemisulfat
SCAD	<i>S. cerevisiae</i>	20 g/L Glucose 6.7 g/L Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren), 0.67 g/L Aminosäuremix, pH 5.8 mit NaOH einstellen

Zur Herstellung von Festmedien, die zur Anzucht von Bakterien oder Hefen dienen, wurden dem jeweiligen Flüssigmedium 15 g/L Agar-Agar zugesetzt.

Nährmedien wurden zur Sterilisation für 20 min bei 120°C autoklaviert. Das SCAD Medium wurde lediglich 10 min bei 120°C autoklaviert. Zur Selektion von Bakterien wurden entsprechende Antibiotika (Tabelle 2.1) dem Nährmedium nach Abkühlen auf ca. 50°C zugegeben. Zur Pflanzenselektion wurden dem ½ MS Medium 20 µg/mL HygromycinB (Stammlösung 50 mg/mL) zugefügt.

Zur Herstellung von SCAD Selektionsmedien wurde ein Aminosäuremix (Tabelle 2.3) ohne die entsprechende Aminosäure verwendet.

Tabelle 2.3 Mengen der Aminosäuren zur Herstellung von SCAD Selektionsmedium.

Aminosäure		Aminosäure	
2.0 g	Adeninhemisulfat	2.0 g	Myo-Inositol
0.2 g	p-Aminobenzoesäure	3.0 g	Phenylalanin
2.0 g	Arginin-HCl	2.0 g	Serin
2.0 g	Histidin-HCl	2.0 g	Threonin
2.0 g	Isoleucin	3.0 g	Tryptophan
4.0 g	Leucin	2.0 g	Tyrosin
2.0 g	Lysin-HCl	1.2 g	Uracil
2.0 g	Methionin	9.0 g	Valin

2.1.6. Antibiotika

Zur Selektion von Bakterien wurden in Tabelle 2.4 angegebene Antibiotika eingesetzt.

Tabelle 2.4 Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Eingesetzte Konzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/mL	200 µg/mL
Kanamycin (Kan)	50 mg/mL	50 µg/mL
Spectinomycin (Spec)	50 mg/mL	50 µg/mL
Streptomycin (Strep)	10 mg/mL	20 µg/mL
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/mL	30 µg/mL
Gentamycin (Gent)	15 mg/mL	15 µg/mL
Rifampicin (Rif)	50 mg/mL	50 µg/mL (100 µg/mL zur Selektion von <i>Xcv</i>)

Alle Antibiotika bis auf Cam und Rif wurden in sterilem ddH₂O gelöst. Cam und Rif wurden in 100% Ethanol gelöst. Nach dem Lösen wurden die Antibiotika sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

2.1.7. Bakterien-und Hefestämme

Für die hier vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 2.5 angeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 2.5 Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL(Str^R)</i> <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen™, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DH5α™	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen™, Karlsruhe
<i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dem</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^R)	Merck, Darmstadt
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Rif ^R mit Helferplasmid pGV2260 (Amp ^R)	Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974; Deblaere <i>et al.</i> , 1985
<i>Pst</i> Δ <i>hrcC</i>	Deletionsmutante <i>hrcC</i> in <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 ; T3SS defizient	Zur Verfügung gestellt von Dr. Suayb Üstün (ZMBP Tübingen)
<i>Xcv</i> 85-10	Wildtyp; (Rif ^R)	Bonas <i>et al.</i> , 1989
<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>hrpF</i>	<i>hrpF</i> -Verlustmutante; (Rif ^R)	Rossier <i>et al.</i> , 2000
<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopS</i>	<i>xopS</i> -Verlustmutante; (Rif ^R)	Dr. Suayb Üstün (ZMBP Tübingen)
<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>xopS/XopS-HA</i>	<i>xopS</i> -Verlustmutante mit pBBR1-MCS-5- <i>XopS-HA</i> ; (Rif ^R)	Dr. Sophia Sonnewald (Friedrich-Alexander Universität Erlangen)

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Analysen sowie für den Transaktivierungs-Assay in Hefe wurde der in Tabelle 2.6 aufgeführte Stamm verwendet.

Tabelle 2.6 Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>S. cerevisiae</i> Y190	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, gal80, cyhr 2, LYS2::GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3, URA3::GAL1uas- GAL1TATA -lacZ</i>	Flick & Johnston, 1990; Harper <i>et al.</i> , 1993

2.1.8. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden Experimente an *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), *Nicotiana benthamiana* Wildtyp, *Nicotiana benthamiana roq1* Mutanten und *Capsicum annuum* ECW (*C. annuum*, Paprika) durchgeführt.

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis Samen (Col-0 Wildtyp und XopS-GFP in Col-0) wurden zur Sterilisation zweimal mit 70% (v/v) Ethanol + 0.05% (v/v) Tween-20 behandelt und nach dem Trocknen auf Fruhstorfer Erde Typ P ausgelegt. Alternativ wurden Samen für 4 h mit Chlorgas (100 mL Natriumchlorid + 5 mL HCl) unter einem Exsikkator behandelt um anschließend auf Erde oder ½ MS Medium ausgelegt zu werden. Sterilisierte Samen wurden einer Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln für drei Tage unterzogen und danach in den Anzuchtschrank überführt. Arabidopsis Keimlinge wurden ca. 10-14 Tage nach Aussaat in eine Erdmischung (65% Fruhstorfer Erde Typ P, 25% Sand, 10% Perlit) pickiert und unter folgenden Bedingungen angezogen: 8 h Licht : 16 h Dunkelheit (22°C : 18°C) bei 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 70% relative Luftfeuchtigkeit. Zur Samengenerierung wurden Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht : 8 h Dunkelheit) mit 22°C : 18°C, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 70% relativer Luftfeuchtigkeit im Percival Anzuchtschrank (AR-95L3; CLF PlantClimatics GmbH, Wertingen) kultiviert.

Nicotiana benthamiana

N. benthamiana Pflanzen wurden auf Erde (Fruhstorfer Erde Typ T, Fa. Hawita, Vechta; mit 10% Sand) unter folgenden kontrollierten Bedingungen in begehbaren Wachstumskammern angezogen: 16 h Licht : 8 h Dunkelheit (25°C : 20°C) bei 240-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 75% relative Luftfeuchtigkeit. Die in dieser Arbeit verwendete *N. benthamiana roq1* Mutante wurde freundlicherweise von Dr. Johannes Stuttmann (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Capsicum annuum

Paprika Samen des Kultivars *Early Cal Wonder* (ECW) wurden zunächst zum Quellen über Nacht in Wasser eingelegt. Anschließend wurden die Samen mit 70% (v/v) Ethanol + 0.05% (v/v) Tween-20 sterilisiert und nach dem Waschen mit sterilem ddH₂O auf Erde (Fruhstorfer Erde Typ P) ausgelegt. Zehn Tage nach Aussaat wurden Keimlinge in Fruhstorfer Erde Typ P pickiert und ca. 1-2 Wochen später in Fruhstorfer Erde Typ T mit 10% Sand umgetopft. Die Pflanzen wurden unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie *N. benthamiana* kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Pflanzen mit Nährlösung (0.1% (v/v) Wuxal, Aglukon Spezialdünger GmbH, Düsseldorf) gedüngt.

2.2. Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten oder etablierten Methoden beschrieben.

2.2.1. Pflanzentransformation

2.2.1.1. Stabile Transformation von Arabidopsis

Zur Herstellung der stabilen β -Estradiol induzierbaren XopS-GFP Arabidopsis Pflanzen wurde die *floral dip* Methode (Clough & Bent, 1998) angewendet. Dazu wurde der offene Leserahmen von *XopS* über die in Abschnitt 2.2.3.2 beschriebene Gateway[®]-Klonierungsmethode in den Vektor pAB117 (von pABindGFP, Bleckmann *et al.*, 2010) kloniert. Das Konstrukt wurde anschließend in *A. tumefaciens* C58C1 transformiert. Transformierte Agrobakterien wurden in 250 mL YEB (mit entsprechendem Antibiotikum) Flüssigmedium über Nacht bei 28°C angezogen und danach in ein hohes Becherglas überführt, wobei die Agrobaktériensuspension mit 5% (w/v) Saccharose und 0.05% (v/v) Silwet L-77 (Helena Chemical Company, USA) versetzt wurde. Blühorgane von Arabidopsis Wildtyp Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) wurden für ca. 30 Sekunden unter leichtem Schwenken in die Agrobaktériensuspension getaucht und anschließend über Nacht mit einem Plastikbeutel bedeckt und dunkel gestellt. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen wieder in den Anzuchtschrank transferiert und unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife weiter kultiviert. Um den Verlust reifer Schoten zu vermeiden, wurden oberirdische Pflanzenteile im fortgeschrittenen Reifestadium mit einer Papiertüte bedeckt. Sobald die Pflanzen vollständig ausgetrocknet waren, wurden Samen der transformierten Pflanzen geerntet, sterilisiert und zur Selektion auf ½ MS Agarplatten mit 20 µg/mL HygromycinB ausgelegt. Transformaten der Generation T0 wurden bis in die homozygote T3 Generation weitergezogen und die Expression des Transgens *XopS-GFP* wurde durch Besprühen mit einer 50 µM β -Estradiol + 0.1% (v/v) Tween-20 Lösung induziert und mittels angeschlossener RT-PCR (Abschnitt 2.2.3.5) und Western Blot Analyse (Abschnitt 2.2.4.6) verifiziert. Kontrollpflanzen wurden dabei mit 0.1% (v/v) Ethanol in ddH₂O + 0.1% (v/v) Tween-20 besprüht.

2.2.1.2. Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Für die transiente Expression von Proteinen wurden gewünschte klonierte binäre Konstrukte in *A. tumefaciens* C58C1 transformiert und auf YEB (mit entsprechenden Antibiotika) Agarplatten selektioniert. Transformierte Agrobakterien wurden in 50 mL YEB Flüssigmedium mit Antibiotika angeimpft und bei 28°C und 180 rpm über Nacht im Schüttelinkubator angezogen. Die Übernachtskulturen wurden bei 2500 rcf für 20 min abzentrifugiert und in 20 mL Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.7, 200 µM Acetosyringon) resuspendiert. Die Agrobaktériensuspension wurde vor der Infiltration für ca. 2 h im Dunkeln in einem Überkopffroller inkubiert. Im Anschluss wurde die OD₆₀₀ der Suspensionen bestimmt und auf OD₆₀₀ = 0.5 eingestellt. Agrobakterien die mit dem *silencing*-Inhibitor P19 transformiert worden waren, wurden mit OD₆₀₀ = 0.3 ko-infiltriert. Die Bakteriensuspensionen wurden mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseite von *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert und infiltrierte Pflanzen wurden bis zur Probennahme in der begehbaren Wachstumskammer unter reduzierten Lichtverhältnissen kultiviert.

2.2.1.3. Virus-induzierte Genstilllegung (VIGS) in Paprika und *N. benthamiana*

Die hier verwendete Methode zur zielgerichteten Herunterregulierung der Genexpression eines gewünschten Gens wurde in Anlehnung an Liu *et al.* (2002) und Üstün *et al.* (2013) angepasst (Liu *et al.*, 2002; Üstün *et al.*, 2013). Dabei wird eine kurze Sequenz (ca. 300-600 bp) des Zielgens in den Vektor pTRV2 (TRV von *tobacco rattle virus*, Tabak-Mauchevirus) kloniert. Bei einer Ko-Transformation des generierten Konstrukts mit dem Helferplasmid pTRV1 über Agrobakterien-Infiltration in Pflanzenzellen ist der Virus in der Lage zu assemblieren und sich zu replizieren. Dies wird von der Pflanze erkannt, wodurch die sogenannte Posttranskriptionelle Genstilllegung (PTGS) eingeleitet wird um die viralen Partikel abzuwehren. Weil die Pflanze die in pTRV2 klonierte cDNA des Zielgens nicht von der endogenen mRNA unterscheiden kann, wird auch diese von der Pflanzenzelle abgebaut. Dies führt dazu, dass die Translation des Zielgens ausbleibt.

Für VIGS in Paprika wurden mit pTRV1, pYL279-*secGFP*, pTRV2-*CaWRKY40a*, oder pTRV2-*CaUBP12* transformierte Agrobakterien Stämme in 50 mL YEB Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 28°C und 180 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Agrobakterien transformiert mit pTRV1 wurden mit Agrobakterien die das für den jeweiligen Versuch gewünschte pTRV2-Konstrukt enthielten bei einer OD₆₀₀ = 1 im Verhältnis 1:1 mit einer nadellosen Spritze in Keimblätter von 10 Tage alten Paprika Pflanzen infiltriert.

Da die Erfolgsrate für VIGS in Paprika gering ist wurden für jedes Experiment 10 Pflanzen mit dem Kontrollkonstrukt pYL279-*secGFP* (pTRV2-*GFP*) und 50 Pflanzen mit pTRV2-*CaWRKY40a* oder pTRV2-*CaUBP12* infiltrierte. Für VIGS in *N. benthamiana* wurden Agrobakterien-Stämme mit dem pTRV1 Vektor und dem pYL156 (pTRV2) Leervektor oder pTRV2-*NbWRKY40* bzw. pTRV2-*NbUBP12* mit einer $OD_{600} = 1$ im Verhältnis 1:1 mit einer nadellosen Spritze in Kotyledonen von *N. benthamiana* Pflanzen die das vierte Blattstadium erreicht hatten (ca. zwei Wochen alt) infiltrierte. Hier wurden für jedes Experiment 10 Pflanzen mit dem Kontrollkonstrukt pTRV2 oder pTRV2-*GFP* und 30 Pflanzen mit pTRV2-*NbWRKY40* oder pTRV2-*NbUBP12* infiltrierte.

Nach der Infiltration wurden die Pflanzen in den begehbaren Wachstumskammern für 56 h in Dunkelheit und anschließend unter den herkömmlichen Wachstumsbedingungen (Abschnitt 2.1.8) kultiviert. Die mRNA Level der entsprechenden Zielgene wurden ca. zwei bis drei Wochen nach Agrobakterien-Infiltration über qRT-PCR (Abschnitt 2.2.3.6) quantifiziert. Zur Bestimmung der mRNA Menge von *WRKY40* wurde je ein Blatt pro Pflanze abgetrennt, in eine mit Wasser benetzte Petrischale gelegt und mit 5 mM Salicylsäure (SA) besprüht um die *WRKY40* Genexpression zu induzieren. Die gemessene mRNA Menge des jeweiligen Zielgens in pTRV2-Zielgen Pflanzen wurde jener in pTRV2-Kontrollpflanzen (pTRV2-*GFP* oder pTRV2) gegenübergestellt.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Anzucht und Transformation von Bakterien

E. coli

Bei allen der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme handelt es sich um chemisch-kompetente Zellen. Zur Transformation von Plasmiden wurde 1 μ L der Plasmid-DNA einem 50 μ L Aliquot auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen beigemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem ein-minütigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen, bevor sie direkt danach für weitere zwei Minuten auf Eis gelagert wurden. Zur Regeneration wurde den transformierten Zellen 800 μ L LB Flüssigmedium (ohne Antibiotikum) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation im Überkopffroller bei 37°C für 1h. Im Anschluss wurden die Suspensionen bei 3500 rcf für 1 min zentrifugiert, die Zellen wurden im Rückfluss resuspendiert und zur Selektion auf LB Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C.

A. tumefaciens

Der hier verwendete Agrobakterien Stamm C58C1 ist wie die *E. coli* Stämme auch chemisch kompetent. Zur Transformation wurden 5 µL zu 100 µL auf Eis aufgetauten *A. tumefaciens* C58C1 Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min, anschließend eine Inkubation in flüssigem Stickstoff für weitere 5 min und letztlich der fünf-minütige Hitzeschock bei 37°C. Danach wurden die transformierten Zellen mit 1 mL YEB Flüssigmedium (ohne Antibiotikum) versetzt und für ca. 4h bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Nach der Regeneration wurden die Suspensionen bei 3500 rcf für 1 min zentrifugiert, die Zellen im Rückfluss resuspendiert und zur Selektion auf YEB Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 28°C.

2.2.2.2. Anzucht und Transformation von *S. cerevisiae*

Der hier verwendete *S. cerevisiae* Reporterstamm Y190 wurde grundsätzlich vor der Transformation auf YPAD Vollmedium bei 30°C angezogen. Gewünschte Plasmide wurden über die Lithiumacetat/Einzelstrang-DNA/PEG-Methode transformiert (Schiestl & Gietz, 1989; Gietz *et al.*, 1992). Dabei wurden die zwei auf eine direkte Interaktion zu untersuchenden Proteine in entsprechende Vektoren (pGAD424 bzw. pGBT9) kloniert und in Y190 ko-transformiert. Die Selektion von Transformanten erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Hefezellen auf SCAD Medium ohne Zusatz der Aminosäuren Leu (Leu⁻, Selektion auf das Beuteplasmid) und Trp (Trp⁻, Selektion auf das Köderplasmid), die in diesem Fall als Auxotrophiemarker dienten. Zwei bis drei Tage nach Inkubation der Platten bei 30°C wurden die Transformanten auf SCAD Leu⁻, Trp⁻ und His⁻ Mangelmedium, das mit 25 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) versetzt worden war, umgestrichen. Das 3-AT dient hierbei als kompetitiver Inhibitor des *HIS3* Gens, was eine fälschliche Selektion von nicht-positiven Klonen minimieren soll (Klopotowski & Wiater, 1965; Struhl & Davis, 1977). Ein Wachstum der Transformanten auf SCAD Leu⁻, Trp⁻ und His⁻ Mangelmedium zeigt die Aktivierung des *HIS3* Reportergens und somit eine direkte Interaktion zwischen den getesteten Proteinen an. Zusätzlich dazu wurde die Expression eines zweiten Reportergens, *lacZ*, über den sogenannten *LacZ-Filterlift-Assay* untersucht (Breedon & Nasmyth, 1985).

2.2.2.3. Hefe Transaktivierungs-Assay

Die für diesen Versuch verwendeten WRKY Proteine (*NbWRKY40*, *CaWRKY40a* und *NbWRKY8*) wurden in den pGBT9 (N-terminale GAL4 DNA Bindedomäne) Vektor kloniert und einzeln in den Hefe Reporterstamm Y190 transformiert.

Transformanten wurden auf SCAD Trp⁻ Platten selektioniert und anschließend auf SCAD Trp⁻ und His⁻ Mangelmedium, welches 10 mM 3-AT enthielt, überimpft. Drei Tage später wurde das Wachstum auf Trp⁻, His⁻ Mangelmedium auf die Expression des *HIS3* Reportergens getestet. Zusätzlich dazu wurde der *LacZ-Filterlift-Assay* zur Untersuchung der *LacZ* Reportergen-Aktivität durchgeführt. Der pGBT9 Leervektor wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das Plasmid pGAL4, welches GAL4 in seiner Volllänge enthält. Die Hefezellen wurden während des gesamten Experiments bei 30°C kultiviert.

2.2.2.4. Infektion von Pflanzen mit *Xcv* und *PstΔhrcC*

Infektion von *Arabidopsis* mit *PstΔhrcC*

Für Infektionsexperimente in *Arabidopsis* wurden sechs Wochen alte Pflanzen mit dem T3SS-defizienten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *PstΔhrcC* infiziert. Dazu wurden die Bakterien von King's B Platten in 50 mL King's B Flüssigmedium mit Rif (1:1000) überimpft und über Nacht bei 28°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde die Übernachtskultur bei 2500 rcf für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30 mL 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde auf 0.00002 (1×10⁴ CFU mL⁻¹) eingestellt und Bakteriensuspensionen wurden mit einer 1 mL nadellosen Spritze in die Blattunterseiten von je drei Blättern pro Pflanze infiltriert. Für physiologische Analysen (Abschnitt 2.2.4) wurde frisches Blattmaterial zu angegebenen Zeiten in sterilem 10 mM MgCl₂ geerntet. Wurde Blattmaterial zur RNA Extraktion, Hormonextraktion oder für Western Blot Analysen geerntet, wurde dieses zu entsprechenden Zeitpunkten direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Infektion von Paprika und *N. benthamiana roq1* mit *Xcv*

Für Infektionsexperimente in Paprika oder *N. benthamiana* wurden ca. vier bis fünf Wochen alte Pflanzen mit entsprechenden *Xcv* Stämmen infiziert. *Xcv* wurde auf King's B Agarplatten mit Rif (1:500) kultiviert und vor der Infektion in 50 mL King's B Flüssigmedium mit Rif (1:500) über Nacht bei 28°C und 180 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 2500 rcf für 20 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 30 mL 10 mM MgCl₂ gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 2500 rcf für 20 min wurde das Pellet in 10-20 mL 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Je nach Experiment wurden verschiedene Bakteriendichten mit einer 1 mL nadellosen Spritze in die Blattunterseite der Pflanzen infiltriert. Für die *in planta* Bestimmung der Bakterientiter über Druckinfiltration in Paprika wurde eine Bakteriensuspension mit eingestellter OD₆₀₀ von

0.0001 (1×10^5 CFU mL⁻¹) infiltriert. *N. benthamiana* Pflanzen wurden dafür mit einer Suspension die eine Bakteriendichte von OD₆₀₀ = 0.0004 (4×10^5 CFU mL⁻¹) enthielt, infiziert. Für molekularbiologische Analysen wurden die jeweiligen Stämme mit OD₆₀₀ = 0.2 (1×10^8 CFU mL⁻¹) in die Blattunterseiten der Pflanzen injiziert. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte analog zu der für Infektionsexperimente in Arabidopsis beschriebenen Probennahme.

Dip-Inokulation von Paprika mit Xcv

Für Dip-Inokulationsexperimente von *Xcv* Stämmen auf Paprika Blättern wurden ca. vier bis fünf Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Bakteriensuspensionen wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Für die *in planta* Bestimmung der Bakterientiter wurde eine Bakteriensuspension mit eingestellter OD₆₀₀ von 0.2 (1×10^8 CFU mL⁻¹) vorbereitet, die mit 0.02% (v/v) Silwet-L77 (Helena Chemical Company) versetzt wurde. Von jedem Stamm wurden 200 mL Suspension angesetzt und in ein hohes Becherglas überführt. Ein Blatt pro Pflanze wurde für 1 min vollständig in die jeweilige Bakteriensuspension getaucht. Inokulierte Blätter wurden anschließend mit kleinen, mit Wasser benetzten, Plastikbeuteln bedeckt um eine Luftfeuchtigkeit von 100% zu gewährleisten. Diese wurden nach 24 h wieder abgenommen. Die Bestimmung der Bakterientiter erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.8 beschrieben.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden wie beispielsweise die Amplifikation von DNA Fragmenten über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), das Schneiden von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen, deren Verknüpfung mittels Ligasen oder das Auftrennen von Nukleinsäuren über Agarose-Gelelektrophorese wurden nach Mülhardt (2009) durchgeführt (Mülhardt, 2009).

2.2.3.1. Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden transformierte *E. coli* Zellen in 2 mL LB Flüssigkultur mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C im Überkopffroller angezogen. Übernachtskulturen wurden bei 16000 rcf für 1 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL Lösung 1 (50 mM Tris-HCL pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 µg/mL RNase A) gelöst. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200 µL Lösung 2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS). Nach dem Vortexen wurde die Reaktion mit der Zugabe von 150 µL Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 4.8) durch invertieren des Reaktionsgefäßes gestoppt. Es folgte ein zehn-minütiges Zentrifugieren der Proben bei 16000 rcf, wonach der DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Durch Zugabe von 1 mL 100% Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 16000 rcf für 10 min

wurde das Fällen der DNA erreicht. DNA Pellets wurden in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei 16000 rcf für 5 min zentrifugiert und anschließend bei 42°C für ca. 5 min getrocknet. Letztlich wurden die Pellets in 30 µL TE (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) mit 10 µg/mL RNase A resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.2. Klonierungsstrategien

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden einige der verwendeten Konstrukte über zwei verschiedene Klonierungs-Methoden hergestellt.

Gateway®-Klonierung

Zur Herstellung von Gateway®-kompatiblen 'entry'-Klonen wurde das pENTR™/D-TOPO® Kit der Firma Invitrogen™ verwendet, wobei die Klonierung nach Herstellerangaben erfolgte. Daran angeschlossene L/R Reaktionen zur Klonierung der gewünschten Fragmente in die jeweiligen Zielvektoren wurde mittels des Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen™) durchgeführt, wobei auch hier nach Herstellerangaben vorgegangen wurde.

NEBuilder® HiFi DNA Assembly (NEB)

Die Klonierung von DNA Fragmenten in nicht-Gateway®-kompatible Vektoren erfolgte nach Herstellerangaben des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Reaction Protocol (NEB). Dafür benötigte Primer wurden mithilfe des Online-Tools NEBuilder® Assembly Tool v2.2.7 designt.

2.2.3.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Zum Nachweis von Vollängen-mRNA über verschiedene PCR Methoden erfolgte die RNA Extraktion aus Paprika Blattmaterial nach (Logemann *et al.*, 1987). Die Extraktion von RNA aus Arabidopsis und *N. benthamiana* Blattmaterial wurde mit NucleoZOL (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Konzentrationen der extrahierten RNA wurden über eine spektralphotometrische Analyse im Platten-Reader Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Schweiz) gemessen.

2.2.3.4. DNase Verdau und reverse Transkription der RNA

Um eventuelle verbleibende DNA Reste in den extrahierten RNA Proben zu degradieren wurde je 1 µg RNA mit 1 µL DNase (1 U µL⁻¹) und einfach DNase-Puffer (Thermo Scientific™) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase durch Zugabe von 1 µL 50 mM EDTA, gefolgt von einer Inkubation für 15 min bei 65°C inaktiviert. Die cDNA Synthese aus DNase behandelter RNA erfolgte unter Verwendung von Oligo(dT) Oligonukleotiden als *Primer* und der RevertAid™ Reversen Transcriptase (200 U µL⁻¹) der

Firma Thermo Scientific™. Zusätzlich wurde dem Reaktionsansatz der RNase Inhibitor RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific™) beigemischt. Auch der verwendete dNTP-Mix wurde von Thermo Scientific™ bezogen. Der Reaktionsansatz zur reversen Transkription ist der Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tabelle 2.7 Reaktionsansatz zur cDNA Synthese.

Eingesetzte Menge/Volumina	Komponente
1 µg	RNA
1 µL	Oligo(dT) ₁₈ Primer (50 µM)
2.5 µL	dNTP Mix, 10 mM pro Einzelkomponente
1 µL	Reverse Transcriptase
0.5 µL	RiboLock RNase Inhibitor
ad 10 µL	RNase-freies H ₂ O

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C für 1 h inkubiert, wonach die Enzyme durch Inkubation bei 70°C für 15 min inaktiviert wurden. Für RT-PCR und qRT-PCR Analysen wurde die synthetisierte cDNA 1:10 mit RNase freiem H₂O verdünnt.

2.2.3.5. Semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur Verifizierung der Genexpression des eingebrachten Transgens *XopS-GFP* in stabil transformierten Arabidopsis Linien wurde RNA aus sowohl β-Estradiol induzierten als auch nicht induzierten Blattproben extrahiert und mit der synthetisierten cDNA wurde eine semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurde der in Tabelle 2.8 beschriebene Reaktionsansatz und das gelistete PCR Programm verwendet. Neben der PCR zur Detektion des *XopS* Transkripts mit genspezifischen *Primern*, wurden die gleichen Proben zur Kontrolle einer PCR mit genspezifischen *Primern* auf das Haushaltsgen *AtActin* unterzogen. Eine cDNA Probe aus β-Estradiol behandelten Arabidopsis Col-0 Wildtyp Blattproben diente als zusätzliche Negativkontrolle.

Tabelle 2.8 Reaktionsansatz und PCR Programm für die RT-PCR Analyse.

Eingesetzte Volumina	Komponente	PCR Programm	
4 µL	FIREPol® 5x Master Mix	95°C	5 min
1 µL	cDNA	95°C	30 sec
1 µL	Primer Fw (5 µM)	53°C	30 sec
1 µL	Primer Rv (5 µM)	72°C	60 sec/kb
13 µL	ddH ₂ O	72°C	10 min

2.2.3.6. Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Als Matrize zur Quantifizierung der Transkriptmenge über qRT-PCR eines bestimmten Gens diente eine 1:10 Verdünnung synthetisierter cDNA (Abschnitt 2.2.3.4). Diese wurde mit dem SensiFAST™ SYBR® Lo-Rox Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde) in dem AriaMx Realtime PCR System (Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn) amplifiziert. Die relativen Transkriptmengen von Zielgenen wurden auf die Transkriptmenge des jeweiligen Referenzgens normalisiert. Folgende Referenzgene wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: *CaACTIN*, *CaTUB* (von *Tubulin*), *CaUBI-3* (von *Ubiquitin Conjugating Protein 3*) für qRT-PCR Analysen aus Paprika Blattmaterial, *NbACTIN* für qRT-PCR Analysen aus *N. benthamiana* und *AtUBC9* (von *Ubiquitin Carrier Protein 9*) für qRT-PCR Analysen aus Arabidopsis Blattmaterial. Zudem wurden relative Expressionsunterschiede eines zu untersuchenden Zielgens zwischen den behandelten Proben eines Experiments im Vergleich zu den Kontrollproben (Kalibrator) über die $\Delta\Delta C_q$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). So wird die relative Genexpression eines Zielgens in der behandelten experimentellen Probe hier als n-facher Unterschied zu der relativen Genexpression in den Kalibrator-Proben angegeben. Jede Probe wurde als technisches Duplikat vermessen und für jedes *Primer*-Paar wurde eine Probe mit ddH₂O als Matrize vermessen, welche als Negativkontrolle diente. Die *Primer*-Effizienz wurde über eine Verdünnungsreihe der cDNA und Bestimmung der Steigung über eine Standardkurve berechnet. Der Tabelle 2.9 sind der verwendete Reaktionsansatz sowie das qRT-PCR Programm zu entnehmen.

Tabelle 2.9 Reaktionsansatz und PCR Programm für die zweistufige qRT-PCR Analyse.

Eingesetzte Volumina	Komponente	PCR Programm	
5 μL	SensiFAST™ SYBR® Lo-Rox Mix	95°C	3 min
0.8 μL	Primer Fw (5 μM)	95°C	5 sec
0.8 μL	Primer Rv (5 μM)	60°C	10 sec
1 μL	cDNA (1:10)	95°C	30 sec
3.2 μL	ddH ₂ O	65°C	30 sec
		95°C	30 sec

Im finalen Zyklus wurde die Schmelzkurve von 65°C bis 95°C (0.5°C pro 5 sec) aufgezeichnet, die eventuelle unspezifische Nebenprodukte detektieren sollte. Die relative Quantität (RQ, von *Relative Quantity*) wurde nach der Formel von (Rieu & Powers, 2009) berechnet:

$$RQ = \frac{1}{E^{Cq}}$$

RQ = Relative Quantität

E = Primer-Effizienz (= $10^{-1/\text{Steigung der Standardkurve}}$)

Cq = Jener Zyklus bei welchem das Fluoreszenzsignal eines Transkripts den manuell gesetzten Schwellenwert überschreitet

2.2.4. Biochemische und physiologische Methoden

2.2.4.1. Induktion und Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine aus *E. coli*

Induktion rekombinanter Proteine

Zur Induktion rekombinanter Proteine wurden entsprechende Konstrukte in kompetente *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) pLysS Zellen transformiert. Transformanten wurden in 10 mL LB Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C im Überkopffroller kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden in 500 mL Hauptkultur (LB_{Amp, Cam}) überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator angezogen.

Sobald die gewünschte OD₆₀₀ erreicht worden war, wurden die Hauptkulturen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Die Induktion erfolgte je nach Konstrukt bei 37°C für 3 h oder bei 16°C für ca. 18 h. Im Anschluss wurden die Zellpellets durch Zentrifugation bei 1400 rcf und 4°C für 5 min geerntet und bis zur Proteinaufreinigung bei -20°C gelagert. Die Induktion der Proteinexpression wurde *per* Natriumdodecylsulfat (SDS, von *Sodium-Dodecyl Sulfate*)-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.6) und angeschlossener ca. 20-minütiger Coomassie Färbung mit *InstantBlue® Protein Stain* überprüft.

Aufreinigung rekombinanter Proteine

Alle Schritte der Proteinaufreinigung wurden auf Eis durchgeführt um die Degradation der gereinigten Proteine zu minimieren. Der für die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* notwendige Zellaufschluss wurde durch die Resuspension der Pellets in entsprechenden Lyse Puffern (1 mL pro 50 mL Pellet; Tabelle 2.10), der Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und anschließendem achtmaligem Sonifizieren für je 30 sec bei einer Intensität von 29-33% erreicht. Sonifizierte Lysate wurden bei 1400 rcf und 4°C für 20 min abzentrifugiert und die Überstände wurden auf die mit Lyse Puffer äquilibrierten Matrizen pipettiert.

Für die Aufreinigung MBP-markierter Proteine wurde eine Amylose-Matrix (NEB), und für die Aufreinigung GST-markierter Proteine eine Gluthation Sepharose 4B-Matrix

(GE Healthcare, München) benutzt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 4°C auf dem Überkopffroller wurden die Matrizen durch eine Zentrifugation für 3 min bei 60 rcf pelletiert und die Überstände verworfen. Die Matrizen wurden im Anschluss drei Mal mit je 5 mL des entsprechenden Waschpuffers (Tabelle 2.11) gewaschen. Die Elution der an die Matrizen gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe des Elutionspuffers (Tabelle 2.12) und einer einstündigen Inkubation bei 4°C im Überkopffroller (10 rpm).

Die Matrizen wurden danach erneut durch die Zentrifugation für 3 min bei 60 rcf pelletiert und der Überstand, der nun das eluierte Protein enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Aufreinigungen großer Volumina (z.B. 500 mL Kultur) wurden anstelle von 2 mL Reaktionsgefäßen 20 mL Aufreinigungssäulen (*Econo-Pac® Chromatography Columns*, BioRad) verwendet. Die Aufreinigung His_{6x}-markierter Proteine erfolgte über die Affinitätschromatographie des Äkta™ Start Systems (GE Healthcare, München) nach genauen Herstellerangaben. Die Volumina der verwendeten Puffer wurden bei jedem Experiment auf die Größe der Zellpellets angepasst, wobei man sich an den der Matrizen zugehörigen Herstellerangaben orientierte.

Tabelle 2.10 Puffer zur Lyse der Zellpellets.

MBP-Aufreinigung	GST-Aufreinigung	His _{6x} -Aufreinigung
20 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Natriumphosphat
500 mM NaCl	250 mM NaCl	0.5 M NaCl
20 mM DTT	1 mM EDTA	20 mM Imidazol
1 mM NaF	0.2% (v/v) Triton X-100	pH 7.4
0.1% (v/v) Triton X-100	1 mM DTT	Dieser Puffer fungierte hier auch als Waschpuffer
1:1000 PIC	1:1000 PIC	

PIC = *Protease Inhibitor Cocktail*; Sigma-Aldrich

Tabelle 2.11 Waschpuffer für die Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine.

MBP-Aufreinigung	GST-Aufreinigung	His _{6x} -Aufreinigung
20 mM Tris-HCl pH 8.0	100 mM Tris-HCl pH 8.0	
150 mM NaCl	150 mM NaCl	siehe Lyse Puffer
1 mM DTT	0.2% (v/v) NP-40	
	1:1000 PIC	

Tabelle 2.12 Elutionspuffer für die Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine.

MBP-Aufreinigung	GST-Aufreinigung	His _{6x} -Aufreinigung
20 mM Tris-HCl pH 8.0	100 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Natriumphosphat
150 mM NaCl	20 mM reduziertes Gluthation	0.5 M NaCl
1 mM DTT		500 mM Imidazol
50 mM Maltose		pH 7.4

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung wurden die Eluate einem Puffertausch über *Amicon*[®] *Ultra* Größenausschluss-Filter (Merck, Darmstadt) unterzogen, welcher gleichzeitig auch eine Aufkonzentration ermöglichte. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Der dafür verwendete Puffer wurde immer frisch angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten: 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 mM EDTA, 5 mM DTE, 0.4 mM PMSF und 10% (v/v) Glycerin. Die Konzentration aufgereinigter Proteine wurde bestimmt bzw. geschätzt, indem ein bestimmtes Volumen des jeweiligen Eluats neben einer BSA Standardreihe zum Vergleich auf ein SDS Gel aufgetragen wurde und die Proteine anschließend mit dem Coomassie Farbstoff *InstantBlue*[®] *Protein Stain* irreversibel angefärbt wurden. Aufgereinigte Proteine wurden bei -80°C gelagert.

2.2.4.2. *In vitro* Ubiquitinierungs-Assay

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay ist an die Methode von Furlan und Trujillo (2017) angelehnt (Furlan & Trujillo, 2017). Die dafür benötigten enzymatischen Komponenten *AtUBA1* (E1-aktivierendes Enzym), *AtUBC8* (E2-konjugierendes Enzym), *AtUBC35* (E2-konjugierendes Enzym) und alle verwendeten putativen E3 Ligasen (*XopS*, *XopL* und *NbBRG2*) wurden dafür in entsprechende *E. coli* Expressionsvektoren kloniert als rekombinante Proteine über ihre Affinitätsmarkierung wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben aufgereinigt. Das humane E2-konjugierende Enzym *UbcH5b* wurde käuflich erworben (Artikelnr. BML-UW9060-0100; Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach). Zur Analyse der Enzymaktivität putativer E3 Ligasen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.6 mM DTT, 2 mM ATP, 2 µg Ubiquitin (His_{6x}-markiert, Artikelnr. U-530; Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt), 0.2 µg E1, 1.2 µg E2 und 2 µg E3. Diese Komponenten wurden in einem 30 µL Ansatz vereint und für 2h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 4x Laemmli-Ladepuffer (400 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4 M DTT, 40% (v/v) Glycerin, 6 mM Bromphenolblau und 8% (w/v) SDS) und dem Aufkochen bei 95°C für 5 min abgestoppt.

Als Kontrollreaktionen wurde jeweils eine essentielle Komponente (E1, E3 oder ATP) aus dem Reaktionsansatz ausgeschlossen. Nach der Denaturierung der Proben, die durch das Aufkochen bei 95°C gewährleistet wurde, wurden diese über eine SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.6) aufgetrennt und die Aktivität der Enzyme wurde über eine Western Blot Analyse (Abschnitt 2.2.4.6) mit entsprechenden Antikörpern untersucht.

Dadurch sollte angezeigt werden ob die untersuchte putative E3 Ligase in der Lage war, in Anwesenheit aller notwendigen Komponenten Polyubiquitinketten zu generieren.

2.2.4.3. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Proteinextraktion wurde, falls nicht anders angegeben, ausschließlich gefrorenes Blattmaterial verwendet. Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und dem homogenisierten Blattmaterial wurde das doppelte Volumen an Proteinextraktionspuffer (v/w) zugegeben. Der Proteinextraktionspuffer setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM DTT und 1:1000 PIC.

Die in Proteinextraktionspuffer auf Eis aufgetauten Proben wurden weitere 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 16000 rcf und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand, der nun alle löslichen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1x Laemmli Puffer versetzt. Nach einer Denaturierung der Proben bei 95°C für 5 min konnten diese über die SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.6) aufgetrennt und *per* Western Blot Analyse (Abschnitt 2.2.4.6) untersucht werden. Zu *in planta* Ko-Immunopräzipitations-Zwecken (Abschnitt 2.2.4.4) wurden die Überstände nicht mit 1x Laemmli Puffer versetzt, sondern bis zur direkt angeschlossenen Weiterverarbeitung auf Eis gehalten.

2.2.4.4. Ko-Immunopräzipitation von Proteinen über *GFP-Trap*[®]

Zur Untersuchung von *in planta* Protein-Protein Interaktionen über Ko-IP, sowie für die durchgeführte IP-MS Analyse wurden Proteine aus 2 g Pflanzenmaterial mit 4 mL Pflanzenextraktionspuffer, über die in Abschnitt 2.2.4.3 beschriebene Methode, extrahiert. Die *GFP-Trap*[®] zur Immunopräzipitation GFP-markierter Proteine wurde nach Herstellerprotokoll (*GFP-Trap*[®]_M, Chromotek GmbH, Planegg-Martinsried) durchgeführt.

2.2.4.5. Immunopräzipitation-Massenspektrometrie (IP-MS)

Die zur Identifikation potentieller weiterer *in planta* Interaktionspartner von XopS und NbWRKY40 und post-translationaler Modifikationen (PTMs) verwendete IP-MS Methode

wurde in Kooperation mit dem ZMBP und dem IFIZ Tübingen (Dr. Suayb Üstün am ZMBP und Abteilung für Quantitative Proteomik am IFIZ) durchgeführt.

GFP-markierte Proteine wurden dafür transient in *N. benthamiana* exprimiert und jeweils in biologischen Triplikaten über *GFP-Trap*[®] aufgereinigt. Die Eluate wurden mit Laemmli Puffer versetzt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die weiterführende Analyse wurde vom Kooperationspartner in der Abteilung für Quantitative Proteomik übernommen und ist hier deshalb nur kurz beschrieben. Die Eluate wurden über eine kurze SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, gefolgt von einem in-Gel tryptischen Verdau. Die LC-MS/MS Analyse erfolgte in einem Easy-nLC 1200 Nano-HPLC-Chromatographen (Thermo Scientific[™]), der an ein QExactive HF-X Massenspektrometer (Thermo Scientific[™]) angeschlossen war (Methode: 90 min, Top07, HCD). Die Daten wurden mittels MaxQuant Software vs. 1.5.2.8 analysiert und die FDR (von *False Discovery Rate*) wurde auf 1% gesetzt.

2.2.4.6. Proteingelelektrophorese und Western Blot Analyse

Proteingelelektrophorese

Proteine wurden, falls nicht anders angegeben, über eine SDS-PAGE (von *Sodium-Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gel Electrophoresis*) aufgetrennt. Die Komposition der dafür verwendeten Gele (12% Polyacrylamid) ist in Tabelle 2.13 aufgelistet.

Tabelle 2.13 Komposition der hergestellten SDS-PAGE Gele (Mengenangabe für 1 Gel).

Komponente	Trenngel	Sammegel
Acrylamid/Bisacrylamid (30% : 0.8%)	7.5 mL	1.25 mL
3 M Tris-HCl pH 8.8	2.25 mL	-
1 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.25 mL
10% (w/v) SDS	180 µL	100 µL
10% (w/v) APS	135 µL	50 µL
TEMED	9 µL	5 µL
ddH ₂ O	7.9 mL	3.6 mL

Zur Auftrennung von Proteinen wurde bis zum Durchlaufen des Sammelgels eine Spannung von 80 V angelegt, wonach diese graduell bis auf 160 V hochgestellt wurde. Für *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays wurden kommerziell erworbene 4-15% SDS-Gradientengele (BioRad) verwendet.

Western Blot Analyse

Proteine wurden, falls nicht anders angegeben, über die *Semi-Dry* Western Blot Methode von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham™) übertragen. Dazu wurde das System von Biometra (Jena Analytics) verwendet.

Die Membran wurde zunächst, genauso wie das verwendete Whatman-Papier welches Membran und SDS-Gel umschließen sollte, in 1x Transferpuffer (48 mM Tris-HCl pH 8.2, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Das *Blotten* erfolgte bei 60 mA (1 mA/cm²) für 90 min. Für *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays wurden Proteine unter Verwendung eines kommerziell erworbenen Transferpuffers (BioRad) mit dem Trans-Blot Turbo-System (BioRad) auf eine PVDF Membran (BioRad) übertragen. Der Transfer erfolgte nach Herstellerangaben.

Nachdem der Proteintransfer vollzogen war, wurde die Membran für 1 h oder vorzugsweise über Nacht in Blockierlösung, bestehend aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20), inkubiert. Danach wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen, gefolgt von der einstündigen Inkubation mit entsprechenden Antikörpern (in 1% (w/v) Milchpulver in TBS-T). Die Membran wurde vor der Antikörper-Detektion drei Mal für 5 min mit TBS-T und 2 Mal für 5 min mit TBS gewaschen. Das HRP-vermittelte, antikörperspezifische Chemilumineszenzsignal wurde mit dem kommerziell erworbenen *Clarity Western ECL* Substrat (BioRad) im *ChemiDoc™ Imager* (BioRad) detektiert.

2.2.4.7. Elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Analyse (EMSA)

Um die Bindung von Proteinen an DNA Fragmente zu untersuchen wurde eine EMSA (von *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)-Analyse durchgeführt. DNA-Bindereaktionen erfolgten dabei in 25 mM HEPES-KOH pH 7.6, 40 mM KCl, 1 mM DTT und 10% (v/v) Glycerin. 50 ng Cy5-markierter Sonde wurden mit entsprechenden aus *E. coli* aufgereinigten rekombinanten Proteinen in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sonden für putative MBP-*CaWRKY40a* Zielgene (*CaJAZ8* und *CaPR4*) bestanden jeweils aus zwei prognostizierten W-Boxen enthaltenden 150 bp Fragmenten jeweiliger Promotorregionen und wurden mit Cy5-markierten *Primern* über eine konventionelle PCR amplifiziert, auf ein Agarosegel aufgetragen und daraus aufgereinigt. Als Kompetitor DNA wurden die gleichen Fragmente mit nicht-markierten *Primern* auf dieselbe Weise generiert und in einer 50-fachen Konzentration, wenn verglichen zur Konzentration der markierten Sonde, dem entsprechenden Reaktionsansatz zugefügt. Die *Primer* Sequenzen zur Herstellung der Sonden sind in Tabelle 6.2 im Anhang gelistet.

1x Orange-G Puffer (0.25% (w/v) Orange-G, 30% (v/v) Glycerin) wurde als Ladepuffer verwendet. Die Migration der DNA-Proteinkomplexe erfolgte in einem 5% nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel (BioRad) bei 100 V für 1 h. Die Detektion der fluoreszierenden Sonden wurde am OctoPlus Q-Plex Imaging System (NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle) durchgeführt.

2.2.4.8. Bakterienwachstums-Analysen in infiziertem Pflanzengewebe

Zur Bestimmung der Bakterientiter inokulierter Bakterienstämme in Arabidopsis, Paprika oder *N. benthamiana* wurden Blattscheiben zu angegebenen Zeitpunkten mit einem Korkbohrer ausgestanzt ($1 \times 0.5 \text{ cm}^2$ für Paprika und *N. benthamiana*, $2 \times 0.22 \text{ cm}^2$ für Arabidopsis) und Proben von biologischen Replikaten wurden zusammengeführt. Blattscheiben wurden für 30 sec in 70% (v/v) Ethanol oberflächensterilisiert und dann für weitere 30 sec mit sterilem ddH₂O gewaschen. Nach der Trocknung der Blattscheiben auf einem Papiertuch wurden je eine oder zwei Blattscheiben in 400 μL (Paprika) bzw. in 200 μL (Arabidopsis) steriles 10 mM MgCl₂ überführt. Die Homogenisierung des Blattmaterials erfolgte mithilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators (Heidolph, Schwabach). Zwei technische Replikate pro biologisches Replikat wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe auf King's B Festmedium mit adäquaten Rifampicin-Konzentrationen ausplattiert. Nach einer zweitägigen Inkubation bei 28°C konnten gewachsene Kolonien ausgezählt und die koloniebildenden Einheiten pro cm² (CFU/cm², CFU für *Colony Forming Units*) berechnet werden.

2.2.4.9. Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Für die Quantifizierung des Gesamt-Chlorophyllgehalts (*Chl a + b*) in infiziertem Paprika Blattgewebe wurden vier Blattscheiben mit dem Korkbohrer Nr. 4 (0.8 cm Durchmesser) aus jedem biologischen Replikat ausgestanzt und in 1 mL 80% (v/v) Aceton über Nacht bei 4°C im Überkopffroller (10 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 200 μL pro Probe in die Vertiefungen einer 96-well Platte (96-well flat bottom polystyrene plate, Sarstedt) pipettiert und die Absorption bei den Wellenlängen 663 nm (*Chl a*) und 645 nm (*Chl b*) wurde in einem Tecan Infinite® 200 PRO Platten-Reader (Tecan Group Ltd., Schweiz) gemessen. 80% (v/v) Aceton wurde als Leerkontrolle (*blank*) verwendet. Zur Berechnung des Gesamt-Chlorophyllgehalts wurde die Formel von (Lichtenthaler, 1987) verwendet:

$$\text{Chlorophyll } a : \frac{12,21 * A(663nm) - 2,81 * A(645nm)}{\text{Frischgewicht [g]}}$$

$$\text{Chlorophyll } b : \frac{20,31 * A(645nm) - 5,03 * A(663nm)}{\text{Frischgewicht [g]}}$$

$$\text{Gesamt Chlorophyll} : \frac{\mu\text{g Chlorophyll}}{\text{g Frischgewicht}} = \text{Chlorophyll } a + \text{Chlorophyll } b$$

Der berechnete Chlorophyllgehalt in Kontrollpflanzen wurde auf 100% gesetzt.

2.2.4.10. Messung der Ionen-Leckage

Um die elektrische Leitfähigkeit in Paprika Blattproben zu messen, wurde nach der Methode von (Stall *et al.*, 1974) vorgegangen. Von jedem biologischen Replikat wurden vier Blattscheiben mit dem Korkbohrer Nr. 5 (1.2 cm Durchmesser) ausgestanzt und in einem mit 8 mL ddH₂O gefüllten Schraubröhrchen für ca. 4 h im Überkopffroller (30 rpm) inkubiert. Die elektrische Leitfähigkeit wurde danach mit dem Cond 7110 inoLab[®]-Leitfähigkeitsmessgerät (WTW, Dinslaken) bestimmt. Es folgte das Aufkochen der Proben bei 95°C für 1 h und ein erneutes Messen der Leitfähigkeit sobald die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren. So konnte die Leitfähigkeit als prozentualer Anteil der maximal möglichen Leitfähigkeit nach dem Aufkochen (100%) berechnet und angegeben werden.

2.2.4.11. Messung der Phytohormongehalte in Arabidopsis und Paprika

Messungen des Jasmonsäure (JA)-Gehalts und des Gesamt-Salicylsäure (SA)-Gehalts in Arabidopsis bzw. *CaWRKY40a* VIGS Paprika Pflanzen wurden in Kooperation mit Maria Fitzner (IGZ Großbeeren) durchgeführt. Das Blattmaterial wurde direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff geerntet, danach für eine Woche gefriergetrocknet und im Anschluss gemahlen. Zur Extraktion von Phytohormonen wurden 5 mg gefriergetrocknetes Arabidopsis Blattmaterial oder 15 mg gefriergetrocknetes Paprika Blattmaterial pro Probe verwendet. Es wurden drei Extraktionsrunden mit je 200 µL eines Methanol/Wassergemischs (60:40, v/v) durchgeführt, wobei die Proben nach jeder Methanol/Wasser Zugabe für 15 min im Ultraschallbad sonifiziert und danach bei 11000 rcf und 4°C für 10 min zentrifugiert wurden. Zur Bestimmung des JA-Gehalts in Arabidopsis wurde bei der ersten Extraktionsrunde 1 µL deuterierte Jasmonsäure (d₅-JA, 75 ng/mL) als interner Standard hinzugefügt. Zur Bestimmung des SA-Gehalts in Paprika Pflanzen wurde hingegen 1 µL deuterierte Salicylsäure (d₄-SA, 75 ng/mL) als interner Standard verwendet. Die Überstände aus den drei Extraktionsschritten wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und schließlich über ein PTFE-Filter-

Reaktionsgefäß (0.2 µM; Thermo Fisher Scientific Inc.) durch zentrifugieren bei 11000 rcf und 4°C für 7 min gefiltert. 100 µL einer jeden Probe wurden in ein HPLC Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µL ultrareinem Wasser + 0.1% (v/v) Essigsäure verdünnt. Die Analyse erfolgte in beiden Fällen in einem Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System, welches mit dem Q-Trap® 6500 ESI-MS/MS System (Sciex, USA) gekoppelt war. Zur Separation wurde eine Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Waldbronn) Säule verwendet (injiziertes Volumen = 10 µL). Die mobile Phase bestand aus ultrareinem Wasser + 0.1% (v/v) Essigsäure (Lösungsmittel A) und aus Acetonitril + 0.1% (v/v) ultrareinem Wasser (Lösungsmittel B). Die Fließrate betrug 650 µL m⁻¹. Der Gradient wurde mit 90% A für 1 min gestartet, ging dann zu 15% A in 4 min, dann zu 0% A in 4 min, wo er eine Minute unverändert blieb. Nach 1 min ging der Gradient zurück zu 90% A in 50 sec wo er vier Minuten lang stabil blieb. Die Temperatur der Säule war 30°C. Die Ionisierung erfolgte durch eine Elektrospray-Ionisierung (Temperatur der Ionenquelle = 500°C, Ionenspray-Spannung = -4500 V, entgegenströmendes *curtain gas* = 50 psi, Hilfgas = 65 psi) in einem negativen Ionisierungsmodus. Die Konzentrationen von JA und SA wurden jeweils anhand von über eine externe Kalibrierungskurve jeweiligen Phytohormons und der Wiederfindung des dazugehörigen internen Standards (d5-JA oder d4-SA) berechnet. Die Nachweisgrenze (LOD, für *Limit of Detection*) für JA und SA lag bei 0.001539 ng. Die Messung der SA-Gehalte in Paprika Wildtyp Pflanzen nach Infektion mit verschiedenen *Xcv* Stämmen wurde von Dr. Tiziana Guerra (IGZ Großbeeren) nach (Nietzsche *et al.*, 2018) durchgeführt.

2.2.4.12. Vermessung der Stomata Öffnungen

Blattscheiben wurden mit dem Korkbohrer aus vier-bis fünf Wochen alten Paprika und *N. benthamiana* Pflanzen oder aus sechs Wochen alten Arabidopsis Pflanzen ausgestanzt und für 2 h auf Wasser inkubiert, um eine maximale und gleichmäßige Öffnung der Stomata zu gewährleisten. Danach wurden *N. benthamiana* oder Arabidopsis Blattscheiben für weitere 2 h auf einer 25 µM flg22 (Hycultec GmbH, Bernsdorf) oder 50 µM ABA (Abscisinsäure; Sigma-Aldrich) Lösung inkubiert, wie in (Lozano-Durán *et al.*, 2014) beschrieben. Paprika Blattscheiben wurden für ca. 2-3 h auf Bakteriensuspensionen mit OD₆₀₀ = 0.2 (1×10⁸ CFU mL⁻¹) verschiedener angegebener *Xcv* Stämme inkubiert. Die Blattscheiben waren während der gesamten Dauer des Experiments einer Lichtintensität von 240-300 µmol m⁻² s⁻¹ ausgesetzt und wurden erst kurz vor der mikroskopischen Analyse aus der begehbaren Wachstumskammer geholt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Blattscheiben mit der Blattunterseite nach oben auf einen Objektträger mit sterilem ddH₂O gelegt und mit einem Deckglas bedeckt.

Die untere Epidermis wurde unter dem Digitalmikroskop VHX-7000 (Keyence, version 1.4.17.3) analysiert. Für jedes Experiment wurden die Öffnungen der Stomata (Breite/Länge) von rund 100 Stomata pro Behandlung mit der zum Mikroskop gehörigen *Software* ausgemessen. Gänzlich geschlossene Stomata wurden mit einem Wert von 0 μm angegeben.

2.2.4.13. *In planta* GUS Aktivitäts-Assay

Für *in planta* GUS Aktivitäts-Assays wurden vier Wochen alte *N. benthamiana* Pflanzen mit Agrobakterien, die mit angegebenen Effektor-bzw. Reporterkonstrukten transformiert worden waren, bei einer $\text{OD}_{600} = 0.5$ infiltriert.

Agrobakterien die mit dem *silencing*-Inhibitor P19 transformiert worden waren, wurden mit einer $\text{OD}_{600} = 0.3$ ko-infiltriert. 48 h später wurden vier Blattscheiben pro Probe mit dem Korkbohrer Nr. 3 (0.5 cm Durchmesser) in 120 μL GUS Assay-Puffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0, 10 mM DTT, 1 mM Na_2EDTA , 0.1% (w/v) SDS und 0.1% (v/v) Triton X-100) mit dem Rotor-Stator-Homogenisator (Heidolph, Schwabach) homogenisiert, für 20 min auf Eis inkubiert und dann bei 16000 rcf und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand einer jeden Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentrationen wurden mit der Bradford Reagenz (BioRad) über einen Vergleich mit einer BSA Standardreihe nach Herstellerprotokoll bestimmt. 200 μg der Proteinextrakte wurden in 450 μL GUS Assay-Puffer bei 22°C für 10 min präinkubiert. So konnte garantiert werden, dass gleiche Proteinmengen mit einer fixen Menge an Substrat inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μL 20 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Hydrat (MUG; Sigma-Aldrich) Substrats. Direkt nach der Zugabe des Substrats wurde ein 20 μL Aliquot zu 180 μL Stop-Puffer (0.2 M Na_2CO_3) pipettiert, was als Zeitpunkt 0 Kontrolle dienen sollte. Der restliche Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert und die Reaktion wurde abgestoppt, indem wieder 20 μL Aliquots zu je 180 μL Stop-Puffer pipettiert wurden. Die GUS Aktivität wurde bestimmt, indem die Fluoreszenz (Anregungswellenlänge = 365 nm, Emissionswellenlänge = 460 nm) des produzierten 4-Methylumbelliferon (4-MU) in einer 96-well Platte (*Nunc F96 black flat bottom*; Thermo Fisher) in dem Tecan Infinite[®] 200 PRO Platten-Reader (Tecan Group Ltd., Schweiz) gemessen wurde. Eine 4-MU Standardkurve wurde benutzt, um die Menge an produziertem 4-MU pro Zeiteinheit zu berechnen. Die GUS Aktivität ist hier dementsprechend als $\text{pmol 4-MU min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ angegeben. Die Proteinexpression der Effektorstrukturen wurde *per* Western Blot Analyse (Abschnitt 2.2.4.6) nachgewiesen.

2.2.5. Statistische Analysen und Darstellung der Daten

In Abhängigkeit des jeweiligen durchgeführten Experiments wurden statistisch signifikante Unterschiede über den *Student's t-test* oder eine *One-way ANOVA* mit angeschlossenem *Tukey Post-hoc Test* ermittelt. Jedes der durchgeführten Experimente wurde, falls nicht anders angegeben, mindestens zweimal wiederholt. Die Anzahl biologischer Replikate (individuelle Pflanzen, n) ist den Abbildungsunterschriften zu entnehmen. Die niedrigste Anzahl biologischer Replikate ist dabei $n = 3$.

Die für die hier vorliegende Arbeit gefertigten Modelle wurden mit BioRender.com erstellt. Die Abbildung 1.5 wurde nach dem Modell „*Protein Ubiquitylation Pathway*“ von BioRender.com, (2021) verändert (Quelle: <https://app.biorender.com/biorender-templates>).

Die multiple Sequenzanalyse der verschiedenen WRKY Proteine wurde mittels *Clustal W* mit Standardparametern (www.ebi.ac.uk) durchgeführt und die Schattierungen wurden mit BOXSHADE 3.21 (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) dargestellt.

3. Ergebnisse

Die funktionelle Charakterisierung von Typ-III Effektorproteinen dient dazu, Virulenzmechanismen pathogener Bakterien auf molekularer Ebene aufzuklären und dadurch Rückschlüsse auf die Ereignisse während einer Immunantwort ziehen zu können. Dass es im Laufe der Zeit zu einer Nahrungsmittelknappheit, ausgelöst von einer Kombination aus ansteigender Weltbevölkerung und hohen Ertragsverlusten durch phytopathogene Krankheitserreger kommt, kann momentan nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist die detaillierte Kenntnis des pflanzlichen Immunsystems von essentieller Bedeutung, um auf lange Sicht beispielsweise neue Strategien zur Entwicklung resistenter Sorten zu konzipieren.

3.1. Das Typ-III Effektorprotein XopS

XopS ist ein bislang wenig erforschter Typ-III Effektor aus dem Effektorenrepertoire von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob XopS mit Antworten der PTI interferiert. In einem zweiten Schritt sollte festgestellt werden, ob bzw. inwiefern XopS einen Beitrag zur Virulenz von *Xcv* in einer kompatiblen Interaktion mit seiner Wirtspflanze Paprika leistet.

3.1.1. XopS interferiert mit PTI-Antworten in Arabidopsis

Viele Gram-negative phytopathogene Bakterien behelfen sich ihrer Typ-III Effektoren, um sich gegen die basalen, induzierten Abwehrreaktionen von Pflanzen zu wehren und damit ein günstiges Milieu für ihre Kolonisierung zu schaffen (Jones & Dangl, 2006). Um festzustellen, ob auch XopS in der Lage ist PTI-Antworten im Generellen zu stören, sollten eingangs Experimente an der Modellpflanze Arabidopsis, die kein natürlicher Wirt von *Xanthomonas* ist, durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden mithilfe der 'Floral dip' Methode transgene Arabidopsis Col-0 Linien generiert, welche ein XopS-GFP Fusionsprotein exprimieren können. Die Expression des Fusionsproteins wird dabei von einem β -Estradiol induzierbaren 35S Promotor kontrolliert. Nach erfolgreicher Selektion homozygoter Linien wurden sechs Wochen alte Pflanzen mit einer 50 μ M β -Estradiol Lösung besprüht. 24 Stunden später wurden Blattproben genommen um die Expression von XopS-GFP sowohl auf Transkriptebene mittels RT-PCR, als auch auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse in drei unabhängigen Linien zu bestätigen (Abb. 3.1A und B). Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, weil in einem Vorexperiment, bei welchem Blattproben an verschiedenen Zeitpunkten genommen worden waren, die Proteinexpression 24 h nach Behandlung am stärksten war (Abb. 3.1C).

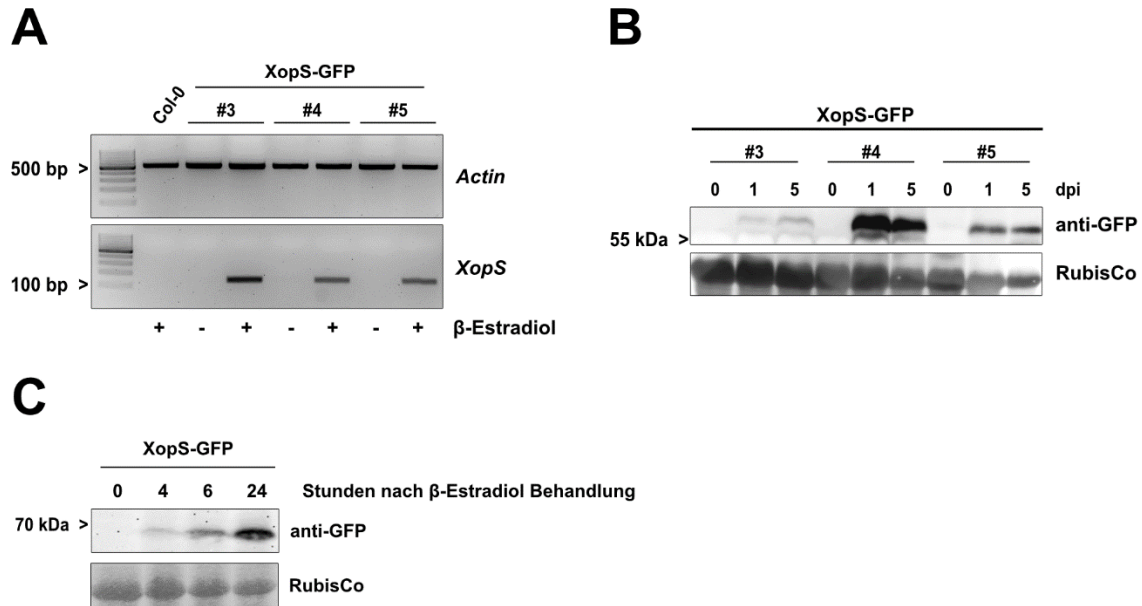


Abbildung 3.1: Verifizierung der XopS-GFP Expression in transgenen Arabidopsis Pflanzen.

(A) Nachweis der β -Estradiol-induzierten Transkription von XopS in transgenen Arabidopsis Linien der homozygoten Generation T3 mittels RT-PCR in unabhängigen Linien (#3, #4 und #5). Das Haushaltgen *Actin* diente als Expressionskontrolle. Col-0 und nicht β -Estradiol-behandelte Pflanzen (-) dienen als Negativkontrollen. Die Probennahme erfolgte 24 h nach Behandlung mit 50 μ M β -Estradiol (+). (B) Western Blot Analyse zur Verifizierung der XopS-GFP Proteinexpression in unabhängigen transgenen Arabidopsis Linien (#3, #4, #5; T3) nach Behandlung mit 50 μ M β -Estradiol. Die Probennahme erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten. dpi = *Days Post Induction*; Tage nach Induktion). Die Proteinexpression von XopS-GFP wurde mittels anti-GFP Antikörper detektiert. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (C) Zeitkursexperiment zur Proteinexpressionsanalyse von XopS-GFP in transgenen Arabidopsis Pflanzen. Die Probennahme erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 50 μ M β -Estradiol. Die Proteinexpression von XopS-GFP wurde über eine Western Blot Analyse mittels anti-GFP Antikörper verifiziert. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

Aufschluss darüber, ob eine ektopische Expression von XopS-GFP in diesen transgenen Linien zur Unterdrückung von PTI-Antworten führt, sollte die Durchführung einer Bakterienwachstumskurve geben. Dabei wurden Blätter von sechs Wochen alten Arabidopsis Pflanzen der drei unabhängigen XopS-GFP Linien (#3, #4 und #5), sowie Col-0 Wildtyp (WT) Pflanzen 24 h nach β -Estradiol Behandlung mit einem T3SS-defizienten *Pst* DC3000 Δ *hrcC* (*Pst* Δ *hrcC*) Stamm (1×10^4 CFU mL⁻¹) infiziert. Da dieser Stamm nicht in der Lage ist, selbst Typ-III Effektoren in die Pflanze zu injizieren, konnte somit sichergestellt werden, dass eventuelle Effekte ausschließlich abhängig von der XopS-GFP Expression auftreten. Um weiter auszuschließen, dass die alleinige Behandlung mit β -Estradiol einen Effekt auf das Bakterienwachstum hat, wurde parallel zu den behandelten Pflanzen ein weiteres Pflanzenset der gleichen Linien mit einer Kontrolllösung besprüht und ebenso 24 h später mit *Pst* Δ *hrcC* infiziert.

Fünf Tage nach Infiltration (5 dpi, *Days Post Inoculation*) der Bakterienlösung über eine nadellose Spritze, wurde der Bakterientiter im infizierten Blattgewebe bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von XopS-GFP in allen drei unabhängigen Linien im Vergleich zu der WT Kontrolle das Bakterienwachstum des nicht-pathogenen Bakterienstammes *Pst* Δ *hrcC* fördert (Abb. 3.2). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine ektoische Expression von XopS einen negativen Einfluss auf basale PTI-Antworten hat.

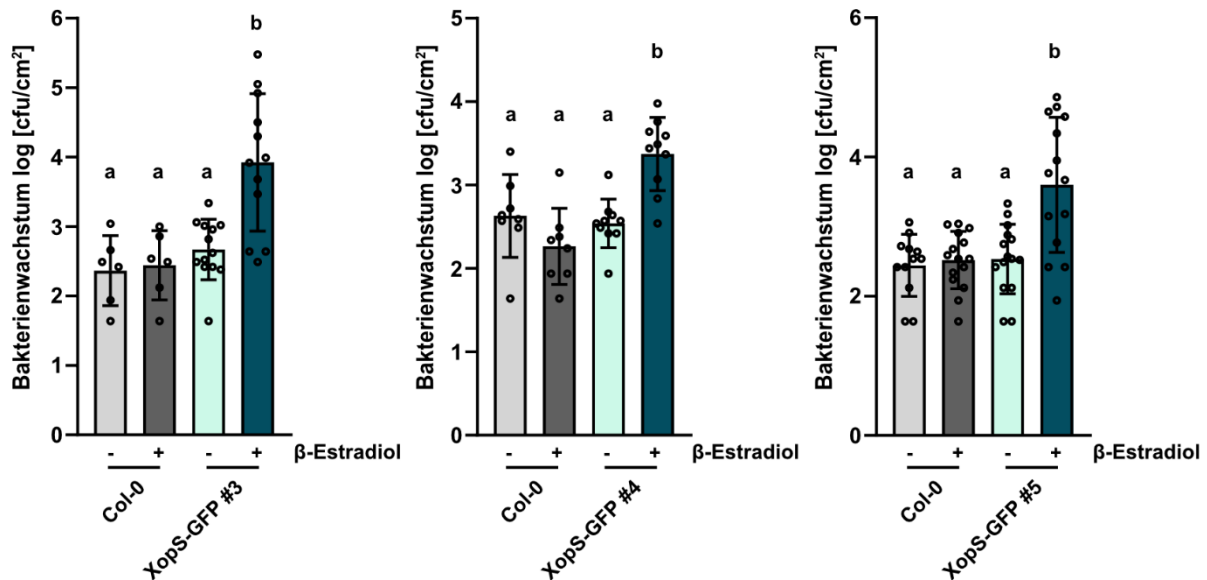


Abbildung 3.2: Die ektoische Expression von XopS-GFP fördert das Bakterienwachstum des T3SS-defizienten *Pst* DC3000 Δ *hrcC* Stammes in Arabidopsis.

Arabidopsis Wildtyp Col-0 und transgene XopS-GFP Linien (#3, #4, #5) wurden mit einer 50 μ M β -Estradiol Lösung behandelt und 24 h später mit *Pst* DC3000 Δ *hrcC* Bakterien bei einer Bakteriendichte von 1×10^4 CFU mL^{-1} über Druckinfiltration infiziert. Nicht- β -Estradiol-behandelte Pflanzen (-) dienen dazu, einen möglichen Effekt der β -Estradiol Behandlung auszuschließen. Koloniebildende Einheiten (CFU) wurden 5 Tage nach Infektion bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens $n = 3$ biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) \pm Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

3.1.2. Die ektoische Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg des JA-Gehalts in Arabidopsis

Interessanterweise zeigten die zwei transgenen Linien mit dem höchsten XopS-GFP Proteinlevel (Linie #4 und #5) fünf Tage nach β -Estradiol Induktion einen stark chlorotischen Phänotyp, der unabhängig von der Infektion mit *Pst* Δ *hrcC* auftrat (Abb. 3.3).

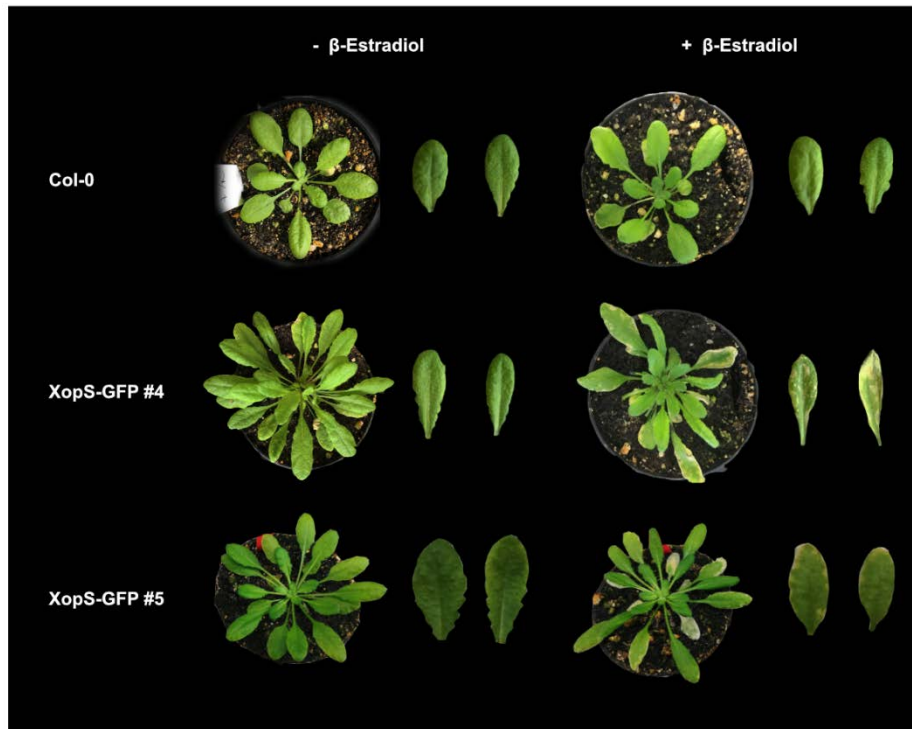


Abbildung 3.3: Phänotypische Merkmale der ektopischen Expression von XopS-GFP in transgenen Arabidopsis Pflanzen.

Sechs Wochen alte Arabidopsis Pflanzen der angegebenen Linien wurden mit einer 50 μ M β -Estradiol Lösung (+) oder einer Kontrolllösung (-) besprüht. Vier bis fünf Tage nach Induktion von XopS-GFP entwickelten die Pflanzen im Gegensatz zum Col-0 Wildtyp einen chlorotischen Phänotyp, der am fünften Tag nach Induktion photographisch festgehalten wurde.

Diese Symptome erinnerten an eine Studie aus dem Jahre 2014, in der gezeigt werden konnte, dass ein T3E aus *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* durch Aktivierung einer JA-abhängigen Antwort einen ähnlichen Phänotyp in Arabidopsis auslöst (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Folglich wurde in beiden XopS-GFP exprimierenden Linien eine Genexpressionsanalyse über quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) der bekannten JA-Markergene *AtMYC2* und *AtJAZ10* durchgeführt. Da es sich hierbei um Gene handelt, die in die frühe JA-Antwort involviert sind, wurden die Genexpressionslevel vier Stunden nach β -Estradiol Behandlung analysiert und mit jenen aus Kontroll-behandelten Pflanzen verglichen. Dass zu diesem Zeitpunkt XopS-GFP bereits exprimiert ist, wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abb. 3.4A). Wie die Abb. 3.4B zeigt, führt die Expression von XopS-GFP zu einer Induktion der untersuchten Markergene.

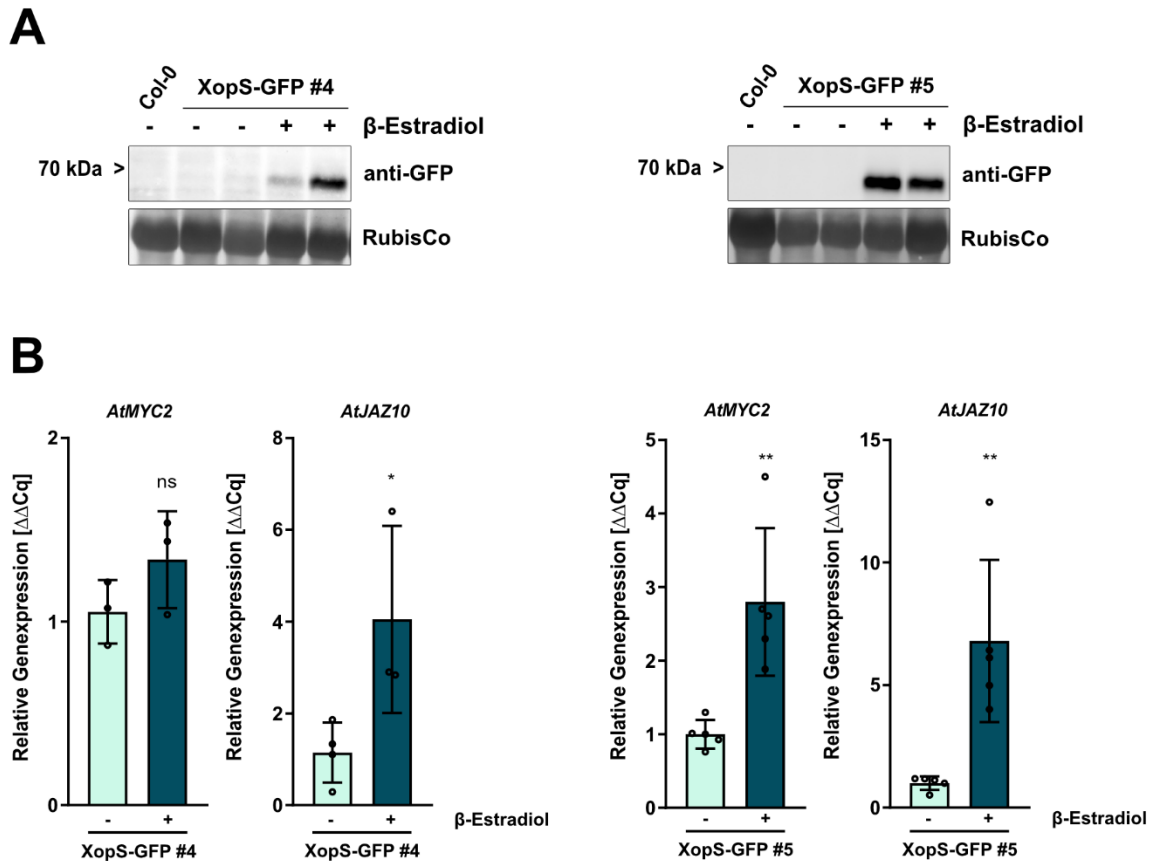


Abbildung 3.4: Die ektopische Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg der Genexpression von JA-Markergenen.

(A) Die Expression von XopS-GFP in zwei unabhängigen transgenen Arabidopsis Linien (#4, #5) wurde per Western Blot Analyse mittels anti-GFP Antikörper verifiziert. Die Probennahme erfolgte 4 h nach Behandlung mit 50 μ M β -Estradiol (+). Col-0 Wildtyp und kontrollbehandelte Pflanzen (-) dienen als Negativkontrollen. Biologische Replikate: Col-0 n = 1, XopS-GFP #4 und #5 je n = 2 pro Behandlung. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (B) Genexpressionsanalyse von JA-Markergenen in zwei unabhängigen XopS-GFP Linien (#4, #5). Die Proben wurden 4 h nach Induktion mit 50 μ M β -Estradiol (+) bzw. 4 h nach Behandlung mit der Kontrolllösung (-) geerntet. Die Gesamt-RNA wurde aus dem Probenmaterial extrahiert, die mRNA Mengen der angegebenen Markergene wurden per qRT-PCR quantifiziert und mit den mRNA Mengen in Kontrollpflanzen verglichen. *Ubiquitin Carrier Protein 9 (AtUBC9)* diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 5 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, P < 0.05 oder **, P < 0.01 gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

Folglich sollte untersucht werden, ob sich auch der JA-Gehalt in Abhängigkeit von XopS verändert. Dazu wurde dieser in Blattproben der Linie #5, in der XopS-GFP einen stärkeren Effekt auf die JA-Markergenexpression hatte, 24 Stunden nach β -Estradiol Behandlung bestimmt. Der quantifizierte JA-Gehalt wurde dabei sowohl mit dem JA-Gehalt in kontrollbehandelten Pflanzen der gleichen Linie, als auch mit dem in β -Estradiol behandelten und nicht behandelten WT Pflanzen verglichen. Die Analyse ergab, dass die XopS-GFP Expression zu einem signifikanten Anstieg des JA-Gehalts in Arabidopsis führt (Abb. 3.5).

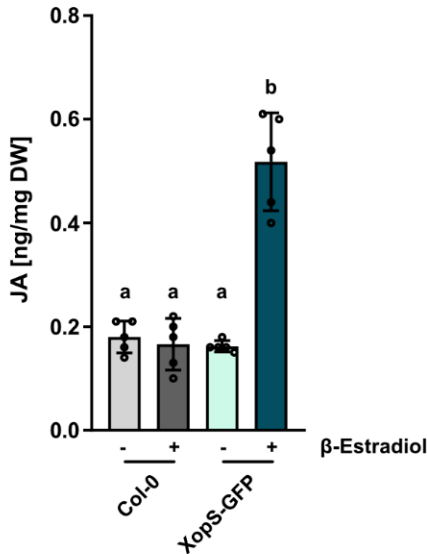


Abbildung 3.5: Die Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg des JA-Gehalts in Arabidopsis.

24 h nach Behandlung mit 50 μ M β -Estradiol (+) wurden die JA-Gehalte in einer repräsentativen XopS-GFP transgenen Arabidopsis Linie gemessen und mit jenen in Col-0 Wildtyp Pflanzen verglichen. (-) bezieht sich auf die Behandlung der Pflanzen mit einer Kontrolllösung. DW = *Dry weight*; Trockengewicht. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 5 Pflanzen-pools bestehend aus je 4 unabhängigen Pflanzen \pm Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine ektopische Expression des XopS-GFP Fusionsproteins in Arabidopsis mit PTI-Antworten interferiert und zudem in der Lage ist, JA-abhängige Antworten auszulösen.

3.1.3. Untersuchung der Virulenzfunktion von XopS während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xcv* und seiner Wirtspflanze Paprika

Eine frühere Studie von Schulze und Kollegen zeigte, dass die Infiltration von suszeptiblen Paprika Blättern mit einem *xopS*-defizienten *Xcv* 85-10 Stamm (*Xcv* Δ *xopS*) über eine nadellose Spritze zu einer verminderten Symptomausprägung im Vergleich zu *Xcv* 85-10 WT (*Xcv* WT) infizierten Blättern führte. Allerdings war das *in planta* Bakterienwachstum der Deletionsmutante *Xcv* Δ *xopS* dabei nicht beeinträchtigt (Schulze *et al.*, 2012). Dies deutete darauf hin, dass XopS lediglich eine untergeordnete bzw. redundante Rolle als bakterieller Virulenzfaktor spielt. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde die Symptomausprägung auf infizierten Paprika (*Capsicum annuum* ECW) Blättern unter Verwendung einer unabhängigen *Xcv* Δ *xopS* Deletionsmutante erneut untersucht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Sophia Sonnewald, FAU Erlangen). Die Ergebnisse, gezeigt in Abb. 3.6, bestätigten dabei, dass eine Infektion mit *Xcv* Δ *xopS* sowohl vier als auch sechs Tage nach Infiltration wesentlich weniger Symptome erzeugt als eine Infektion mit dem *Xcv* WT Stamm. Während es in *Xcv* WT infizierten Blättern zu einem Kollaps des Pflanzengewebes bis hin zur Ausbildung von Nekrosen kam, zeigten *Xcv* Δ *xopS* infizierte Blätter nur leichte Chlorosen. Eine Infektion von Paprika Blättern mit einem *Xcv* Δ *xopS*(*XopS*-HA) Komplementationsstamm stellte den durch *Xcv* WT ausgelösten Phänotyp wieder her (Masterarbeit Dr. Daniela Spinti, 2016).

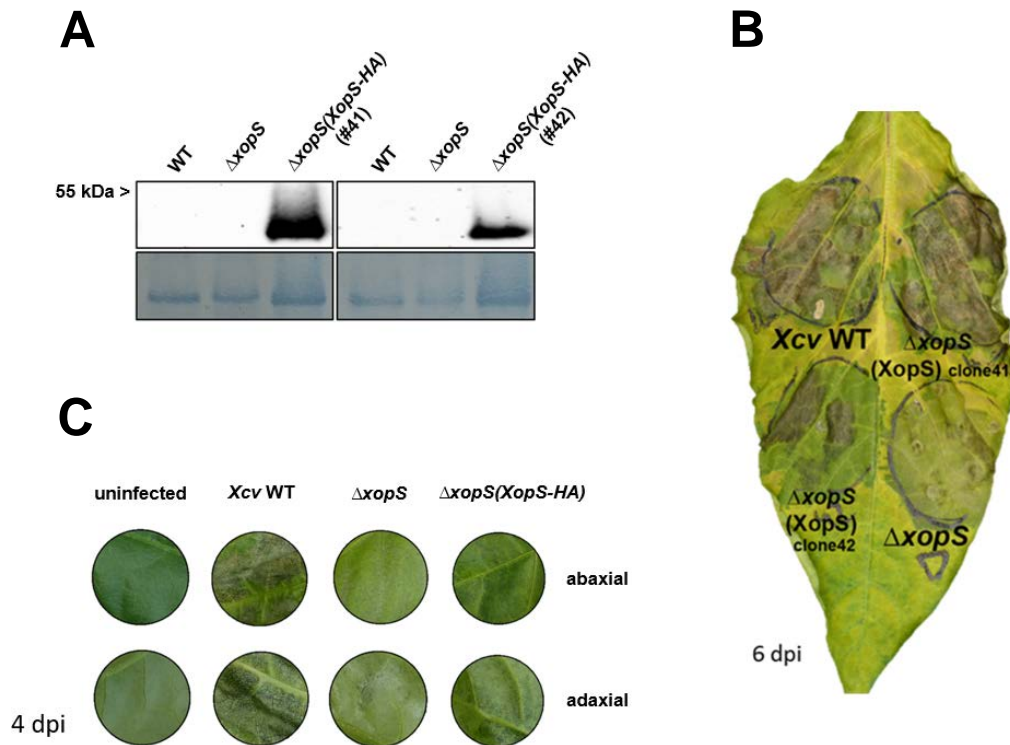


Abbildung 3.6: XopS trägt zur Ausprägung *Xcv*-abhängiger Krankheitssymptome auf suszeptiblen Paprika Pflanzen bei.

(A) Verifizierung der XopS-HA Proteinexpression in einem *XcvΔxopS(XopS-HA)* Komplementationsstamm. Blätter suszeptibler Paprika ECW Pflanzen wurden über Druckinfiltration mit *Xcv* Wildtyp (WT), *XcvΔxopS* und zwei unabhängigen Klonen des Komplementationsstammes *XcvΔxopS(XopS-HA)* mit einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹ infiziert. Das Gesamtprotein wurde drei Tage später aus dem infizierten Blattmaterial extrahiert und die Expression von XopS-HA wurde über Western Blot Analyse mittels anti-HA Antikörper detektiert. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (B) Phänotypische Veränderungen eines repräsentativen Paprika Blattes sechs Tage nach Infektion (6 dpi) über Druckinfiltration mit *Xcv* Wildtyp (WT), *XcvΔxopS* und zwei unabhängigen Klonen des Komplementationsstammes *XcvΔxopS(XopS-HA)* bei einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹. Der Klon 41 wurde für alle weiterführenden Experimente verwendet. (C) Ausprägung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen Paprika ECW Blättern nach Infektion über Druckinfiltration von *Xcv* Wildtyp (WT), *XcvΔxopS* oder *XcvΔxopS(XopS-HA)* mit einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹. Die Symptomausprägung wurde vier Tage nach Infektion photographisch festgehalten. uninfected = nicht infiziert. Diese Abbildung wurde leicht modifiziert der Masterarbeit von Dr. Daniela Spinti entnommen.

Der Komplementationsstamm war über eine triparentale Konjugation hergestellt worden, bei welcher ein pBBR1 MCS-5 XopS-HA Konstrukt in den *XcvΔxopS* Deletionsstamm eingebracht wurde.

3.1.3.1. XopS trägt zur bakteriellen Vermehrung von *Xcv* in Paprika bei

Die Druckinfiltration von Phytopathogenen in das susceptible Blattgewebe umgeht die stomatare Immunantwort, einen der wichtigsten induzierbaren Abwehrmechanismen, denen Bakterien während eines natürlichen Infektionsgeschehens begegnen (Melotto *et al.*, 2008). Es ist bekannt, dass einige adaptierte Phytopathogene Virulenzfaktoren wie T3Es oder Toxine entwickelt haben, um damit die präinvasive Immunität ihrer Wirtspflanzen zu unterdrücken (Melotto *et al.*, 2006; Hurley *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der *Xanthomonas* T3E XopS möglicherweise präinvasive Immunreaktionen beeinträchtigen und damit die Besiedelung des Apoplasten begünstigen könnte. So wurde eine *Dip*-Inokulationsmethode etabliert, bei welcher einzelne Paprika Blätter in entsprechende Bakteriensuspensionen (1×10^8 CFU mL⁻¹) getaucht werden, und die inokulierten Bakterien eigenständig bis in den Apoplasten vordringen müssen. Die *Dip*-Inokulation der Stämme *Xcv* WT, *Xcv*Δ*xopS* und *Xcv*Δ*xopS*(*XopS*-*HA*) und eine daran angeschlossene Bakterienwachstumskurve zeigten, dass der Bakterientiter von *Xcv*Δ*xopS* sieben Tage nach Infektion im Vergleich zu jenem der anderen beiden Stämme signifikant geringer war (Abb. 3.7). Die Bakterientiter von *Xcv* WT und *Xcv*Δ*xopS*(*XopS*-*HA*) wichen hingegen kaum voneinander ab, was darauf hindeutet, dass die ektopische Expression von XopS in *Xcv*Δ*xopS*(*XopS*-*HA*) das Fehlen von XopS in *Xcv*Δ*xopS* vollständig komplementieren kann.

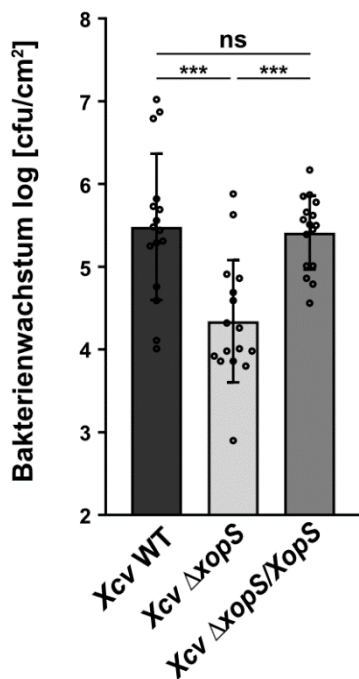


Abbildung 3.7: XopS trägt zur Virulenz von *Xcv* auf susceptible Paprika Pflanzen bei.

Susceptible Paprika ECW Blätter wurden per *Dip*-Inokulation mit Bakteriensuspensionen der angegebenen *Xcv* Stämme bei einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹ infiziert. Koloniebildende Einheiten (CFU) im infizierten Blattgewebe wurden 7 Tage nach Infektion bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 8$ biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit ***, $P < 0.001$ gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

Wie bei der Druckinfiltration auch, führte die *Dip*-Inokulation von *Xcv* Δ *xopS* im Vergleich zu jener der anderen zwei Stämme zu einer wesentlich weniger starken Symptomausprägung (Abb. 3.8A). Um diese Symptomausprägung zu quantifizieren, wurde der Chlorophyllgehalt im infizierten Blattgewebe bestimmt. In Übereinstimmung mit den ausgebildeten Chlorosen in *Xcv* WT und *Xcv* Δ *xopS*(*XopS*-*HA*) infizierten Blättern, besaßen diese Blätter einen signifikant niedrigeren Chlorophyllgehalt als *Xcv* Δ *xopS* oder nicht infizierte Blätter (Abb. 3.8B). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass während einer natürlichen Infektionssituation *XopS* sehr wohl ein wichtiger Virulenzfaktor ist, der die Verbreitung von *Xcv* unterstützt.

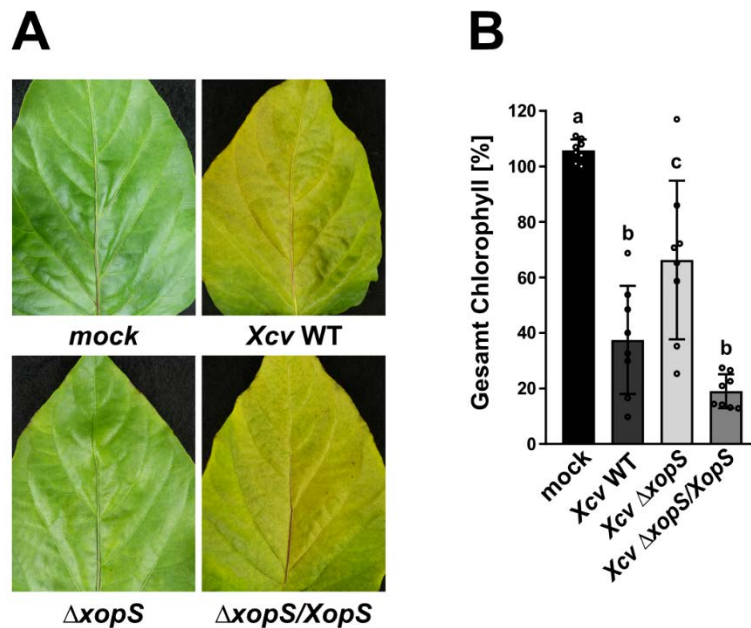


Abbildung 3.8: Ausprägung von Krankheitssymptomen während einer *Dip*-Inokulation von *Xcv* auf suszeptiblen Paprika Pflanzen.

(A) Paprika Blätter wurden über *Dip*-Inokulation mit den Bakterienstämmen *Xcv* Wildtyp (WT), *Xcv* Δ *xopS* oder *Xcv* Δ *xopS*(*XopS*-*HA*) mit einer Bakteriedichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹ infiziert. Die Symptomausprägung wurde sieben Tage nach Infektion photographisch festgehalten. Nicht-infizierte Blätter (*mock*) dienen als Kontrolle. (B) Die Symptomausprägung *Dip*-inokulierter Paprika Blätter mit angegebenen Bakterienstämmen wurde sieben Tage nach Infektion durch die Messung des Chlorophyllgehalts quantifiziert. Nicht-infizierte Blätter (*mock*) dienen als Kontrolle. Der prozentuale Anteil des Gesamt-Chlorophyllgehalts in infizierten Pflanzen wurde über den Vergleich zur *mock* Kontrolle (100%) bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 8 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

3.1.3.2. XopS beeinflusst die Schließung der Stomata während der präinvasiven Immunantwort

Pflanzen sind in der Lage, nach Erkennung Pathogen-assoziiertes molekulares Muster über PRRs in der Plasmamembran von Schließzellen diese aktiv zu schließen (Melotto et al., 2006). Deshalb sollte untersucht werden, ob XopS den PAMP-induzierten Stomataschluss während der präinvasiven Immunantwort stören kann. Einen ersten Hinweis darauf ergaben Experimente an der Modellpflanze *N. benthamiana*. Ein XopS-GFP Konstrukt, bei welchem die GFP Markierung an den C-Terminus des XopS Proteins fusioniert ist, wurde dazu mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation transient in vier Wochen alten Blättern exprimiert. Über das gleiche Verfahren wurde freies GFP in gleichaltrigen Kontrollpflanzen exprimiert. Einen Tag später wurden Blattscheiben aus dem infiltrierten Blattgewebe ausgestanzt und zwei Stunden nach Inkubation auf Wasser wurde die Hälfte der Präparate mit einer Lösung, die 25 μM des bakteriellen PAMPs flg22 enthielt, behandelt. Nach weiteren zwei Stunden wurde die Öffnung der Stomata von flg22 behandelten und nicht behandelten Blattscheiben vermessen. Während Pflanzen, die freies GFP exprimierten in der Lage waren, ihre Stomata in Antwort auf den PAMP Stimulus zu schließen, konnte XopS-GFP dieser Schließung entgegenwirken (Abb. 3.9A). Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) spielt in der generellen stomatären Stressantwort eine wichtige Rolle, wobei sie hauptsächlich als Schlüsselregulator der Stomata Schließung in Antwort auf einen abiotischen Stress gilt (Arnaud & Hwang, 2015). Es sollte getestet werden, ob XopS-GFP den Stomataschluss nicht nur nach flg22 Behandlung, sondern auch nach ABA Behandlung beeinflussen würde. Der experimentelle Aufbau folgte dem des vorangegangenen Experiments, wobei hier die 25 μM flg22 Lösung durch eine 50 μM ABA-enthaltende Lösung ersetzt wurde. In diesem Falle war XopS-GFP nicht in der Lage einen ABA-induzierten Stomataschluss zu verhindern, womit bestätigt werden konnte, dass transgene XopS-GFP Arabidopsis Pflanzen bei ektopischer Expression des Effektors keinen grundsätzlichen Defekt in der Schließung von Stomata haben (Abb. 3.9B). Zur Expressionskontrolle der beiden verwendeten Konstrukte (freies GFP und XopS-GFP) wurde eine anti-GFP Western Blot Analyse durchgeführt (Abb. 3.9C). Diese Resultate deuten darauf hin, dass XopS-GFP exprimierende Pflanzen nur in Antwort PAMP-unabhängige Stress-Stimuli ihre Stomata unbeeinträchtigt schließen können.

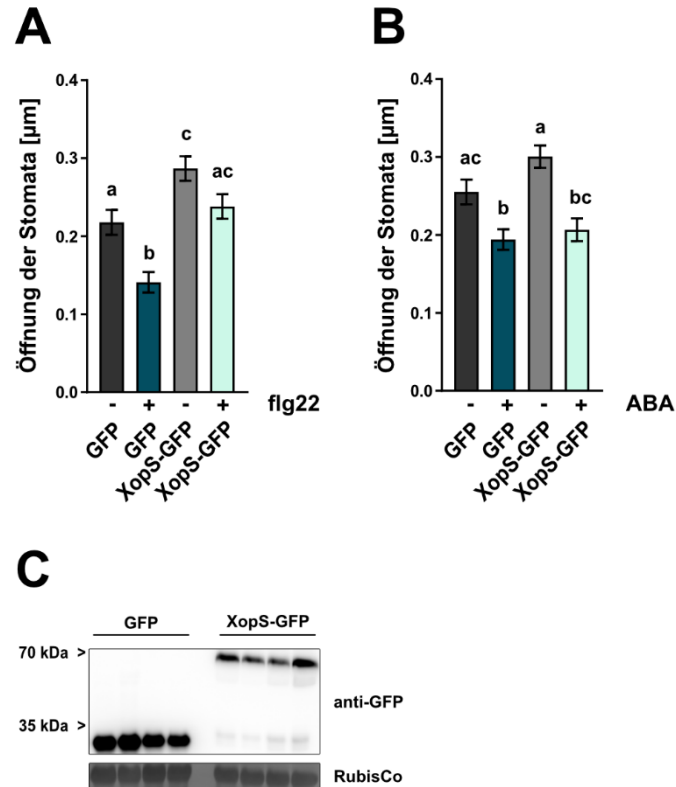


Abbildung 3.9: Die transiente Expression von XopS in *N. benthamiana* hemmt den flg22-induzierten Stomataschluss.

(A) Vermessung von Stomata-Öffnungen in *N. benthamiana* Pflanzen nach transienter Expression von entweder freiem GFP (GFP) oder XopS-GFP. 24 h nach Agrobakterien-Infiltration der entsprechenden Konstrukte wurden ausgestanzte Blattscheiben für 2 h auf Wasser (Kontrolle, -) oder auf einer 25 µM flg22-Lösung (+) inkubiert. Anschließend wurden die Stomata-Öffnungen mikroskopiert und es wurden ca. 100 Spaltöffnungen von n = 4 einzelnen Pflanzen pro Behandlung vermessen. Die Öffnung der Stomata ist im Verhältnis Breite/Länge angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler SE. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden. (B) Vermessung von Stomata-Öffnungen in *N. benthamiana* Pflanzen nach transienter Expression von entweder freiem GFP (GFP) oder XopS-GFP. 24 h nach Agrobakterien-Infiltration der entsprechenden Konstrukte wurden ausgestanzte Blattscheiben für 2 h auf Wasser (Kontrolle, -) oder auf einer 50 µM ABA-Lösung (+) inkubiert. Anschließend wurden die Stomata-Öffnungen mikroskopiert und es wurden ca. 100 Spaltöffnungen von n = 4 einzelnen Pflanzen pro Behandlung vermessen. Die Öffnung der Stomata ist im Verhältnis Breite/Länge angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler SE. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden. (C) Western Blot Analyse mittels anti-GFP Antikörper zur Verifizierung der Proteinexpression von GFP und XopS-GFP in Agrobakterien-infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Die Proben wurden 24 h nach Infiltration geerntet. Die Abbildung zeigt die Proteinexpression in den vier biologischen Replikaten die zur Analyse der Stomata-Öffnungen verwendet wurden. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

Um in einem unabhängigen System zu bestätigen, dass XopS der Schließung von Stomata in Antwort auf flg22 entgegenwirkt, wurde die Expression von XopS-GFP in der stabilen transgenen Arabidopsis Linie #5 durch β-Estradiol Behandlung induziert.

Auch hier wurden 24 Stunden nach Proteininduktion Blattscheiben zuerst für zwei Stunden auf Wasser inkubiert.

Im Anschluss wurde das Wasser durch eine 25 μM flg22 Lösung ausgetauscht. Weitere zwei Stunden später wurden die vermessenen Stomata-Öffnungen der XopS-GFP exprimierenden Pflanzen denen der β -Estradiol besprühten Col-0 Kontrollpflanzen gegenübergestellt. Während in Abwesenheit von flg22 die Stomata der Blattscheiben beider Linien ähnlich weit geöffnet waren, induzierte der PAMP Stimulus in Arabidopsis WT Pflanzen eine signifikante Schließung der Spaltöffnungen (Abb. 3.10A). Im Gegensatz dazu verhinderte die Expression von XopS-GFP, dass Stomata geschlossen werden konnten. Die Proteinexpression von XopS wurde auch hier über eine anti-GFP Western Blot Analyse bestätigt (Abb. 3.10B). Somit konnte bestätigt werden, dass auch eine ektopische Expression des T3Es in Arabidopsis einen negativen Einfluss auf die PAMP-vermittelte stomatäre Immunantwort hat.

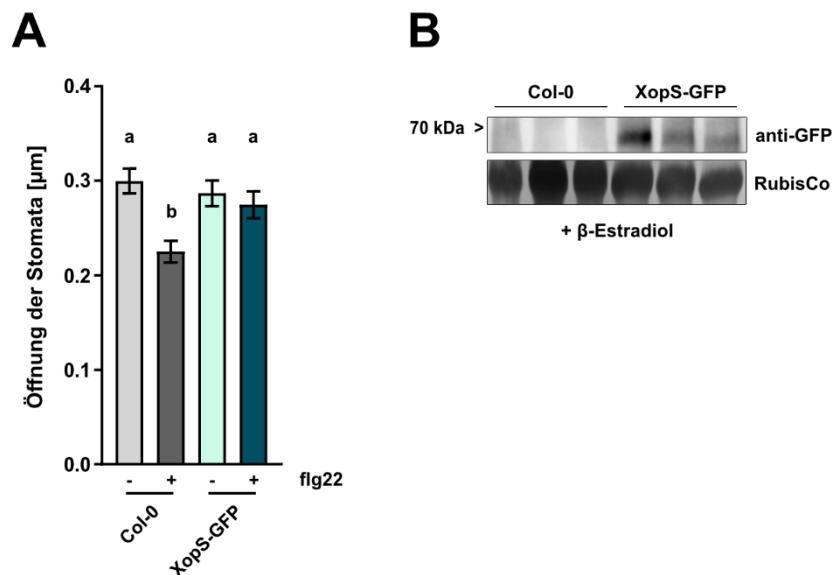


Abbildung 3.10: Die ektopische Expression von XopS in transgenen Arabidopsis Pflanzen hemmt den flg22-induzierten Stomataschluss.

(A) Vermessung der Stomata-Öffnungen in Col-0 Wildtyp und der transgenen Arabidopsis XopS-GFP Linie #5 24 h nach Induktion der Proteinexpression mit 50 μM β -Estradiol. Blattscheiben wurden für 2 h auf Wasser (Kontrolle,-) oder auf einer 25 μM flg22-Lösung (+) inkubiert und im Anschluss mikroskopisch untersucht. Es wurden ca. 100 Spaltöffnungen von $n = 3$ einzelnen Pflanzen pro Behandlung vermessen. Die Öffnung der Stomata ist im Verhältnis Breite/Länge angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler SE. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden. (B) Western Blot Analyse mittels anti-GFP Antikörper zur Verifizierung der Proteinexpression XopS-GFP in der transgenen Arabidopsis Linie #5. Die Proben wurden 24 h nach β -Estradiol Induktion geerntet. Die Abbildung zeigt die Proteinexpression in den drei biologischen Replikaten die zur Analyse der Stomata-Öffnungen verwendet wurden. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

3.1.3.3. XopS ist ein wichtiger Virulenzfaktor in der kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion während der präinvasiven Immunantwort

Die bisherigen experimentellen Ansätze sprechen zwar dafür, dass XopS mit der stomatären Immunität interferiert, können aber nicht bestätigen, dass dies in einer tatsächlichen Interaktion zwischen *Xanthomonas* und seiner Wirtspflanze Paprika auch der Fall ist. Um dies zu untersuchen, wurden Blattscheiben aus Paprika WT Pflanzen ausgestanzt und nach zwei Stunden auf Wasser für zwei bis drei weitere Stunden mit verschiedenen Bakterienstämmen (1×10^8 CFU mL⁻¹) behandelt. Kontroll-Blattscheiben wurden insgesamt für vier bis fünf Stunden auf Wasser inkubiert. Während Blattscheiben nach Inkubation mit *Xcv* WT Bakterien ihre Stomata weiter geöffnet hatten als die Kontroll-Blattscheiben, induzierte die Inkubation mit dem *Xcv* Δ *xopS* Stamm eine signifikante Schließung der Stomata (Abb. 3.11). Der gleiche Effekt war zu beobachten, wenn Blattscheiben mit einem *Xcv* Δ *hrpF* Stamm behandelt wurden. Dieser Stamm besitzt eine Deletion im *hrpF* Gen, dessen Genprodukt ein bakterielles Translocon bildet, worüber T3Es in die Wirtszelle transportiert werden können (Büttner *et al.*, 2002). *Xcv* Δ *hrpF* ist somit nicht in der Lage, T3Es in die Pflanzenzelle einzuschleusen und kann, den hier beobachteten Effekten zufolge, die präinvasiven Immunantworten nicht unterdrücken. Im Gegensatz dazu, komplementierte der *Xcv* Δ *xopS*(*XopS*-HA) Stamm das Fehlen von XopS in *Xcv* Δ *xopS* und besaß dementsprechend wieder die Fähigkeit, die Schließzellen der Paprika Blätter offen zu halten. Zusammen genommen kann aus den erhaltenen Erkenntnissen geschlussfolgert werden, dass XopS mit frühen pflanzlichen Immunantworten wie der stomatären Immunität interferiert und damit deutlich zur Virulenz von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* auf suszeptiblen Paprikapflanzen beiträgt.

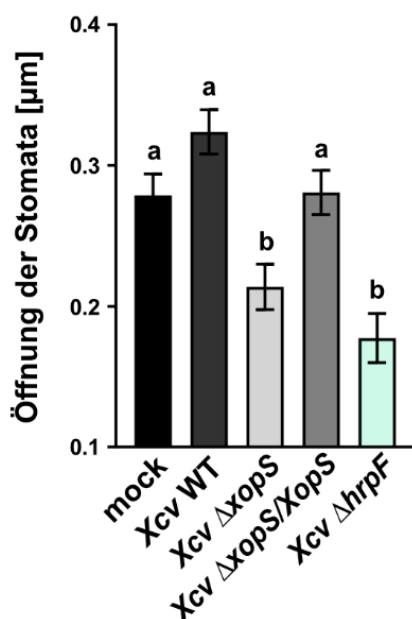


Abbildung 3.11: XopS verhindert die Schließung von Stomata während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion.

Vermessung der Stomata-Öffnungen in Paprika Blattscheiben nach Inkubation für 2-3 h auf Wasser (*mock*) oder Bakteriensuspensionen von *Xcv* Wildtyp (WT), *Xcv* Δ *xopS*, *Xcv* Δ *xopS*(*XopS*-HA) oder *Xcv* Δ *hrpF* bei einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹. Es wurden ca. 100 Spaltöffnungen von n = 4 einzelnen Pflanzen pro Behandlung vermessen. Die Öffnung der Stomata ist im Verhältnis Breite/Länge angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler SE. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

3.1.4. XopS beeinflusst die Expression Phytohormon-abhängiger Abwehrgene und stört möglicherweise das phytohormonelle Gleichgewicht

Hormonsignalnetzwerke sind Schlüsselkomponenten in der Regulation der pflanzlichen Immunantwort. Sie spielen auf allen Ebenen der PTI und ETI eine wichtige Rolle. Wie bereits erwähnt, sind die Phytohormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA), und deren Wechselwirkung, dabei die wichtigsten Akteure. Um festzustellen, ob XopS Immunantworten möglicherweise durch die Umsteuerung hormoneller Signalwege stört, wurde zunächst über eine qRT-PCR das Expressionslevel eines SA-responsiven Gens (*CaPRI*) und das des Negativregulators der JA-Signaltransduktion (*CaJAZ8*) in Paprika Blättern quantifiziert. Im Vergleich zur Kontrolle (*mock*, $MgCl_2$ -infiltrierte Blätter) war die relative Genexpression des SA-abhängigen Abwehrgens *PRI*, ebenso wie die des vermeintlich in die Repression des JA-Signalwegs involvierten Gens *JAZ8* in Paprika Blättern 10 Stunden nach Inokulation (hpi, *Hours Post Inoculation*) mit *Xcv* WT signifikant erhöht (Abb. 3.12). Der Anstieg der *CaPRI* und *CaJAZ8* Genexpression wurde noch einmal deutlich potenziert, wenn Paprika Blätter mit dem *xopS*-defizienten Stamm *XcvΔxopS* infiziert wurden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der T3E XopS eine transkriptionelle Umsteuerung zugunsten JA-abhängiger Signalwege herbeiführt, während gleichzeitig die Expression SA-assoziierte Gene reprimiert wird.

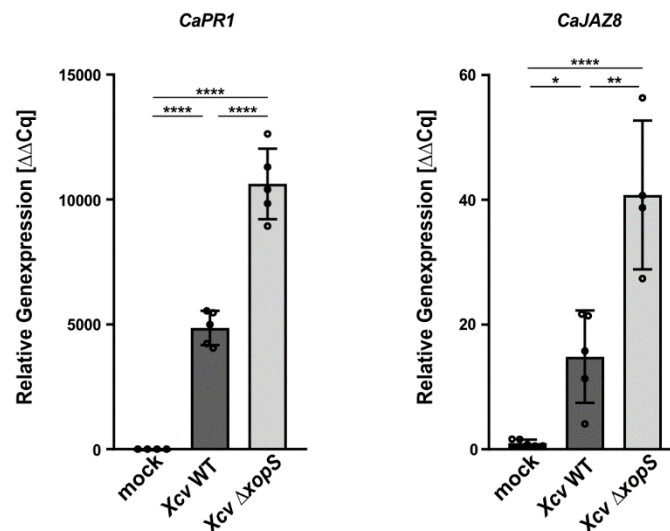


Abbildung 3.12: XopS unterdrückt die Genexpression Phytohormon-abhängiger Abwehrgene.

Pflanzen wurden mit 10 mM $MgCl_2$ (*mock*) oder *Xcv* Wildtyp (WT) bzw. *XcvΔxopS* mit einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL^{-1} per Druckinfiltration infiziert. 10 h nach Inokulation wurde RNA aus dem infizierten Blattgewebe extrahiert und im Anschluss wurden die Transkriptmengen der SA- oder JA-responsiven Gene *CaPRI* bzw. *CaJAZ8* über eine qRT-PCR Analyse bestimmt. Die relative Genexpression in infiziertem Blattgewebe wurde mit jener in *mock*-behandelten Blattproben verglichen. *Tubulin* (*CaTUB*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 4-5$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$; **, $P = 0.0010$ oder ****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bestimmte *Xanthomonas* T3Es wie z.B. XopD oder XopJ in der Lage sind, die SA-Gehalte ihrer Wirtspflanzen zu reduzieren, um auf diesem Wege pflanzliche Immunantworten zu hemmen (Kim *et al.*, 2008; Üstün *et al.*, 2013). So sollten, zusätzlich zu den gezeigten Genexpressionsanalysen, die Gehalte der Phytohormone SA und JA im *Xcv* WT- und *Xcv* Δ xopS-infizierten Blattgewebe bestimmt werden. Dabei wurden die SA-Messung von einer Kooperationspartnerin (Dr. Tiziana Guerra, IGZ Großbeeren), und die JA-Messung eigenständig durchgeführt. Die Infektion von Paprika Blättern mit *Xcv* Δ xopS führte zu einem drastischen Anstieg des freien und gesamten SA-Gehalts (freies SA und SA-Glucoside) im Vergleich zu einer Infektion mit dem *Xcv* WT Stamm (Abb. 3.13A-B). Die Resultate der JA Messung waren weniger eindeutig. So konnte lediglich der Trend beobachtet werden, dass *Xcv* Δ xopS infizierte Pflanzen weniger JA akkumulieren als Pflanzen die entweder mit *Xcv* WT oder *Xcv* Δ xopS(*XopS*-HA) inokuliert worden waren (Abb. 3.13C). Dieses etwas unklare Ergebnis ist vermutlich dem experimentellen *Design* und der untersuchten Pflanzenspezies zuzuschreiben, da mit der verwendeten Methode generell nur eine sehr geringe Menge an JA aus dem Paprika Pflanzenmaterial extrahiert werden konnte. Trotzdem widersprechen diese Resultate den aus der an transgenen XopS-GFP Arabidopsis Pflanzen gewonnenen Daten nicht (gezeigt in Abb. 3.4C), sondern unterstützen diese eher.

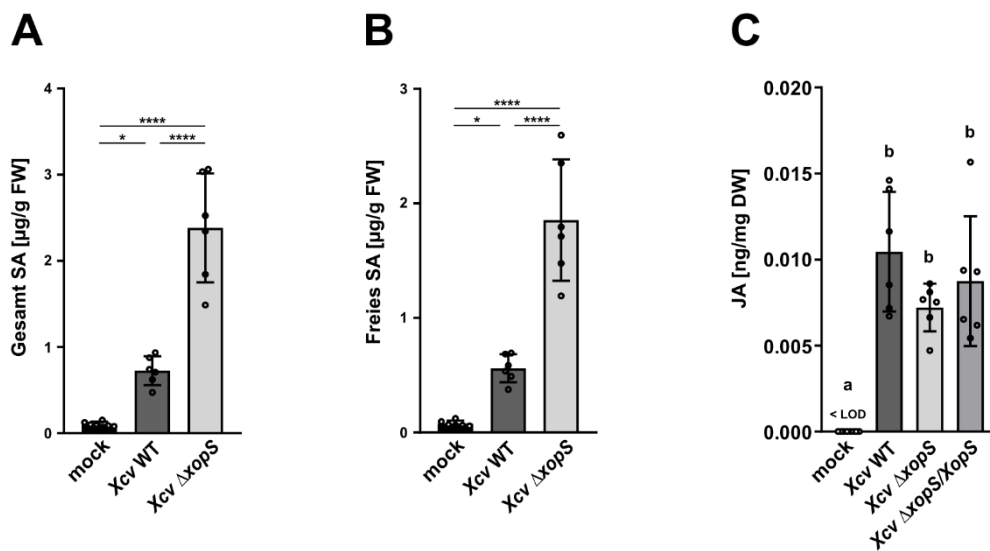


Abbildung 3.13: XopS beeinflusst die Akkumulation von Phytohormonen während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion.

(A) und (B) Suszeptible Paprika Pflanzen wurden mit 10 mM MgCl₂ (*mock*) oder *Xcv* Wildtyp (WT) bzw. *Xcv* Δ xopS mit einer Bakteriendichte von 1 \times 10⁸ CFU mL⁻¹ per Druckinfiltration infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde der Gesamt SA-Gehalt bzw. freies SA im Blattgewebe quantifiziert. Die Messung wurde von Dr. Tiziana Guerra (IGZ, Großbeeren) durchgeführt. FW = *Fresh weight*; Frischgewicht. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit *, P < 0.05 oder ****, P < 0.0001 gekennzeichnet. (C) Suszeptible Paprika Pflanzen wurden mit 10 mM MgCl₂ (*mock*) oder *Xcv* Wildtyp (WT), *Xcv* Δ xopS bzw. *Xcv* Δ xopS(*XopS*-HA) mit

einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹ per Druckinfiltration infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde der Gesamt-JA-Gehalt im Blattgewebe quantifiziert. DW = *Dry weight*; Trockengewicht. LOD = *Limit of Detection*. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

Die Kombination aus der Expressionsanalyse Phytohormon-assoziiierter Gene und der Messung von SA- und JA-Gehalten in Paprika und Arabidopsis lassen vermuten, dass der Typ-III Effektor XopS die pflanzliche Immunantwort möglicherweise über eine Verschiebung von SA-abhängigen Abwehrantworten hinzu JA-vermittelten Reaktionen beeinflusst.

3.1.5. XopS interagiert in Hefe mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40 aus verschiedenen Pflanzenspezies

Um ein besseres Verständnis dafür zu bekommen, wie XopS in die zellulären Prozesse von *Xcv* Wirtspflanzen eingreifen kann, sollten in Vorarbeiten zu dieser Studie mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung potentielle pflanzliche Interaktionspartner bzw. Zielproteine des Typ-III Effektors gefunden werden. Dabei wurde ein potentieller WRKY Transkriptionsfaktor aus der verwendeten *N. tabacum* cDNA Bibliothek identifiziert, der, basierend auf seiner Polypeptid Sequenz, zur Gruppe IIa der WRKY Transkriptionsfaktor-Familie gehört. Ein *BLAST*-Vergleich der Polypeptidsequenz mit der gut charakterisierten WRKY TF Familie aus Arabidopsis ergab eine ca. 64%ige Sequenzidentität zu dem Arabidopsis Transkriptionsfaktor WRKY40. Während der geführten Vorarbeiten wurde eine direkte Interaktion in Hefe zwischen XopS und WRKY40 aus *N. benthamiana*, sowie deren *in planta* Interaktion bestätigt (siehe Abb. 1.6). Eine multiple Sequenzanalyse mittels des Computerprogramms *Clustal W* zwischen WRKY40 Proteinen verschiedener Spezies sollte deren Ähnlichkeit, auf Basis ihrer Aminosäuresequenzen, bestimmen (Abb. 3.14). Dabei wurde das WRKY40 Protein aus Arabidopsis mit dem aus den Tabak Gattungen *N. tabacum* und *N. benthamiana* und zwei WRKY40 Proteinen aus Paprika (*C. annuum*) verglichen. Eines dieser Paprika WRKY40 TFs wurde bereits von Dang und Kollegen als Positivregulator in der Hitzestress- und der Pathogen-Antwort gegen *Ralstonia solanacearum* beschrieben (Dang *et al.*, 2013). Eine *BLAST*-Analyse zeigte, dass die beiden Paprika WRKY40 TFs lediglich eine 71%ige Sequenzähnlichkeit zueinander haben, obwohl beide, wenn verglichen zu der WRKY Familie aus Arabidopsis, die höchste Ähnlichkeit zu WRKY40 aufweisen. Das der Aminosäuresequenz von *NbWRKY40* näherkommende Paprika WRKY40 Protein (Ca03g32070), welches in dieser Arbeit näher untersucht wurde, ist nicht der von Dang und Kollegen beschriebene WRKY40 Transkriptionsfaktor (Ca00g87690). Um eventuelle Verwechslungen zu vermeiden, wurde der hier untersuchte Paprika WRKY40 TF als *CaWRKY40a* bezeichnet.

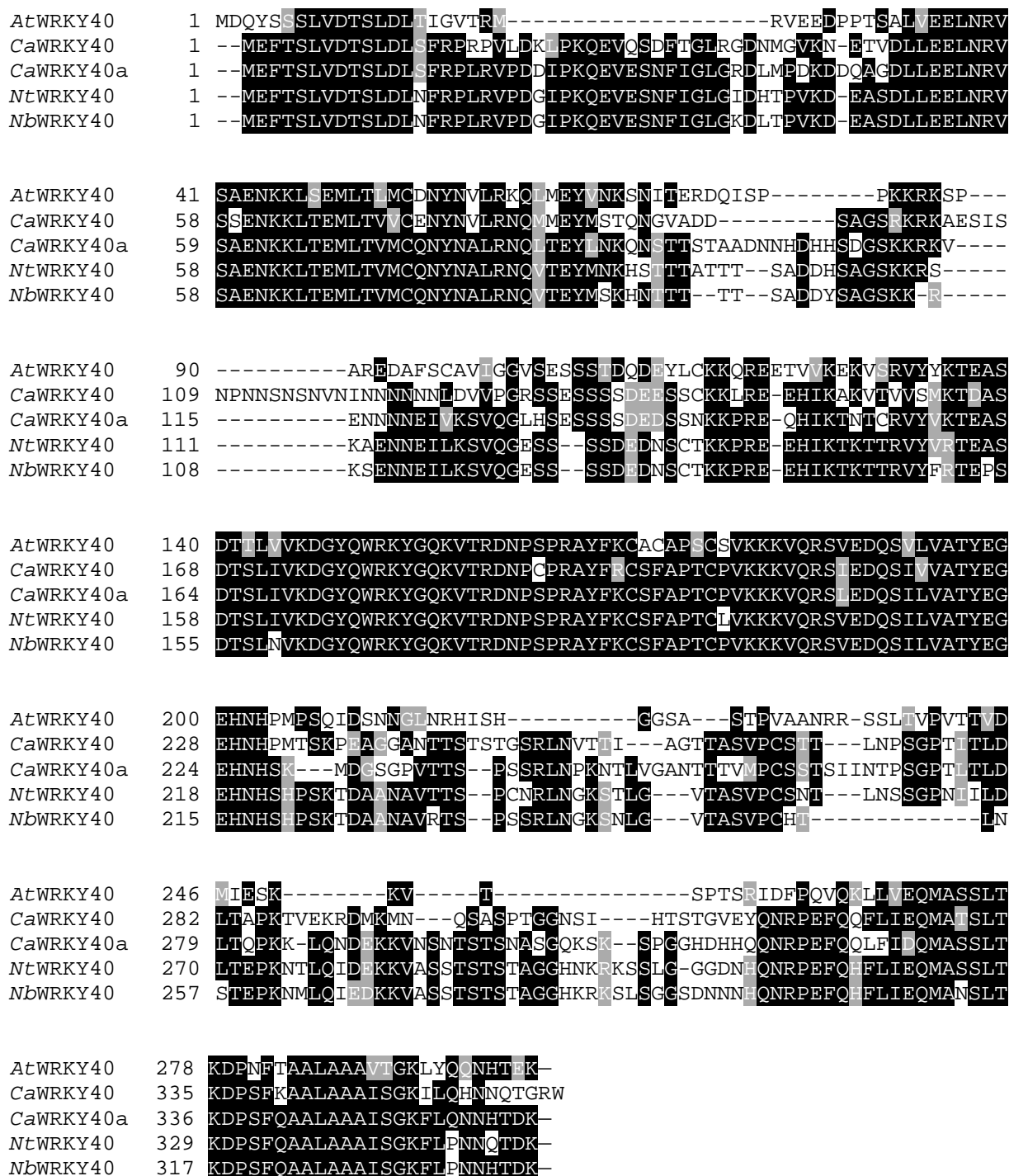


Abbildung 3.14: Multipler Sequenzvergleich orthologer WRKY40 Proteine.

Arabidopsis thaliana (*At*WRKY40; AT1G80840), *Capsicum annuum* (*Ca*WRKY40; XP_016578457 und *Ca*WRKY40a; XP_016562883), *Nicotiana tabacum* (*Nt*WRKY40; XP_016457007) und *Nicotiana benthamiana* (*Nb*WRKY40; Niben101Scf06091g04005.1). Der Sequenzvergleich wurde mittels *Online-Tool Clustal W* mit voreingestellten Parametern durchgeführt (www.ebi.ac.uk). Schwarze und graue Schattierungen wurden mit *BOXSHADE 3.21* (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) dargestellt und zeigen konservierte Aminosäuren.

Um die Interaktion zwischen XopS und dem WRKY40 TF näher zu analysieren, wurde über eine direkte Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsstudie getestet, ob XopS auch an die orthologen WRKY40 TFs aus Arabidopsis (*At*WRKY40) und Paprika (*Ca*WRKY40a) binden kann. Dazu wurden sowohl *At*WRKY40 als auch *Ca*WRKY40a in das offene Leseraster der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) des Vektors pGAD424 kloniert. Anschließend wurden diese Konstrukte jeweils mit dem in das offene Leseraster der GAL4-Bindedomäne (BD) des Vektors pGBT9 klonierten XopS in den Hefestamm Y190 ko-transformiert. Beide Ko-Transformationen führten zu einem Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium ohne Histidin (SCAD –LTH), sowie zu einer Aktivierung des *LacZ*-Reportergens, welche durch eine typische Blaufärbung in einem *LacZ*-Filter-Assay sichtbar gemacht wurde (Abb. 3.15). Diese Untersuchung ergab, dass während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xcv* und Paprika, WRKY40 ein potentiell Zielprotein des Typ-III Effektors XopS ist.

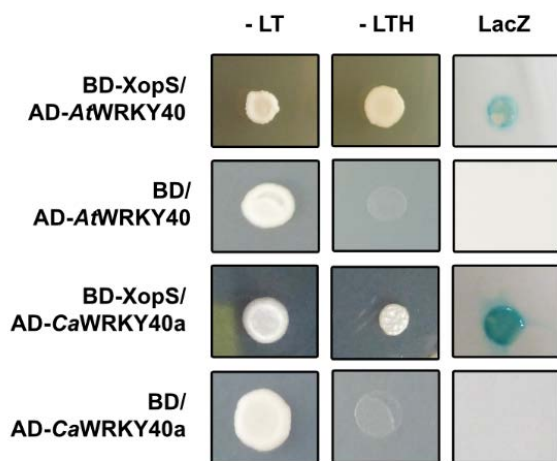


Abbildung 3.15: XopS interagiert in Hefe mit orthologen WRKY40 Proteinen aus Arabidopsis und Paprika.

XopS (in pGBT9) wurde an die GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und in Kombination mit dem an die GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten WRKY40 Protein (in pGAD424) aus verschiedenen Pflanzenspezies im Hefestamm Y190 exprimiert. Transformierte Hefezellen wurden auf Selektionsmedium gestempelt und anschließend wurde ein *LacZ*-Filter-Assay durchgeführt. Die Leervektoren pGAD424 (AD) und pGBT9 (BD) dienten als Negativkontrollen. *At*WRKY40, *Arabidopsis thaliana* WRKY40; *Ca*WRKY40a, *Capsicum annuum* WRKY40a. –LT, Hefe-Selektionsmedium ohne Leu und Trp. –LTH, Hefe-Selektionsmedium ohne Leu, Trp und His. Wachstum auf –LTH zeigt die Expression des Reportergens *HIS3*. Die Blaufärbung bei LacZ zeigt die Aktivität des *LacZ* Reportergens.

3.1.6. Biochemische Analyse des *Xcv* Typ-III Effektors XopS

In weiteren Vorarbeiten zu dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Typ-III Effektor XopS bei einer transienten Ko-Expression in Tabak, zu einer Stabilisierung des *Nb*WRKY40 Proteins führt (siehe Abb. 1.8A). Im Rahmen dieser Studie wurden Versuche unternommen Hinweise darauf zu erlangen, wie XopS zu einer solchen Proteinstabilisierung beitragen könnte. Ein verfolgter Ansatz war dabei der Versuch einer besseren biochemischen Charakterisierung dieses T3Es.

3.1.6.1. XopS stabilisiert den Transkriptionsfaktor *NbWRKY40* während einer transienten Ko-Expression in *N. benthamiana*

Zunächst sollte die ursprüngliche Beobachtung, dass transient überexprimierendes XopS-GFP in *N. benthamiana* zu einer Akkumulation des ebenso transient überexprimierenden *NbWRKY40*-HA Proteins beiträgt (Abb. 1.7), in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden. Dafür wurde ein unabhängiges binäres Konstrukt von *NbWRKY40* mit einer carboxyterminalen HA-Markierung über die *NEBuilder* Klonierungsstrategie hergestellt. Dieses Konstrukt wurde auch für alle weiterführenden Studien an *NbWRKY40*-HA verwendet. *NbWRKY40*-HA wurde entweder einzeln oder zusammen mit XopS-GFP über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in vier Wochen alten *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Einen Tag nach Infiltration der entsprechenden Konstrukte wurden die Blätter beprobt, aufgearbeitet und *per* anti-HA Western Blot analysiert, um das Proteinexpressionslevel von *NbWRKY40*-HA zu überprüfen. In den Blattproben die beide Konstrukte exprimierten, wurde eine deutlich höhere Proteinexpression von *NbWRKY40*-HA beobachtet (Abb. 3.16A). Dies bestätigte die anfängliche Annahme, dass die Anwesenheit von XopS zu einer Stabilisierung des *NbWRKY40* TFs führt. Dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt, und XopS nicht wahllos pflanzliche Proteine stabilisiert, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden. Dafür wurde ein ca. 15 kDa großes Protein mit carboxyterminaler myc-Markierung, DUF581-18-myc aus *Arabidopsis* (Nietzsche *et al.*, 2014), welches keine nachweisliche Beteiligung an pflanzlichen Immunreaktionen hat, für eine Ko-Expression mit XopS-GFP in *N. benthamiana* gewählt. Weil *AtDUF581-18-myc* zwei Tage nach Agrobakterien-vermittelter Transformation am besten exprimiert ist und sich eine transiente Expression von XopS-GFP mindestens über drei Tage stabil hält, wurde der 48 hpi Zeitpunkt zur Ernte des infiltrierten Blattmaterials gewählt. Die *AtDUF581-18-myc* Proteinexpression wurde über einen anti-myc Western Blot analysiert. Da die Signalstärke von einzeln exprimiertem oder mit XopS-GFP ko-exprimiertem *AtDUF581-18-myc* nicht variierte, kann davon ausgegangen werden, dass der Stabilisierungseffekt von XopS auf *NbWRKY40* spezifisch ist (Abb. 3.16B).

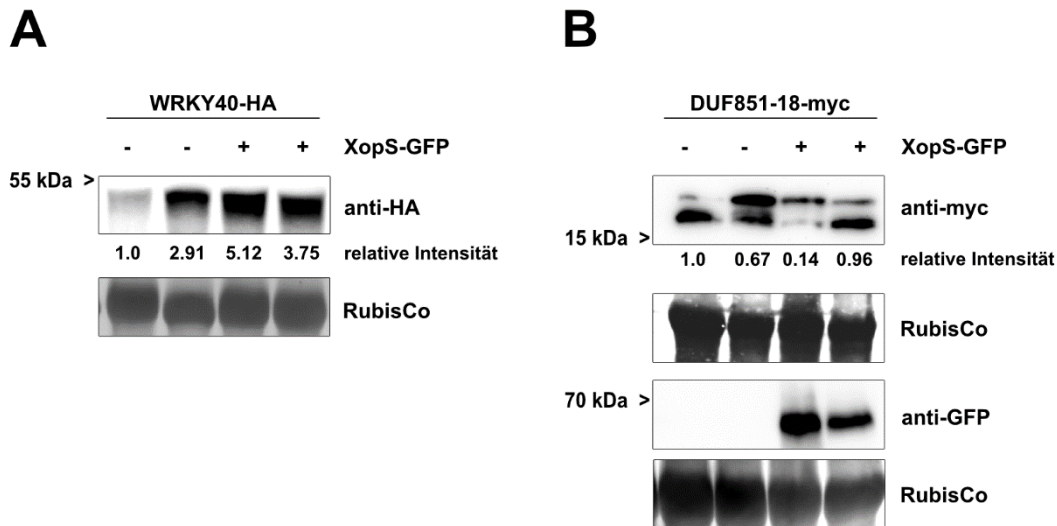


Abbildung 3.16: Die transiente Expression von XopS in *N. benthamiana* führt zur Akkumulation des transient exprimierenden *NbWRKY40* Proteins.

(A) *NbWRKY40*-HA wurde entweder alleine oder zusammen mit XopS-GFP transient in *N. benthamiana* exprimiert. 24 h später wurden die Proteinmengen von *NbWRKY40* über eine Western Blot Analyse mittels anti-HA Antikörper und einer anschließenden densitometrischen Analyse (relative Intensität) quantifiziert. Es wurden je zwei biologische Replikate (+ und - XopS-GFP) analysiert. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (B) zeigt, dass die XopS-vermittelte Akkumulation von *NbWRKY40* spezifisch ist. *AtDUF851-18-myc* wurde entweder alleine oder zusammen mit XopS-GFP transient in *N. benthamiana* exprimiert. 48 h später wurden die Proteinmengen von *AtDUF851-18-myc* über eine Western Blot Analyse mittels anti-myc Antikörper und einer anschließenden densitometrischen Analyse (relative Intensität) quantifiziert. Es wurden je zwei biologische Replikate (+ und - XopS-GFP) analysiert. Die Western Blot Analyse mit dem anti-GFP Antikörper zeigt die Proteinexpression von XopS-GFP. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

3.1.6.2. Etablierung eines *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays

Die Ubiquitinierung ist eine post-translationale Modifikation worüber viele, in die biotische und abiotische Stressantwort involvierte, Komponenten reguliert werden. So wurde beispielsweise auch gezeigt, dass einige WRKY Transkriptionsfaktoren über Ubiquitin-Markierungen zum proteasomalen Abbau geleitet werden und somit deren Aktivität gesteuert wird (Miao & Zentgraf, 2010; Matsushita *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021a). Dass auch *NbWRKY40* über das 26S Proteasom abgebaut werden kann, bestätigten die in Abb. 1.7A dargestellten Vorarbeiten. Dabei wurden *N. benthamiana* Blätter, die den *NbWRKY40* TF transient überexprimierten, mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt, was zu einer Stabilisierung des Proteins führte. Aufgrund mangelnder Strukturkenntnisse des T3Es XopS, und weil dieser Effektor auch keinerlei Sequenzähnlichkeit zu anderen charakterisierten Typ-III Effektoren aufweist, kann man über dessen mögliche biochemische Funktion nur spekulieren. Aufgrund der Beobachtung, dass eine transiente Agrobakterien-vermittelte Ko-Expression von XopS-GFP mit *NbWRKY40*-HA zu einer ähnlichen Akkumulation des

Proteins führte wie eine Behandlung mit MG132 (Abb. 1.7A), wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Effektor XopS möglicherweise mit dem proteasomalen Abbau des WRKY40 TFs interferiert. Eine Interferenz mit der Regulation immunrelevanter Faktoren über das 26S Proteasom wurde zu einem strategisch günstigen Angriffspunkt Gram-negativer phytopathogener Bakterien. Dabei sind einige dieser Vertreter in der Lage, T3Es mit E3 Ligase Funktion in die Wirtszelle einzuschleusen, um die proteasomale Regulation ihrer Zielproteine so zu beeinflussen (Göhre et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009; Singer et al., 2013; Leong et al., 2021). Jedoch führt die Ubiquitinierung eines Substratproteins, die von einer passenden E3 Ligase katalysiert wird, nicht in jedem Fall zum seinem Abbau (Zhou & Zeng, 2017). Über bestimmte Mono-oder Polyubiquitinmarkierungen können Substrate auch stabilisiert werden. Dabei spielen häufig weitere Enzyme wie spezifische E2-konjugierende Enzyme und E4 Ligasen eine Rolle. Ob der Typ-III Effektor XopS über eine E3-Ligase Aktivität verfügt, und darüber möglicherweise zu einer Stabilisierung des WRKY40 TFs führen könnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu wurde, in Anlehnung an die Methode von Furlan und Trujillo (Furlan & Trujillo, 2017), ein *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay etabliert.

Herstellung notwendiger enzymatischer Komponenten

Die wichtigsten Komponenten für einen *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay sind neben Ubiquitin selbst und ATP als Energiespender, drei Enzyme, die für die Katalyse der Ubiquitinierungs-Kaskade zuständig sind. Dabei handelt es sich um (1) das E1-aktivierende Enzym, (2) das E2-konjugierende Enzym und (3) die E3 Ligase, von denen es jeweils, abhängig von der Pflanzenspezies, unterschiedlich viele Vertreter gibt. Im Rahmen des hier etablierten Ubiquitinierungs-Assays sollten die kanonischen Arabidopsis E1 *AtUBA1* und E2 *AtUBC8* Enzyme zum Einsatz kommen. Dafür wurden die offenen Leserahmen (ORFs, für *Open Reading Frames*) von *AtUBA1* (At2g30110) und *AtUBC8* (At5g41700) zunächst mittels *Gateway*-Klonierungsmethode über einen Zwischenvektor in den Expressionsvektor pDEST17 kloniert. Damit wurden beide Enzyme mit einer aminoterminalen 6-fachen Histidin-Markierung (His_{6x}) versehen. Die generierten Konstrukte wurden in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta 2 DE3 Zellen transformiert und die rekombinant produzierten Proteine wurden über eine His_{6x}-Affinitätssäule aufgereinigt. Eine Langzeitlagerung ohne enzymatischen Aktivitätsverlust sollte im Anschluss an die Aufreinigung durch einen speziellen Puffertausch gewährleistet werden. Die Abbildung 3.17A-B zeigt die finalen aufgereinigten rekombinanten Proteine. Neben His_{6x}-*AtUBA1* und His_{6x}-*AtUBC8* wurden der

T3E XopL mit bestätigter E3-Ligase Aktivität (Singer et al., 2012), sowie XopS als putative E3 in entsprechende Expressionsvektoren kloniert.

So wurden XopL und XopS über deren N-terminale GST (Gluthation S-Transferase)-Markierung über eine Gluthation-Sepharose Matrix aufgereinigt. Des Weiteren wurde eine zweite Version von XopS mit N-terminaler MBP (Maltose-Bindeprotein)-Markierung über eine Amylose-Harz-Matrix aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine sind in Abb. 3.17C-E gezeigt.

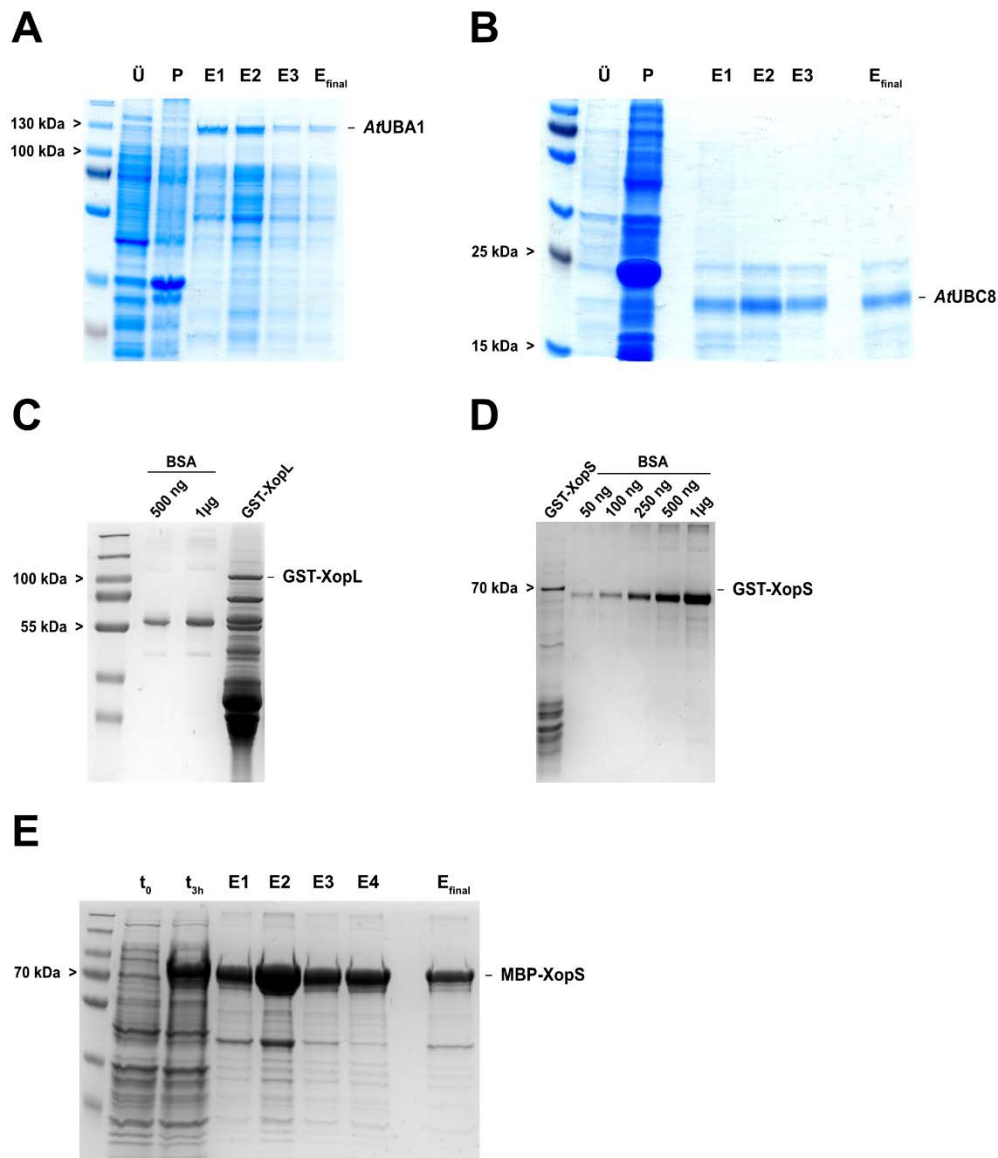


Abbildung 3.17: Proteinaufreinigung der notwendigen Komponenten für der *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay.

(A) und (B) Das E1-aktivierende Enzym His_{6x}-ArUBA1 (A) und das E2-konjugierende Enzym His_{6x}-ArUBC8 (B) wurden in *E. coli* exprimiert und über eine His_{6x}-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Eluate (E) wurden diese neben dem Überstand (Ü) und dem Pellet (P) auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie InstantBlue® angefärbt. E_{final} zeigt das finale Eluat, nachdem die Fraktionen E1, E2 und E3 vereint und aufkonzentriert worden waren. (C) und (D) Die E3 Ligase GST-XopL (C) und die putative E3 Ligase GST-XopS (D) wurden in *E. coli* exprimiert und über eine Gluthation-Sepharose Affinitätsmatrix aufgereinigt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde je 1 µL des finalen Eluats neben angegebenen Proteinmengen von BSA als Standard auf ein SDS-Gel aufgetragen welches dann mit Coomassie InstantBlue® angefärbt wurde. (E) Die putative E3 Ligase MBP-XopS wurde in *E. coli* exprimiert und über eine Amylose-Matrix aufgereinigt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Eluate (E) wurden diese neben der Induktionskontrolle (t_0 = vor IPTG Induktion, t_{3h} = nach IPTG Induktion für 3 h bei 37°C) auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie InstantBlue® angefärbt. E_{final} zeigt das finale Eluat nachdem die Fraktionen E1, E2, E3 und E4 vereinigt und aufkonzentriert worden waren.

Bestätigung der Funktionalität des etablierten *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays

Nach erfolgreicher Herstellung aller rekombinanten Proteine wurde ein *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay mit der bestätigten E3 Ligase XopL durchgeführt. Die Analyse eines Reaktionsansatzes, der alle für die Ubiquitinierungs-Kaskade notwendigen Komponenten enthielt, über einen anti-Ubiquitin Western Blot ergab die Detektion eines typischen, hochmolekularen 'Ubiquitin-Schmiers'. Dieser besteht aus aneinander geketteten, freien Ubiquitin Molekülen, die durch die Aktivität der E3 Ligase gebildet werden können (Abb. 3.18). Fehlte eine der Komponenten im Reaktionsansatz, fehlte auch der 'Ubiquitin-Schmier'. Somit konnte die Funktionalität des Assays bestätigt werden.

ATP	+	+	-	+
Ub	+	+	+	+
E1	+	+	+	+
E2	+	+	+	+
GST-XopL	+	+	+	-

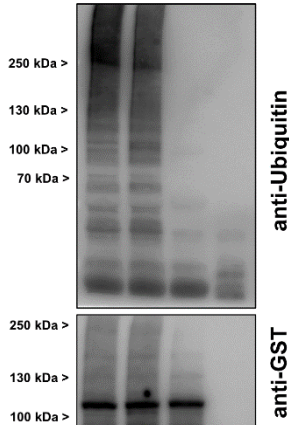


Abbildung 3.18: Der etablierte *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay ist funktional.

Zur Überprüfung der Funktionalität der etablierten Methode wurden die für die Ubiquitinierungskaskade notwendigen Komponenten in einem Reaktionsansatz vereinigt. Das aus *E. coli* aufgereinigte rekombinante GST-XopL wurde dabei als E3 Ligase eingesetzt. E1-aktivierendes Enzym: *AtUBA1*, E2-konjugierendes Enzym: *AtUBC8*. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze denen jeweils eine notwendige Komponente fehlte. Nach 1 h bei 30°C wurden jeweils 20 µL der Reaktionsansätze auf zwei getrennte SDS-Gradientengele (4-15%) aufgetragen, gefolgt von einer Western Blot Analyse. Die Aktivität der E3-Ligase wurde mittels anti-Ubiquitin Antikörper analysiert. GST-XopL wurde mittels anti-GST Antikörpers detektiert.

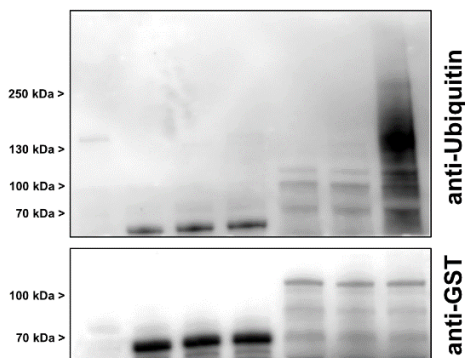
3.1.6.3. XopS besitzt *in vitro* unter getesteten Bedingungen keine E3 Ligase Aktivität

Die Etablierung des *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays ermöglichte die biochemische Untersuchung des Typ-III Effektors XopS auf eine mögliche Funktion als E3 Ligase. Der Versuch baute sich dabei analog zu dem in Abb. 3.18 gezeigten Ubiquitinierungs-Assay auf, wobei hier neben der Positivkontrolle GST-XopL, auch GST-XopS als putative E3 Ligase eingesetzt wurde.

Die anti-Ubiquitin Western Blot Analyse ergab, dass GST-XopS, im Gegensatz zu GST-XopL, unter den getesteten Bedingungen nicht in der Lage war, in Anwesenheit aller notwendigen Komponenten, zur Formation von hochmolekularen, freien Ubiquitinketten beizutragen (Abb. 3.19A). Die Aktivität von E3-Ligasen ist häufig abhängig von spezifischen E2-konjugierenden Enzymen. So ist *At*UBC8 eine generische E2, die die Übertragung von Ubiquitin auf Substratproteine zwar über viele, aber nicht alle E3 Ligasen vermitteln kann (Kraft *et al.*, 2005; Furlan & Trujillo, 2017). Um zu testen, ob MBP-XopS zusammen mit einer anderen E2 eine E3 Ligase Funktion ausübt, wurde der *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay mit einer kommerziell erworbenen, generischen E2 aus dem menschlichen Organismus (UbcH5b), und der UBC35 aus Arabidopsis (*His*_{6x}-*At*UBC35) wiederholt. Keiner der drei Reaktionsansätze zeigte ein Signal im anti-Ubiquitin Western Blot, das einem 'Ubiquitin-Schmier' ähnelt (Abb. 3.19B). Als Positivkontrolle diente hier die E3 Ligase BRG2 aus *N. benthamiana*. Die Resultate deuten darauf hin, dass XopS vermutlich keine biochemische Funktion als E3-Ligase besitzt.

A

ATP	+	+	-	+	+	-	+
Ub	+	+	+	+	+	+	+
E1	+	-	+	+	-	+	+
E2	+	+	+	+	+	+	+
GST-XopS	-	+	+	+	-	-	-
GST-XopL	-	-	-	-	+	+	+



B

ATP	+	+	+	+
Ub	+	+	+	+
E1	+	+	+	+
E2	×	×	•	■
MBP-BRG2	+	-	-	-
MBP-XopS	-	+	+	+

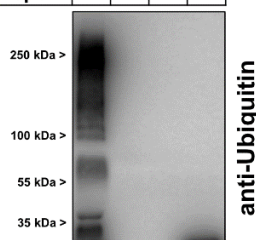


Abbildung 3.19: XopS hat unter den getesteten Bedingungen keine *in vitro* E3 Ligaseaktivität.

(A) Das aus *E. coli* aufgereinigte rekombinante GST-XopS wurde auf seine Aktivität als E3 Ligase überprüft, indem es zusammen mit allen weiteren notwendigen Komponenten der Ubiquitinierungskaskade in einem Reaktionsansatz inkubiert wurde. Als Positivkontrolle diente der Einsatz von GST-XopL als bereits bestätigte E3 Ligase (Spur 8). E1-aktivierendes Enzym: *At*UBA1, E2-konjugierendes Enzym: *At*UBC8. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze denen jeweils eine notwendige Komponente fehlte. Nach 1 h bei 30°C wurden jeweils 20 µL der Reaktionsansätze auf zwei getrennte SDS-Gradientengele (4-15%) aufgetragen, gefolgt von einer Western Blot Analyse. Die E3 Ligaseaktivität wurde mittels anti-Ubiquitin Antikörper analysiert. GST-XopS und GST-XopL wurden mittels anti-GST Antikörpers detektiert. (B) Die potentielle enzymatische Aktivität von XopS als E3 Ligase wurde unter Verwendung verschiedener E2-konjugierenden Enzyme erneut überprüft. Die aus *E. coli* aufgereinigte rekombinante MBP-BRG2 E3 Ligase diente als Positivkontrolle (Spur 1). Eingesetzte E2-konjugierende Enzyme: × = *At*UBC8, • = UbcH5b, ■ = *At*UBC35. E1-aktivierendes Enzym: *At*UBA1. Nach 1 h bei 30°C wurden 20 µL der Reaktionsansätze auf ein SDS-Gradientengel (4-15%) aufgetragen, gefolgt von einer Western Blot Analyse. Die E3 Ligaseaktivität wurde mittels anti-Ubiquitin Antikörper analysiert.

3.2. WRKY40 und seine Rolle in der kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion

Nachdem die Interaktion zwischen dem Typ-III Effektor XopS und dem *NbWRKY40* TF und seinen Orthologen *AtWRKY40* und *CaWRKY40a* auf verschiedenste Weise bestätigt werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des Transkriptionsfaktors während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und der suszeptiblen Wirtspflanze Paprika untersucht werden.

3.2.1. Eine Infektion mit *Xcv* induziert die Transkription von *CaWRKY40a* in suszeptiblen Paprika Pflanzen

Es ist bekannt, dass die Genexpression vieler WRKY Transkriptionsfaktoren in Antwort auf Abwehr-assoziierte Signalmoleküle induziert wird (Eulgem *et al.*, 2000). So sollte zunächst eine Infektion suszeptibler Paprika Blätter mit *Xcv* WT (1×10^8 CFU mL⁻¹) Aufschluss darüber geben, ob die Pflanzen in Antwort auf das Pathogen eine Hochregulierung des *CaWRKY40a* Transkripts einleiten. Während die mRNA-Menge in naiven Kontrollpflanzen, die lediglich mit 10 mM MgCl₂ (*mock*) infiltriert worden waren, beinahe nicht nachweisbar war, führte die Infektion mit *Xcv* WT 10 hpi zu einer ca. 150-fachen Induktion der *CaWRKY40a* Transkriptmenge (Abb. 3.20A). In Vorarbeiten zu dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass sich die Genexpression von *CaWRKY40a* in Antwort auf einen SA-Stimulus induzieren lässt (Abb. 3.20B). Dabei erreicht dessen Expression vier Stunden nach Behandlung mit einer 5 mM SA-Lösung seinen Höhepunkt. Bereits acht Stunden nach dem gegebenen Stimulus nimmt das in der qRT-PCR gemessene mRNA-Level stark ab, was zu einer Restexpression von lediglich ca. 20% führt. Diese Daten konnten in unabhängigen Experimenten bestätigt werden, indem Paprika WT Blätter für vier Stunden mit SA besprüht wurden und das mRNA-Level von *CaWRKY40a* im Anschluss über eine qRT-PCR bestimmt wurde. Während ohne SA-Behandlung kaum Transkript gemessen werden konnte, wurde die Genexpression von *CaWRKY40a* durch die SA Behandlung stark induziert (Abb. 3.20C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass auch die Transkription des *CaWRKY40a* TFs in Antwort auf Abwehrsignale ausgelöst wird.

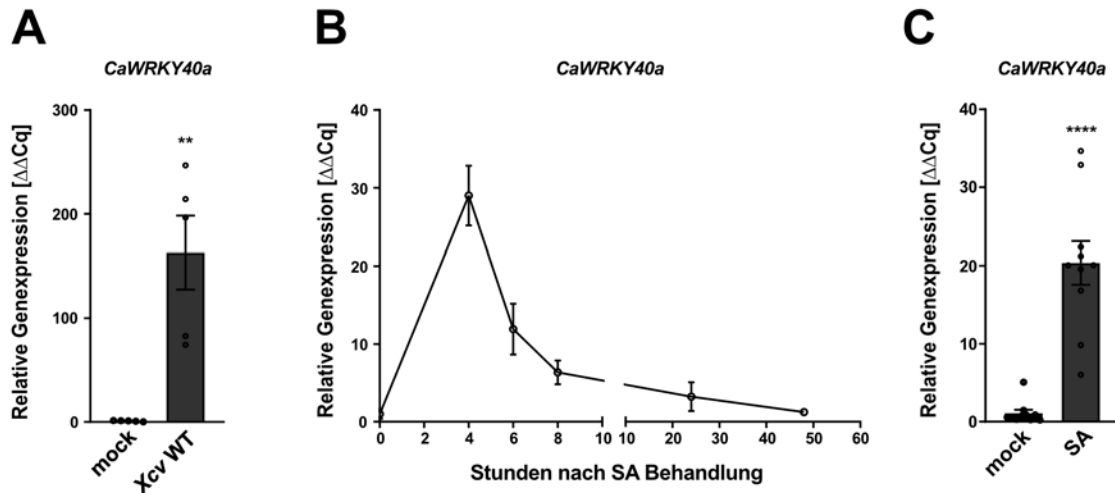


Abbildung 3.20: Die Genexpression von *CaWRKY40a* wird in Antwort auf Abwehrsignale induziert.

(A) Blätter von susceptiblen Paprika Pflanzen wurden *per* Druckinfiltration mit 10 mM $MgCl_2$ (*mock*) oder mit *Xcv* Wildtyp (WT) mit einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL^{-1} infiziert. 10 Stunden nach der Infektion wurde RNA aus dem infiltrierte Blattmaterial extrahiert, die mRNA-Level von *CaWRKY40a* in infiziertem Blattgewebe wurden mittels qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in *mock*-infiltrierten Pflanzen verglichen. *Tubulin* (*CaTUB*) diene als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 5$ biologischen Replikaten \pm Standardfehler SE. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit **, $P < 0.01$ gekennzeichnet. (B) Zeitkursexperiment der *CaWRKY40a* Genexpression in Antwort auf Salicylsäure (SA). Paprika Blätter wurden mit 5 mM SA besprüht (0 Stunden nach SA Behandlung) und es wurden Proben für eine Quantifizierung des mRNA-Levels von *CaWRKY40a* mittels qRT-PCR zu angegebenen Zeitpunkten genommen. Jeder Datenpunkt zeigt $n = 3$ biologische Replikate \pm Standardfehler SE. *Actin* (*CaActin*) diene als Referenzgen. Dieses Experiment wurde von Dr. Tiziana Guerra (IGZ, Großbeeren) durchgeführt. (C) Die SA-abhängige Induktion der *CaWRKY40a* Genexpression 4 h nach Behandlung von Paprika Blättern mit 5 mM SA wurde bestätigt. Die Expression von *CaWRKY40a* in SA-behandelten Blättern wurde jener in nicht behandelten Pflanzen (*mock*) gegenübergestellt. *Ubiquitin* (*CaUBI-3*) diene als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 10$ biologischen Replikaten \pm Standardfehler SE. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet.

3.2.2. *CaWRKY40a* ist an der Abwehr von *Xcv* während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion beteiligt

Um den Einfluss von *CaWRKY40a* während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion zu untersuchen, wurde die Methode der Virus-induzierten Genstilllegung (VIGS, für *Virus-Induced Gene Silencing*) angewendet. Dabei wurde ein in den *Tabak-Rattle-Virus*-Vektor pTRV2 (TRV für *Tobacco Rattle Virus*) kloniertes Fragment des *CaWRKY40a* Zielgens über Agrobakterien in zehn Tage alte Paprika Keimblätter (pTRV2-*CaWRKY40a*) transformiert. Ein in den pTRV2 kloniertes *GFP* Fragment wurde parallel dazu über Agrobakterien in die Keimblätter von Kontrollpflanzen (pTRV2-*GFP*) eingebracht. Die alleinige Transformation des *CaWRKY40a* Stilllegungs-Konstrukts führte im Vergleich zu den mit pTRV2-*GFP* transformierten Kontrollpflanzen zu keiner makroskopisch sichtbaren, phänotypischen Wachstumsveränderung (Abb. 3.21A).

Die Quantifizierung der *CaWRKY40a* Transkriptmenge erfolgte drei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der Stilllegungs-Konstrukte über eine qRT-PCR. Da die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, dass die *CaWRKY40a* Expression in naiven Paprika Pflanzen kaum detektierbar war, wurde ein Blatt einer jeden pTRV2-*GFP* und pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanze geerntet und mit einer 5 mM SA-Lösung besprüht. Vier Stunden nach Behandlung wurden die Blätter beprobt und die mRNA-Menge von *CaWRKY40a* bestimmt. So konnte eine signifikante Herunterregulierung des *CaWRKY40a* Transkripts in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen im Vergleich zu den pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 3.21B).

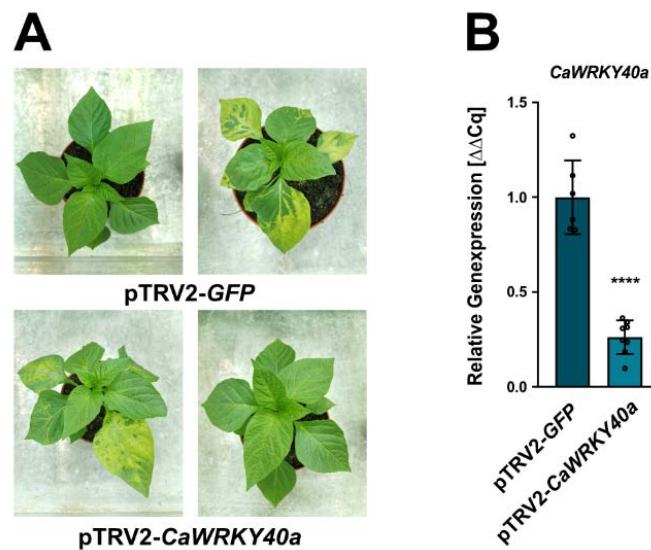


Abbildung 3.21: Verifizierung der Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Genexpression in pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen.

(A) Phänotypische Merkmale von pTRV2-*GFP* (Kontrolle) und pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen drei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der *silencing*-Konstrukte für die Virus-induzierte Genstilllegung (VIGS). (B) Drei Wochen nach der Infiltration der angegebenen *silencing*-Konstrukte wurde je ein Blatt pro Pflanze für 4 h mit 5 mM SA behandelt. Anschließend wurde RNA aus dem behandelten Blattmaterial extrahiert und die mRNA-Mengen von *CaWRKY40a* in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen. *Tubulin* (*CaTUB*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD ($n = 6$ für pTRV2-*GFP* und $n = 8$ für pTRV2-*CaWRKY40a*). Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit ****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine Herunterregulierung von *CaWRKY40a* zur Inhibierung des *Xcv* Bakterienwachstums beiträgt. Dazu wurden pTRV2-*CaWRKY40a* und pTRV2-*GFP* Pflanzen mit dem virulenten *Xcv* WT Stamm (1×10^5 CFU mL⁻¹) über Druckinfiltration infiziert. Fünf Tage später wurde der Bakterientiter im infizierten Blattgewebe bestimmt. Im Vergleich zu den pTRV2-*GFP* Pflanzen, war die Vermehrung von *Xcv* WT in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen wesentlich geringer (Abb. 3.22A). Parallel dazu wurden je ein weiteres Blatt mit dem *xopS*-defizienten Stamm *Xcv* Δ *xopS* infiziert.

Auch in diesem Falle war der bestimmte *Xcv* Δ *xopS* Bakterientiter in pTRV2-*CaWRKY40a* Blattproben fünf Tage nach Infektion signifikant geringer als der in pTRV2-*GFP* Pflanzen bestimmte (Abb. 3.22B). Bei einem Vergleich der Bakterientiter von *Xcv* WT und *Xcv* Δ *xopS* in pTRV2-*GFP* Pflanzen, deren Transkriptom dem einer Paprika WT Pflanze gleichkommt, war kein Wachstumsunterschied zu erkennen (Abb. 3.22C). Anhand dessen konnte der Befund von Schulze und Kollegen (Schulze *et al.*, 2012), dass XopS bei einer Infektion über Druckinfiltration keinen Einfluss auf das *Xcv* Wachstum hat, bestätigt werden. Dies bekräftigt wiederum die Schlussfolgerung aus dem Abschnitt 3.1.3.3, dass XopS vor allem ein wichtiger Virulenzfaktor im Kampf gegen die präinvasive Immunantwort ist. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der *CaWRKY40a* Transkriptmenge zu einer erhöhten Resistenz von suszeptiblen Paprika Pflanzen gegenüber *Xcv* führt.

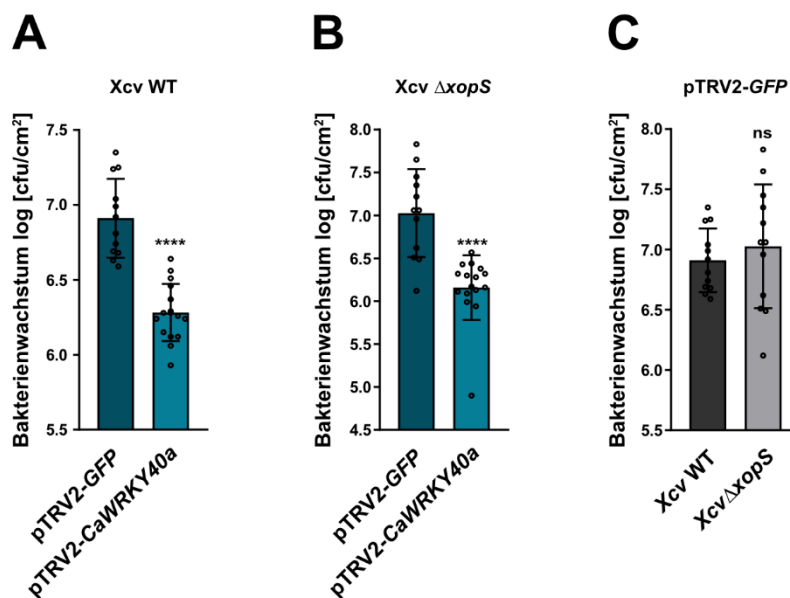


Abbildung 3.22: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika steigert die Abwehr gegenüber einer Infektion mit *Xcv*.

(A) und (B) Das Bakterienwachstum von (A) *Xcv* Wildtyp (WT) und (B) *Xcv* Δ *xopS* in pTRV2-*CaWRKY40a* wurde mit jenem in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen. Paprika Blätter wurden *per* Druckinfiltration mit *Xcv* WT bzw. *Xcv* Δ *xopS* bei einer Bakteriendichte von 1×10^5 CFU mL⁻¹ infiziert und koloniebildende Einheiten im infizierten Blattgewebe wurden fünf Tage nach Infektion quantifiziert. Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens n = 6 biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) \pm Standardabweichung SD (n = 6 für pTRV2-*GFP* und n = 8 für pTRV2-*CaWRKY40a*). Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit ****, P < 0.0001 gekennzeichnet.

(C) Das Bakterienwachstum von *Xcv* Wildtyp (WT) und *Xcv* Δ *xopS* in pTRV2-*GFP* Pflanzen aus (A) und (B) wurde einander gegenübergestellt. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt. ns = nicht signifikant.

3.2.3. Die Genstilllegung von *CaWRKY40a* beeinflusst die Symptomentwicklung während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion

Die Infektion mit *Xcv* WT von pTRV2-*CaWRKY40a* und pTRV2-*GFP* Pflanzen lies eine interessante phänotypische Beobachtung zu. Während pTRV2-*GFP* Pflanzen starke Chlorosen im infizierten Blattgewebe entwickelten, war die Ausprägung der typischen Krankheitssymptome bei *CaWRKY40a* herunterregulierten Pflanzen erheblich geringer (Abb. 3.23).

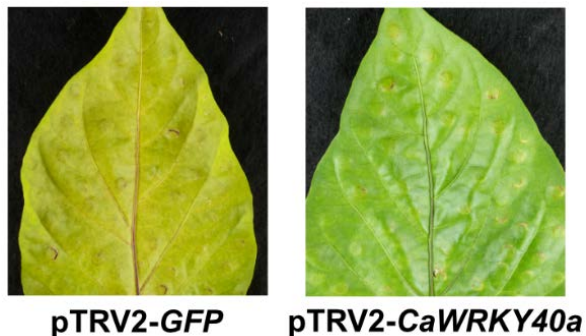


Abbildung 3.23: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika führt bei einer Infektion mit *Xcv* zu einer reduzierten Symptomausprägung.

Die Ausprägung von Krankheitssymptomen in pTRV2-*GFP* und pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen wurde fünf Tage nach einer Infektion über Druckinfiltration mit *Xcv* Wildtyp (WT) mit einer Bakteriendichte von 1×10^5 CFU mL⁻¹ photographisch festgehalten.

Um diese phänotypischen Unterschiede zu quantifizieren, wurde der Chlorophyllgehalt im infizierten Gewebe bestimmt. In infizierten pTRV2-*GFP* Pflanzen war im Vergleich zu infizierten pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen ein signifikant verminderter Chlorophyllgehalt messbar, was im Einklang mit den entstandenen Blattchlorosen war (Abb. 3.24A). Die Ausbildung von Chlorosen stört die Membranintegrität von Zellen, was einen Ionenausstrom in den Apoplasten und einen daraus resultierenden Zelltod zur Folge haben kann. So wurde als weiteres quantitatives Maß zur beobachteten Phänotyp Ausprägung die Ionen Leckage im infizierten Blattgewebe gemessen. Dabei konnte in infizierten pTRV2-*GFP* Blättern ein höherer Ionen Verlust verzeichnet werden als in infizierten pTRV2-*CaWRKY40a* Blättern (Abb. 3.24B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Letztere während einer Infektion ein höheres Maß an Gewebeintegrität beibehalten. Dies korreliert sowohl mit den makroskopischen Beobachtungen als auch mit den Daten aus der Bestimmung des Chlorophyllgehalts.

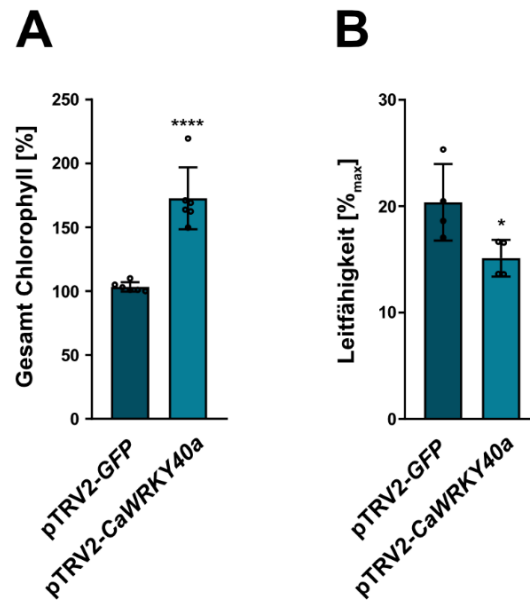


Abbildung 3.24: Quantifizierung der Symptomausprägung in Paprika VIGS Pflanzen nach Infektion mit *Xcv*.

(A) Die Symptomausprägung in infizierten pTRV2-*GFP* und pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen fünf Tage nach Druckinfiltration von *Xcv* Wildtyp (WT) mit einer Bakteriendichte von 1×10^5 CFU mL⁻¹ wurde über die Messung des Chlorophyllgehalts quantifiziert. Infizierte pTRV2-*GFP* Pflanzen dienten als Kontrolle. Der prozentuale Anteil des Gesamt-Chlorophyllgehalts in infizierten Pflanzen wurde über den Vergleich zur pTRV2-*GFP* Kontrolle (100%) bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit ****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet. (B) Fünf Tage nach Infektion von pTRV2-*GFP* und pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen mit *Xcv* Wildtyp (WT) wurde die Ionen-Leckage aus dem infizierten Blattgewebe quantifiziert und einander gegenübergestellt. Eine zweite Messung erfolgte nach dem Aufkochen der Proben bei 95°C für 1 h (maximal mögliche Ionen-Leckage). Die Ionen-Leckage im Infizierten Blattgewebe wird als prozentualer Anteil der maximal möglichen Ionen-Leckage (100%) angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 4$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$ gekennzeichnet.

3.2.4. Die Genstilllegung von *CaWRKY40a* fördert die Akkumulation von SA während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion

Die Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Genexpression während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xcv* und seiner suszeptiblen Wirtspflanze Paprika hat eine vergleichbare Auswirkung auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen wie es die Infektion einer WT Pflanze mit dem *xopS*-defizienten Stamm *Xcv* Δ *xopS* hat. Dies lässt vermuten, dass eine Wechselwirkung zwischen XopS und *CaWRKY40a* zur Virulenz von *Xcv* beiträgt. Da eine Infektion mit *Xcv* Δ *xopS*, im Vergleich zu einer *Xcv* WT Infektion, zu einer erheblichen Akkumulation des in die Pathogenabwehr verwickelten Phytohormons SA führte, sollte hier überprüft werden, ob auch der Transkriptionsfaktor *CaWRKY40a* einen Einfluss auf die Akkumulation von SA hat. Dies sollte erneut über die Genstilllegung von *CaWRKY40a* mittels VIGS erfolgen.

Nachdem die *CaWRKY40a* mRNA-Mengen der pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen jenen der pTRV2-*GFP* Pflanzen gegenübergestellt wurden (Abb. 3.25A) und Pflanzen mit dem geringsten *CaWRKY40a* mRNA-Level ausgewählt wurden, folgte eine Infektion von *Xcv* WT (1×10^8 CFU mL⁻¹) über Druckinfiltration. Zwei Tage nach der Infektion wurde das infizierte Blattmaterial geerntet und der Gesamt-SA-Gehalt wurde bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen während einer Infektion mit *Xcv* WT in der Lage sind, mehr Salicylsäure zu akkumulieren als die pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen (Abb. 3.25B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *Xcv* den pflanzlichen Hormonhaushalt während einer kompatiblen Interaktion möglicherweise über die vom T3E XopS vermittelte Stabilisierung des WRKY40 TFs stört.

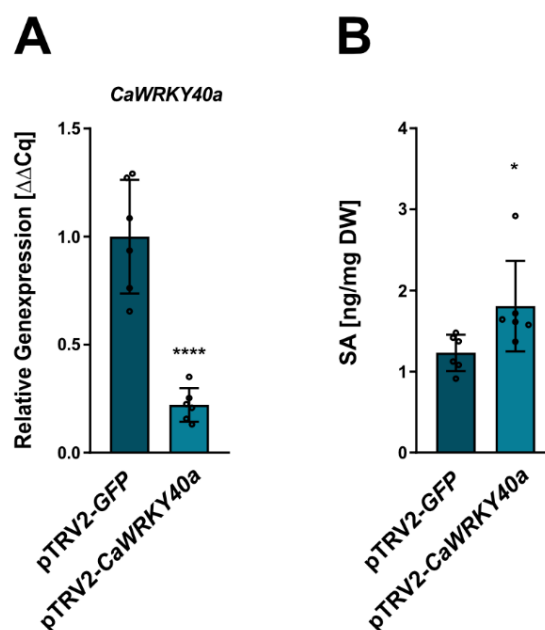


Abbildung 3.25: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika unterstützt die Akkumulation von SA bei einer Infektion mit *Xcv*.

(A) Die Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Genexpression in pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen wurde drei Wochen nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation der *silencing*-Konstrukte pTRV2-*GFP* (Kontrolle) oder pTRV2-*CaWRKY40a* in die Keimblätter von Paprika Pflanzen durch eine vierstündige Behandlung einzelner Paprika Blätter mit 5 mM SA und anschließender qRT-PCR Analyse verifiziert. Dabei wurde das mRNA-Level von *CaWRKY40a* in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen jenem in pTRV2-*GFP* Pflanzen gegenübergestellt. *Ubiquitin* (*CaUBI-3*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit ****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet. (B) pTRV2-*GFP* (Kontrolle) oder pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen aus (A) wurden mit *Xcv* Wildtyp (WT) mit einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL⁻¹ per Druckinfiltration infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde der Gesamt-SA-Gehalt im infizierten Blattgewebe quantifiziert. DW = *Dry weight*; Trockengewicht. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$ gekennzeichnet.

3.2.5. WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assoziierten Genexpression

Für die Modellpflanze Arabidopsis wurde bereits postuliert, dass WRKY40, zusammen mit weiteren WRKY Transkriptionsfaktoren, als Negativregulator der Abwehr gegen biotrophe Pathogene fungiert (Xu *et al.*, 2006; Pandey & Somssich, 2009). Zudem konnten Birkenbihl und Kollegen zeigen, dass *AtWRKY40* die PAMP-assoziierte Expression von Abwehrgenen inhibiert (Birkenbihl *et al.*, 2017b). Die erhöhte Resistenz von pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen gegenüber einer Infektion mit *Xcv* WT lässt vermuten, dass auch der Paprika WRKY40a TF die Expression von Abwehrgenen während einer kompatiblen Interaktion negativ beeinflussen könnte. Diese Hypothese sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Dazu wurden Studien an beiden Arabidopsis WRKY40 Orthologen *NbWRKY40* und *CaWRKY40a* durchgeführt.

3.2.5.1. Die mit XopS interagierenden WRKY40 TFs besitzen keine Transaktivierungs-Aktivität in Hefe

Eine Möglichkeit, erste Indikationen auf die Funktionsweise eines Transkriptionsfaktors zu erhalten ist der sogenannte Hefe-Transaktivierungs-Assay (engl. *Yeast Transactivation Assay*). Dabei werden die offenen Leseraster der zu untersuchenden TFs in einen GAL4 DNA-Bindedomänen-Vektor (BD) kloniert und in einen Hefe Reporterstamm transformiert. Ein Wachstum des Hefestamms auf entsprechendem Selektionsmedium zeigt an, dass der TF in der Lage ist, über die Bindung an den Promotor eines Reportergens, dessen Transkription zu aktivieren (Ye *et al.*, 2004). Zur Funktionsanalyse der *NbWRKY40* und *CaWRKY40a* TFs wurden beide Vollängen-ORFs in den Vektor pGBT9 kloniert, um damit Fusionsproteine mit der GAL4 DNA-Bindedomäne zu generieren. Der Vollängen-ORF von *NbWRKY8*, einem TF mit nachgewiesener Funktion als Positivregulator der Genexpression (Ishihama *et al.*, 2011), wurde ebenfalls in pGBT9 kloniert und diente als Positivkontrolle. Die Vektoren wurden, nebst einer weiteren Positivkontrolle und einer Negativkontrolle, einzeln in den Hefe Reporterstamm Y190 transformiert. Die Transformanten wurden im Anschluss auf ihre Kapazität zur Aktivierung zweier Reportergene, *HIS3* und *LacZ*, überprüft (Abb. 3.26). Während BD-*NbWRKY8*, bestätigt durch das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium und durch die starke Blaufärbung im *LacZ*-Filter-Assay, eine starke *trans*-aktivierungs-Aktivität zeigte, konnten weder BD-*NbWRKY40* noch BD-*CaWRKY40a* die Transkription der Reportergene induzieren. Wurde nur der Leervektor pGBT9 in Y190 transformiert, blieb die Aktivierung der Reportergene ebenfalls aus.

Im Gegensatz dazu zeigte die zweite Positivkontrolle, bei der das Volllängen-ORF von GAL4 in den Hefe Reporterstamm kloniert worden war, wieder eine Aktivierung beider Reporter gene. Diese Resultate geben einen ersten Hinweis darauf, dass die untersuchten WRKY40 TFs möglicherweise eine Repressoraktivität besitzen.

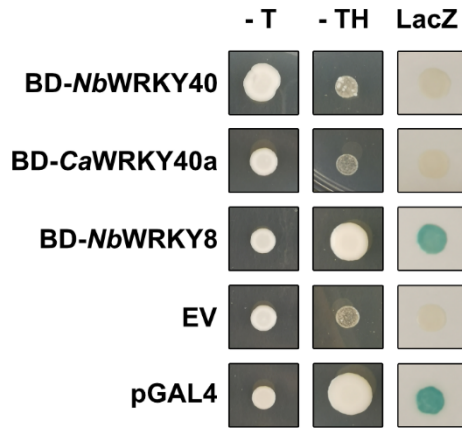


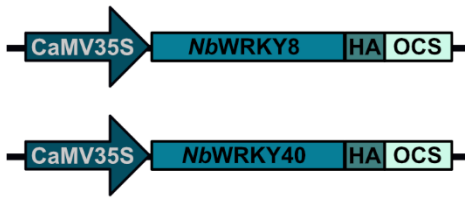
Abbildung 3.26: Der mit XopS interagierende WRKY40 TF besitzt keine Transaktivierungs-Aktivität in Hefe.

Angegebene WRKY Proteine wurden als GAL4 DNA-BD Fusionsproteine im Hefestamm Y190 exprimiert. Die *HIS3* und *LacZ* Reporter gen-Aktivität wurde drei Tage nach dem Stempeln der transformierten Hefekolonien auf Selektionsmedium untersucht. Der Leervektor pGBT9 (EV) diente als Negativkontrolle während der pGAL4 Vektor (pGAL4) als Positivkontrolle fungierte. –T, Hefe-Selektionsmedium ohne Trp. –TH, Hefe-Selektionsmedium ohne Trp und His. Wachstum auf –TH zeigt die Expression des Reporter gens *HIS3*. Die Blaufärbung bei *LacZ* zeigt die Aktivität des *LacZ* Reporter gens. *NbWRKY40*, *Nicotiana benthamiana* WRKY40; *CaWRKY40a*, *Capsicum annuum* WRKY40a; *NbWRKY8*, *Nicotiana benthamiana* WRKY8.

3.2.5.2. WRKY40 besitzt eine Repressoraktivität *in planta*

Das im vorangehenden Absatz beschriebene und verwendete Hefe-System ermöglicht es nicht, eine Aussage über die potentielle Repressoraktivität eines Transkriptionsfaktors *in planta* zu treffen. Um die Repressoraktivität des WRKY40 TFs *in planta* zu bestätigen, wurde *NbWRKY40* auf seine Fähigkeit hin, die Expression eines in *N. benthamiana* transient exprimierenden Reporter genkonstrukts zu inhibieren, überprüft. Dazu wurde eine vier W-Boxen enthaltende Nukleotidsequenz vor den minimalen CaMV35S (Blumenkohlmosaikvirus-35S, von *Cauliflower Mosaic Virus-35S*) Promotor, der die Expression des β -Glucuronidase (*GUS*) Reporter gens kontrolliert, kloniert (Reporterkonstrukt *pWbox::GUS*). Da W-Boxen in Promotorregionen von Zielgenen als Erkennungs- bzw. Binde-segmente für WRKY TFs dienen, sollte durch eben beschriebene Fusion die Möglichkeit für *NbWRKY40* geschaffen werden, an den minimalen CaMV35S Promotor des *GUS* Reporter gens zu binden und dessen Aktivität zu beeinflussen. In Abb. 3.27 sind die für den *in planta* *GUS* Aktivitätstest transient in *N. benthamiana* exprimierten Konstrukte schematisch dargestellt.

Effektorkonstrukte



Reporterkonstrukt



Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der für den transienten *in planta* GUS-Assay verwendeten Effektor- und Reporterkonstrukte zur Untersuchung der *W-Box*-Promotor gesteuerten Reporteragenaktivität.

Die Effektorstrukturen beinhalten entweder *NbWRKY8* oder *NbWRKY40* unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV35S Promotors. Eine C-terminale HA-Markierung ermöglichte die Immunodetektion der Proteine. Das β -Glucuronidase (*GUS*) Reporteragen wurde unter die Kontrolle eines minimalen CaMV35S (*m35S*) Promotors mit einer vorgeschalteten Oligonukleotidsequenz bestehend aus vier *W*-Boxen (TTGAC(C/T)) gestellt. OCS = Terminator der Octopinsynthase.

Die transiente Ko-Expression des *pWbox::GUS* Konstruktes mit einem unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors stehenden *NbWRKY8* TFs (Effektorkonstrukt *NbWRKY8*-HA) führte, verglichen zur Leervektor-Kontrolle, zu einer signifikanten Induktion der *GUS* Aktivität (Abb. 3.28A). Durch die Bestätigung der Annahme, dass der bekannte Positivregulator WRKY8 die Aktivität der β -Glucuronidase hochreguliert, konnte die Funktionalität des hier verwendeten Ansatzes sichergestellt werden. Im Gegensatz dazu, führte die Ko-Expression des CaMV35S-gesteuerten *NbWRKY40* (Effektorkonstrukt *NbWRKY40*-HA) zu einer eindeutigen Repression der *GUS* Aktivität bis unter dessen Aktivitätslevel in der Leervektor Kontrolle (Abb. 3.28A). Die Expression beider Effektorstrukturen wurde über eine anti-HA Western Blot Analyse bestätigt (Abb. 3.28B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass WRKY40 durch Bindung an die in *pWbox::GUS* enthaltenen *W*-Boxen, die basale, durch den minimalen CaMV35S Promotor vermittelte, *GUS* Expression reprimieren kann. Dementsprechend kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass der Transkriptionsfaktor WRKY40 als Negativregulator der Genexpression fungiert.

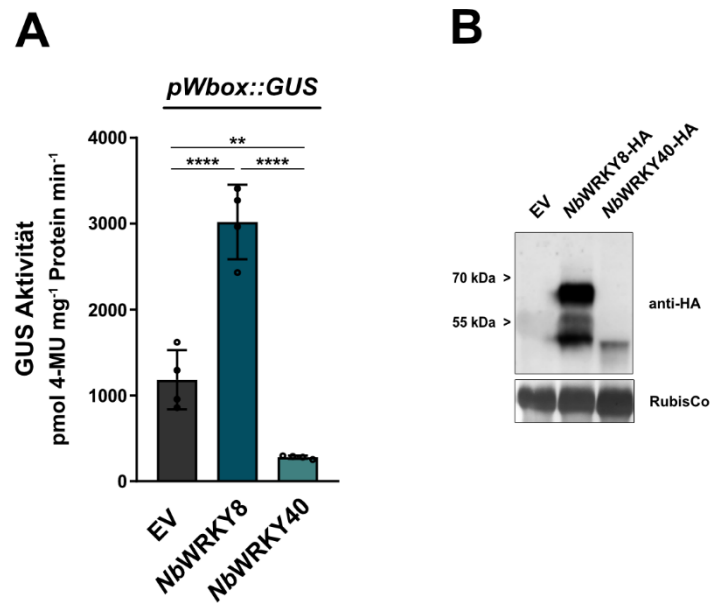


Abbildung 3.28: Die transiente Expression von *NbWRKY40* in *N.benthamiana* reprimiert die W-Box-Promotor gesteuerte GUS Aktivität.

(A) Das β -Glucuronidase (*GUS*) Reportergen unter der Kontrolle des chimärischen Promotors bestehend aus vier W-Boxen fusioniert mit dem minimalen CaMV35S (*m35S*) Promotor wurde transient mit den Effektoronstrukten HA-Leervektor (EV), *NbWRKY8*-HA oder *NbWRKY40*-HA in *N. benthamiana* ko-exprimiert. Die GUS Aktivität wurde 48 h nach Agrobakterien-Infiltration bestimmt und wird in pmol 4-Methylumbelliferon (4-MU) mg protein⁻¹ min⁻¹ angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 4 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit **, P = 0.0010 oder ****, P < 0.0001 gekennzeichnet. (B) Western Blot Analyse mittels anti-HA Antikörper zur Verifizierung der Proteinexpression der Effektoronstrukte in Agrobakterien-infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Die Proben wurden 48 h nach Infiltration geerntet. Die Abbildung zeigt die Proteinexpression in einem Proben-Pool bestehend aus den vier biologischen Replikaten die zur in (A) gezeigten Analyse verwendet wurden. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

3.2.5.3. *CaWRKY40a* beeinflusst die Expression Abwehr-assoziiertes Gene während einer kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion

Nachdem festgestellt werden konnte, dass es sich bei den hier untersuchten orthologen WRKY40 TFs tatsächlich um Transkriptionsfaktoren mit Repressorfunktion handeln sollte, sollte deren Einfluss auf die Abwehr-assoziierte Genexpression während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xcv* und seiner Wirtspflanze Paprika analysiert werden. So wurde erneut ein VIGS-Ansatz zur Genstilllegung von *CaWRKY40a* (pTRV2-*CaWRKY40a*) angewandt, um Genexpressionsanalysen durchzuführen. Drei Wochen nach der Agrobakterien-Infiltration der Genstilllegungs-Konstrukte wurde nach vierstündiger SA-Behandlung die Herunterregulierung von *CaWRKY40a* in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen bestimmt.

Dazu wurde die *CaWRKY40a* Expression sowohl in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen als auch in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen *per* qRT-PCR quantifiziert und anschließend verglichen. So konnte eine ca. 50-60%ige Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Expression in ausgewählten pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen ermittelt werden (Abb. 3.29A). Neben den Kontrollpflanzen, wurden effizient herunterregulierte pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen über Druckinfiltration mit einem virulenten *Xcv* WT Stamm (1×10^8 CFU mL⁻¹) infiziert. Zehn Stunden später wurden Proben des infizierten Blattgewebes genommen und einer Expressionsanalyse Pathogen-induzierter Abwehrgene über qRT-PCR unterzogen.

Da Zielgene des WRKY40a TFs in Paprika zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt waren, wurden für diese Analyse zum einen Gene gewählt, deren Expression nachweislich von WRKY TFs reguliert wird, wie *CaCDPK15* (Shen *et al.*, 2016) und *CaPR4* (Huh *et al.*, 2015). Zum anderen wurde die Expression von *JAZ8* und *PRI* analysiert, die, basierend auf deren Regulation in Arabidopsis, als *bona fide* WRKY Zielgene betrachtet werden können (Pandey *et al.*, 2010; Birkenbihl *et al.*, 2017a). Grundvoraussetzung für die Bindung von WRKY TFs an eine Promotorregion ist, wie bereits beschrieben, dass diese charakteristische W-Boxen, bestehend aus der Kernsequenz ((T)TGAC(C/T)), beinhaltet. So wurden alle ausgewählten Gene auf den Besitz solcher W-Boxen innerhalb einer 2 kb langen Region, die dem Transkriptionsstartpunkt vorangelegen ist, überprüft (schematisch dargestellt in Abb. 3.30). Die Infektion mit virulenten *Xcv* WT Bakterien konnte zeigen, dass die Expression aller getesteten Gene in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen im Vergleich zur pTRV2-*GFP* Kontrolle signifikant höher war (Abb. 3.29B). Dieses Ergebnis suggeriert, dass die Genstilllegung von *CaWRKY40a* zu einer schnelleren und/oder ausgeprägteren Abwehrantwort auf transkriptioneller Ebene führt. Dies korreliert wiederum mit der beobachteten erhöhten Resistenz dieser Pflanzen gegenüber *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Abschnitt 3.2.2).

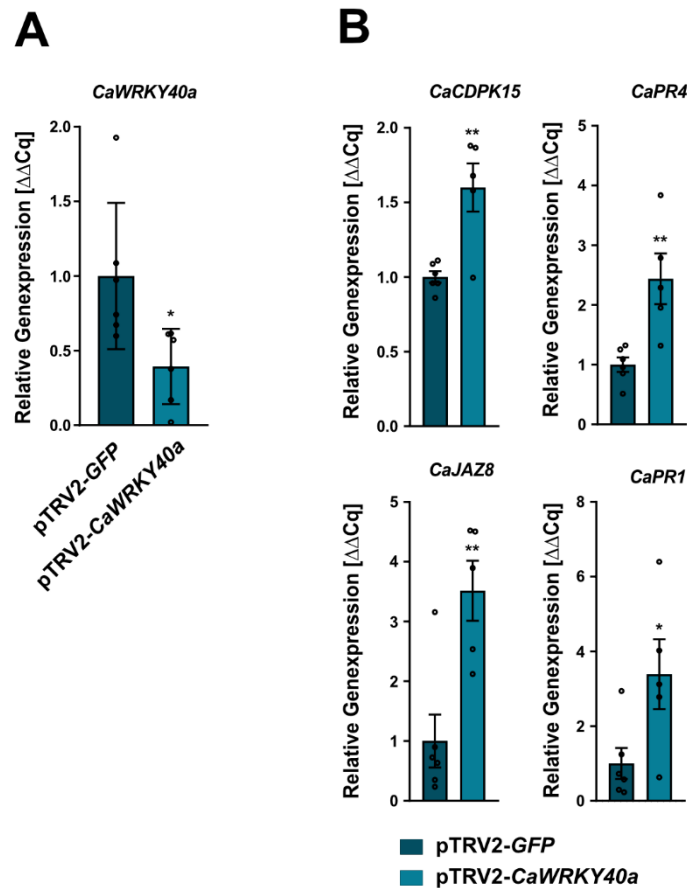


Abbildung 3.29: WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assoziierten Genexpression.

(A) Die Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Genexpression in pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen wurde drei Wochen nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation der *silencing*-Konstrukte pTRV2-*GFP* (Kontrolle) oder pTRV2-*CaWRKY40a* in die Keimblätter von Paprika Pflanzen durch eine vierstündige Behandlung einzelner Paprika Blätter mit 5 mM SA und anschließender qRT-PCR Analyse verifiziert. Dabei wurde das mRNA-Level von *CaWRKY40a* in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen jenem in pTRV2-*GFP* Pflanzen gegenübergestellt. *Ubiquitin (CaUBI-3)* diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$ gekennzeichnet. (B) Blätter von pTRV2-*GFP* (Kontrolle) und pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen wurden mit *Xcv* Wildtyp bei einer Bakteriendichte von 1×10^8 CFU mL^{-1} per Druckinfiltration infiltriert und 10 h nach Infektion wurden Proben zur RNA Extraktion genommen. Die mRNA-Level der vier angegebenen potentiellen *CaWRKY40* Zielgene in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen wurden über qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-*GFP* Pflanzen verglichen. *Ubiquitin (CaUBI-3)* diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens $n = 5$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD ($n = 6$ für pTRV2-*GFP* und $n = 5$ für pTRV2-*CaWRKY40a*). Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$ und **, $P < 0.01$ gekennzeichnet.

3.2.5.4. *CaWRKY40a* bindet an Promotorregionen potentieller Zielgene

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob die erhöhte Expression der untersuchten Gene in pTRV2-*CaWRKY40a* Pflanzen auf den Verlust der *CaWRKY40a* Bindung an deren Promotorregionen zurückzuführen war. Aufschluss darüber sollte die Durchführung einer EMSA (engl. für *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) Analyse geben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung des *CaWRKY40a* TFs an die Promotorregionen der potentiellen Zielgene *CaJAZ8* und *CaPR4* untersucht werden. Dazu wurde ein 150 bp langes und zwei prognostizierte W-Boxen enthaltendes Promotor Fragment eines jeden Gens *per PCR* aus genomischer Paprika DNA amplifiziert (schematisch dargestellt in Abb. 3.30).

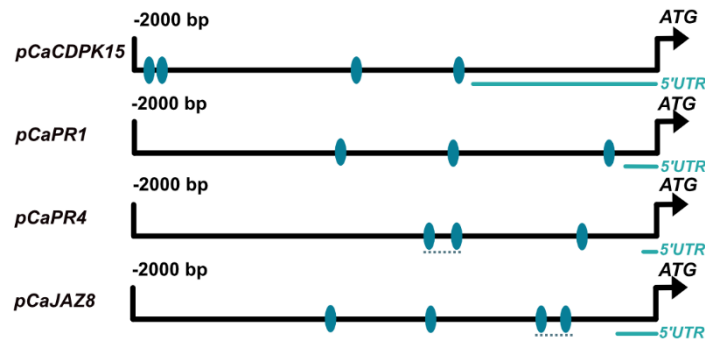


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung der 2 kb Promotorregionen stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle angezeigter putativer *CaWRKY40a* Zielgene.

Ellipsen zeigen die Positionen vorausgesagter W-Boxen. Gestrichelte Linien zeigen die Position der für den Elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungs-Assay (EMSA) eingesetzten Sonden. UTR = *Untranslated Region*, Untranslatierte Region. ATG = Startcodon.

Die dafür verwendeten *Primer* wurden an ihren 5'-Enden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY5 markiert, was wiederum zur CY5-Markierung der generierten Sonden führte. Der *CaWRKY40a* ORF wurde in den *E. coli* Expressionsvektor pMALc2 kloniert und das rekombinante, MBP-markierte Protein wurde über eine aus Amylose-Harz bestehende Matrix aufgereinigt. Des Weiteren wurde freies MBP auf dem gleichen Wege aufgereinigt und als eine der Negativkontrollen eingesetzt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Eluate wurde je 1 µg über ein SDS (von *Sodium Dodecyl Sulfate*)-Gel aufgetrennt und mit dem Coomassie-Farbstoff angefärbt (Abb. 3.31A). Die Abb. 3.31B bestätigt, dass MBP-*CaWRKY40a* in der Lage war, die zu untersuchenden, CY5-markierten Promotor Fragmente zu binden. Dies wird durch den Bandenmobilitäts-*Shift* in den Spuren 2 und 7 des dargestellten Gelbildes angezeigt. Um beurteilen zu können, wie spezifisch diese Bindung war, wurden sogenannte Kompetitoren, nicht-markierte Sonden, generiert. Dafür wurden die gleichen 150 bp Promotor Fragmente über eine PCR mit *Primern* ohne CY5-Markierung amplifiziert.

Ein 50-facher (50x) Überschuss an Kompetitor im Reaktionsansatz konnte die Proteinbindung der markierten Sonde mit höchster Effizienz verhindern, was auf eine hohe Spezifität der Bindung bzw. Komplexbildung hindeutet. In den Reaktionsansätzen, denen entweder kein Protein oder freies MBP zugesetzt worden war (Spur 1 und 6 bzw. 4, 5, 9 und 10), konnte kein Signal detektiert werden, das für eine Komplexbildung sprechen würde.

Die Ergebnisse der angewendeten EMSA-Methode lassen darauf schließen, dass sowohl *CaJAZ8* als auch *CaPR4* in Paprika mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt vom TF *CaWRKY40a* reguliert werden.

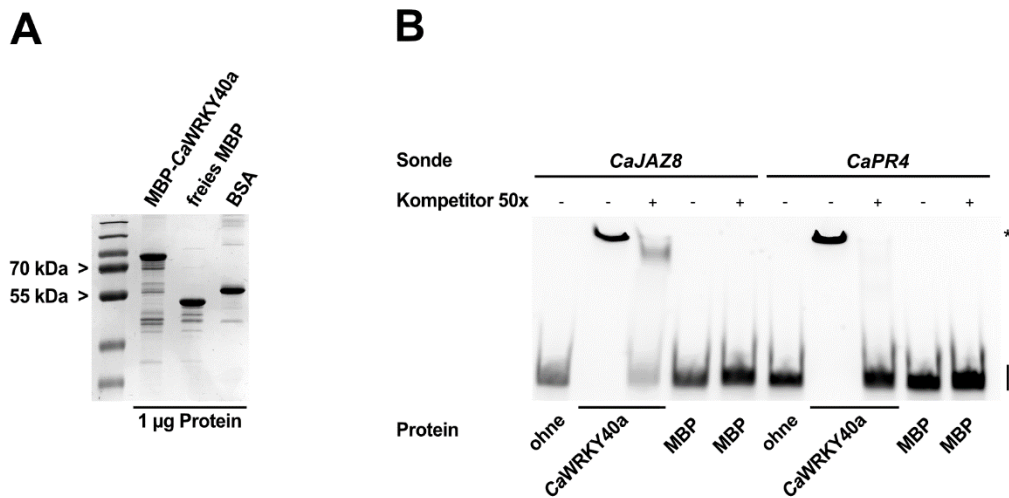


Abbildung 3.31: *CaWRKY40a* bindet an W-Boxen in den Promotorregionen von *CaJAZ8* und *CaPR4*.

(A) Die für die EMSA Analyse verwendeten rekombinanten Proteine (freies MBP und MBP-*CaWRKY40a*) wurden in *E. coli* exprimiert und über eine Amylose-Matrix aufgereinigt. Je 1 µg Protein wurden neben 1 µg BSA auf ein SDS-Gel geladen und die Proteine wurden anschließend zur Verifizierung der Proteinkonzentration mit Coomassie InstantBlue® angefärbt. (B) Die MBP-markierten, aufgereinigten Proteine wurden mit den Cy5-markierten, 150 bp langen Sonden, die aus den Promotorregionen von *CaJAZ8* und *CaPR4* amplifiziert worden waren, inkubiert. Jedes DNA-Fragment enthielt zwei vorgeschlagene W-Boxen. Protein-DNA Komplexe wurden von nicht-gebundenen Sonden über ein 5% TBE-Gel getrennt. Nicht-markierte Sonde wurde als Kompetitor mit einem 50-fachen (50x) Überschuss zur eingesetzten Cy5-markierten Sonde eingesetzt. Freies MBP diente als weitere Negativkontrolle. Auf der rechten Seite des Gels zeigt * spezifische verzögerte Protein-DNA Komplexe, während freie Sonden durch einen schwarzen Balken (l) angezeigt werden.

3.2.5.5. WRKY40 reprimiert die vom *CaPR4* Promotor kontrollierte Genexpression in *planta*

Im Laufe dieser Studie hat sich immer klarer abgezeichnet, dass der Transkriptionsfaktor WRKY40 durch die Interaktion mit dem Typ-III Effektorprotein XopS aus *Xcv* stabilisiert wird, und dass es sich hierbei um einen TF mit Funktion eines Negativregulators der Abwehr-assoziierten Genexpression handelt. Dies führte zu der Hypothese, dass XopS die Repressorfunktion des WRKY40 TFs möglicherweise verstärken würde. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die 2 kb lange Promotor Region stromaufwärts des *CaPR4* ORFs (*pCaPR4*) vor den ORF des *GUS* Reportergens kloniert (Reporterkonstrukt *pCaPR4::GUS*). Dieses Konstrukt wurde zusammen mit den Effektoronstrukten *NbWRKY8*-HA oder *NbWRKY40*-HA, beide unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors, über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* Blättern exprimiert.

Weitere *N. benthamiana* Blätter wurden außerdem mit eben genannten Kombinationen und einem zusätzlichen, CaMV35S-kontrollierten, Effektor-konstrukt XopS-GFP ko-infiltriert. Die generierten und verwendeten Konstrukte sind in Abb. 3.32 schematisch dargestellt.

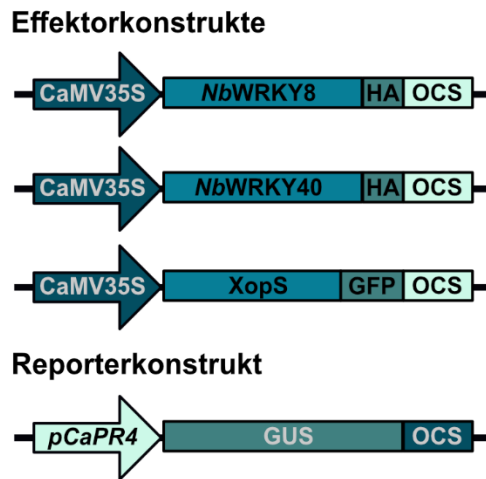


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der für den transienten *in planta* GUS-Assay verwendeten Effektor- und Reporter-konstrukte zur Untersuchung der PR4-Promotor gesteuerten Reporter-genaktivität.

Die Effektor-konstrukte beinhalteten entweder *NbWRKY8*, *NbWRKY40* oder XopS unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV35S Promotors. Eine C-terminale HA-Markierung bzw. eine C-terminale GFP Markierung ermöglichte die Immunodetektion der Proteine. Das β -Glucuronidase (*GUS*) Reporter-genkonstrukt beinhaltet eine 2 kb lange stromaufwärts von der *CaPR4* Translationsinitiationsstelle gelegene Region. OCS = Terminator der Octopinsynthase.

Die Abb. 3.33A zeigt das Ergebnis des transienten *in planta* GUS Aktivitäts-Assays. Das *pCaPR4* Promotor Fragment vermittelte bei einer Ko-Transformation mit der HA-Leervektorkontrolle (EV, für *Empty Vector*) eine leicht nachweisbare *GUS* Expression bzw. *GUS* Aktivität. Die alleinige Ko-Expression von XopS-GFP führte hingegen zu einer signifikanten Verminderung der *GUS* Aktivität, was sich vermutlich auf dessen Stabilisierung des endogenen *NbWRKY40* TFs zurückführen lässt. Die Expression des Effektor-konstrukts *NbWRKY8*-HA hatte keinen signifikanten Effekt auf die *pCaPR4*-abhängige *GUS* Aktivität und bei einer Ko-Expression von *NbWRKY8*-HA und XopS-GFP war letzteres auch nicht in der Lage, eine Reduktion der Reporter-gen-Aktivität zu induzieren. Die transiente Expression von *NbWRKY40*-HA wiederum führte zu einer starken Repression der *pCaPR4*-vermittelten *GUS* Aktivität, welche durch eine Ko-Expression von XopS-GFP noch leicht, aber nicht signifikant verstärkt wurde. Die Expression der Effektor-konstrukte wurde über einen anti-HA bzw. anti-GFP Western Blot nachgewiesen (Abb. 3.33B). Diese Resultate bestätigen die Hypothese, dass der TF WRKY40 und der T3E XopS, wahrscheinlich über seine Interaktion mit WRKY40, die vom *CaPR4*-Promotor gesteuerte Genexpression reprimieren können.

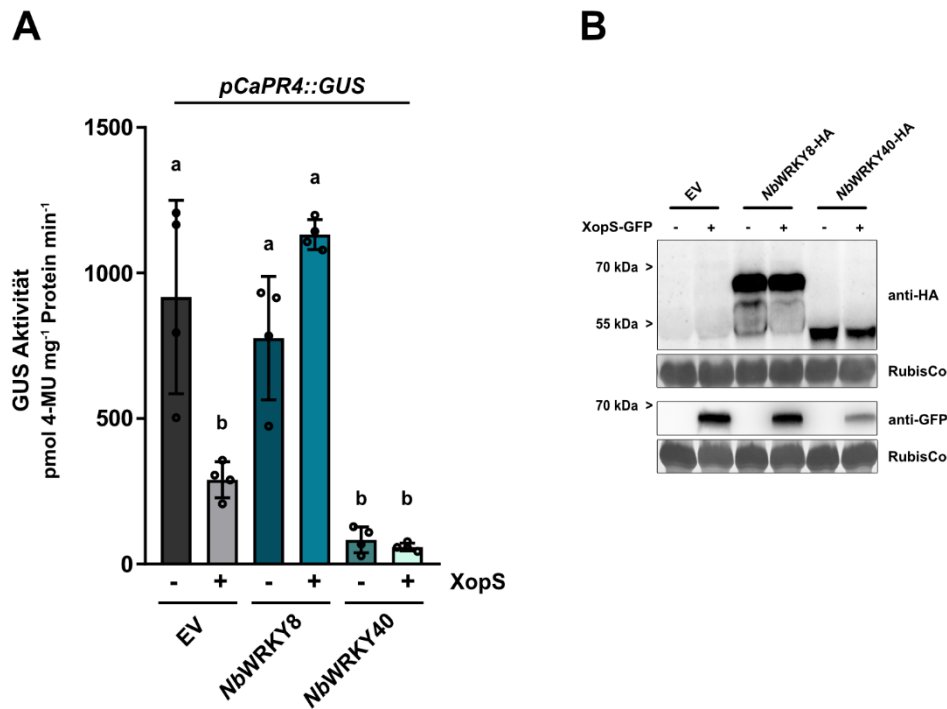


Abbildung 3.33: XopS und WRKY40 reprimieren die *CaPR4*-Promotor gesteuerte Reporterexpression.

(A) Transaktivierung des *pCaPR4::GUS* Reporterkonstrukts seitens der transient in *N. benthamiana* exprimierenden TFs *NbWRKY8* bzw. *NbWRKY40* mit oder ohne Ko-Expression des T3Es XopS. EV = Leervektorkontrolle. Die Probenahme erfolgte 48 h nach Agrobakterien-Infiltration und die gemessene GUS Aktivität ist in pmol 4-Methylumbelliferon (4-MU) mg protein⁻¹ min⁻¹ angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 4 biologischen Replikaten ± Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way ANOVA* ($P < 0.05$) determiniert wurden. (B) Western Blot Analyse mittels anti-HA bzw. anti-GFP Antikörper zur Verifizierung der Proteinexpression der Effektorstrukturen in Agrobakterien-infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Die Proben wurden 48 h nach Infiltration geerntet. Die Abbildung zeigt die Proteinexpression in einem Proben-Pool bestehend aus den vier biologischen Replikaten die zur in (A) gezeigten Analyse verwendet wurden. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

3.2.6. Das Typ-III Effektorprotein XopS interferiert mit der stomatären Immunität in Abhängigkeit von WRKY40

Eine wichtige Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Funktion des *Xcv* Typ-III Effektors XopS und die Wirkungsweise seines Interaktionspartners WRKY40 in Relation zueinander zu setzen. Im Laufe dieser Studie konnte herausgefunden werden, dass XopS ein Hauptvirulenzfaktor von *Xcv* während der stomatären Immunantwort ist, indem es die Schließung von Stomata in Antwort auf einen Pathogen-assoziierten Stimulus verhindern kann. Um die Beziehung zwischen XopS und WRKY40 besser verstehen zu können, sollte dementsprechend überprüft werden, ob diese Virulenzfunktion abhängig von WRKY40 ist. So wurde zunächst der VIGS-Ansatz dazu verwendet, um die Genexpression von *NbWRKY40* in *N. benthamiana* herunterzuregulieren.

Zwei Wochen nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation des Genstilllegungs-Konstrukts pTRV2-*NbWRKY40* bzw. der Leervektorkontrolle pTRV2, wurde ein Blatt einer jeden Pflanze geerntet und mit einer 5 mM SA-Lösung besprüht. Dadurch sollte die Genexpression von *NbWRKY40* stimuliert werden. Vier Stunden nach SA Behandlung wurden die mRNA-Mengen von *NbWRKY40* per qRT-PCR in pTRV2-*NbWRKY40* Pflanzen und pTRV2 Kontrollpflanzen quantifiziert und einander gegenübergestellt. Wie die Abb. 3.34A zeigt, führte die Virus-vermittelte Genstilllegung von *NbWRKY40* zu einer rund 90%igen Reduktion seiner Genexpression. Dies spricht dafür, dass VIGS in *N. benthamiana* wesentlich effizienter ist als in Paprika.

Im Anschluss wurde XopS-GFP oder freies GFP ebenfalls über Agrobakterien-Infiltration in Blättern der pTRV2-*NbWRKY40* und pTRV2 Pflanzen transformiert. 24 Stunden später wurden sowohl XopS-GFP als auch GFP exprimierende Blattscheiben auf die Fähigkeit ihre Stomata in Antwort auf einen flg22 Stimulus zu schließen, überprüft. Die Vermessung der Spaltöffnungen zwei Stunden nach flg22 Behandlung ergab eine signifikante Schließung der Stomata in pTRV2 Kontrollpflanzen, die lediglich freies GFP überexprimierten (Abb. 3.34B). pTRV2 Pflanzen die XopS-GFP überexprimierten waren hingegen nicht mehr in der Lage mit einem Stomataschluss auf den PAMP Stimulus zu reagieren. Dieses Ergebnis bestätigt erneut, dass XopS die Schließung von Stomata in Antwort auf einen PAMP/MAMP Stimulus zu dämpfen vermag. pTRV2-*NbWRKY40* Pflanzen zeigten, bei einer Expression von freiem GFP, eine vergleichbare Schließung der Spaltöffnungen in Antwort auf flg22 zu jener in pTRV2 Kontrollpflanzen. Im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen, konnte die Überexpression von XopS-GFP in *NbWRKY40* herunterregulierten Pflanzen allerdings keinen signifikanten Effekt auf die Stomata Öffnung erzielen (Abb. 3.34B). Mit diesem Versuch konnte deutlich gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem WRKY40 TF und der Fähigkeit des T3Es XopS mit der stomatären Immunität zu interferieren besteht.

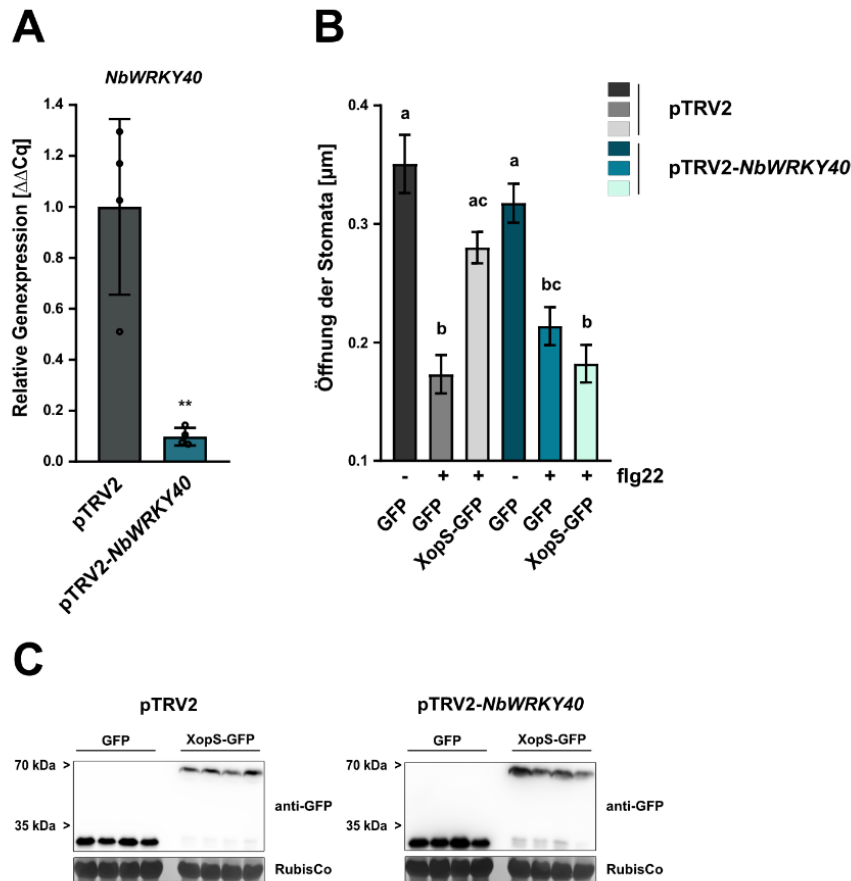


Abbildung 3.34: Die XopS-abhängige Verhinderung der Schließung von Stomata in Antwort auf einen PAMP Stimulus ist abhängig von WRKY40.

(A) Verifizierung der Herunterregulierung der *NbWRKY40* Genexpression in pTRV-*NbWRKY40* *N. benthamiana* VIGS Pflanzen. Zwei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der angegebenen *silencing*-Konstrukte in Keimblätter von *N. benthamiana* Pflanzen wurde die Gesamt-RNA je eines für 4 h mit 5 mM SA behandelten Blattes extrahiert. Die mRNA-Mengen von *NbWRKY40* wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-Leervektor (pTRV2) Kontrollpflanzen verglichen. *Actin* (*NbActin*) diene als Referenzen. Balken zeigen die Mittelwerte $n = 4$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit **, $P < 0.01$ gekennzeichnet. (B) Vermessung der Stomata-Öffnungen in pTRV-*NbWRKY40* und pTRV2 *N. benthamiana* Pflanzen nach transienter Expression von entweder freiem GFP oder XopS-GFP und Behandlung mit flg22. Blattscheiben wurden auf Wasser (Kontrolle,-) oder auf einer 25 μM flg22 Lösung (+) für 2 h inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert. Es wurden ca. 100 Spaltöffnungen von $n = 4$ einzelnen Pflanzen pro Behandlung vermessen. Die Öffnung der Stomata ist im Verhältnis Breite/Länge angegeben. Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler SE. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way ANOVA* ($P < 0.05$) determiniert wurden. (C) Western Blot Analyse mittels anti-GFP Antikörper zur Verifizierung der Proteinexpression von GFP und XopS-GFP in Agrobakterien-infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen. Die Proben wurden 24 h nach Infiltration geerntet. Die Abbildung zeigt die Proteinexpression in den vier biologischen Replikaten in pTRV2 oder pTRV2-*NbWRKY40* Pflanzen die zur Analyse der Stomata Öffnungen verwendet wurden. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diene als Ladekontrolle.

3.3. Identifikation weiterer *in planta* Interaktionspartner von XopS und WRKY40

Die bisher verfolgten experimentellen Ansätze konnten einerseits zur Aufklärung der Virulenzfunktion des Typ-III Effektorproteins XopS beitragen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor WRKY40 eine Repressorfunktion in der Abwehr-assoziierten Genexpression einnimmt und dass *CaWRKY40a* eine wichtige Rolle während einer kompatiblen Interaktion zwischen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und seiner Wirtspflanze Paprika spielt. Der biochemische Mechanismus der beobachteten Stabilisierung von WRKY40 durch XopS ist allerdings weiterhin unbekannt. Im letzten Teil dieser Arbeit sollten daher weitere potentielle Interaktionspartner von XopS und WRKY40 identifiziert werden, die deren Funktionen, aber auch deren Wechselwirkung beeinflussen könnten.

3.3.1. IP-MS Analyse zur Identifikation potentieller *in planta* Interaktionspartner

Zur Aufdeckung von Protein-Protein Interaktionen zwischen XopS bzw. WRKY40 und potentiellen *in planta* Partnerproteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der sogenannten IP-MS (von Immunopräzipitation-Massenspektrometrie) angewandt. Hierfür wurden zunächst GFP-markiertes XopS und *NbWRKY40* neben freiem GFP als Negativkontrolle transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Weil die transiente Expression von *NbWRKY40* aufgrund seines schnellen proteasomalen Abbaus oftmals wenig erfolgreich ist, wurden zusätzlich Pflanzen mit einer Kombination aus *NbWRKY40*-GFP und XopS-HA infiltriert, um den WRKY40 TF zu stabilisieren. Eine andere Möglichkeit den Abbau des WRKY40 TF über das 26S Proteasom zu verhindern ist die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132. So wurde *NbWRKY40* in weiteren Pflanzen transient überexprimiert und sechs Stunden vor Ernte des Probenmaterials wurde eine 200 µM MG132-Lösung ko-infiltriert. Zwei Tage nach der Infiltration der Konstrukte wurde das Blattmaterial in jeweils biologischen Triplikaten geerntet und aufgearbeitet. Folglich wurden die GFP-markierten Proteine, ebenso wie das freie GFP einer *GFP-Trap*[®] unterzogen. Dabei wurden diese durch die Bindung der genannten Markierung an eine mit GFP-Einzeldomänenantikörpern beschichtete magnetische Matrix aus den Pflanzenextrakten aufgereinigt. Um zu gewährleisten, dass dadurch genug Protein für eine anschließende MS-Analyse gewonnen werden konnte, wurde ein Teil der Eluate über einen anti-GFP Western Blot analysiert (Abb. 3.35). Dabei sieht man, dass die Ko-Infiltration von MG132 zu einer deutlichen Akkumulation des *NbWRKY40* Proteins geführt hat. Jedoch konnte auch aus allen anderen *NbWRKY40*-GFP exprimierenden Blattproben genug Protein für die folgende Analyse aufgereinigt werden.

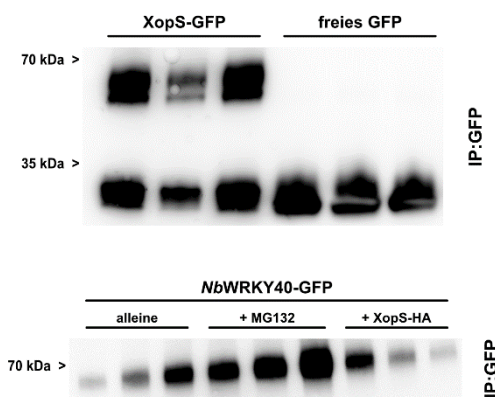


Abbildung 3.35: Immunodetektion zur Analyse der koimmunopräzipitierten Proteine für die IP-MS Analyse.

Die angezeigten GFP-markierten Proteine wurden transient in *N. benthamiana* exprimiert und Proben wurden 48 h nach Agrobakterien-Infiltration der entsprechenden Konstrukte in biologischen Triplikaten geerntet. Neben der alleinigen Expression von *NbWRKY40*-GFP wurde dieses zusätzlich mit entweder 200 µM MG132 behandelt oder mit XopS-HA ko-exprimiert. Anschließend wurden die Proben einer Immunopräzipitation mittels *GFP-Trap*[®] unterzogen. Zur Kontrolle der Aufreinigung über die GFP-Matrix wurde eine Western Blot Analyse mittels eines anti-GFP Antikörpers durchgeführt. IP:GFP = Proteine nach Aufreinigung über *GFP-Trap*[®].

Der Rest der Proteineluate wurde von einem Kooperationspartner (MS Facility, Universität Tübingen), nach einer kurzen Auftrennung über eine SDS-PAGE, mittels tryptischen in-Gel-Verdau für die LC-MS/MS (von *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*)-Analyse vorbereitet und danach analysiert. Sowohl XopS, *NbWRKY40* als auch freies GFP konnten in den jeweiligen Proben erfolgreich identifiziert werden, was für die Verlässlichkeit der angewendeten Methode spricht. Zudem konnten sowohl für XopS, als auch für *NbWRKY40* einige interessante potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, die in den Tabellen 3.1 bzw. 3.2 aufgeführt sind.

Tabelle 3.1 Potentielle in planta Interaktionspartner des T3Es XopS.

Gefundenes Protein	Anzahl der Peptide					
	GFP1	GFP2	GFP3	XopS-GFP1	XopS-GFP2	XopS-GFP3
XopS	0	0	0	30	30	31
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	0	0	0	46	39	44
Ubc13-type ubiquitin-conjugating enzyme 2	0	0	0	5	5	5
E3 ubiquitin-protein ligase KEG	0	0	0	3	4	5
Proteasome activator subunit 4	0	0	0	21	18	18
Putative Cullin-1	0	0	0	2	2	2
Cullin-associated/NEDD8-dissociated protein 1	0	0	0	10	10	10
Importin subunit alpha-2-like	1	1	0	5	5	6
Importin subunit beta-1	0	0	0	3	3	3
Serine/threonine-protein kinase PBS1-like	0	0	0	4	4	5
PBL27-like	0	0	0	7	8	8
EDS1L-like	0	0	0	2	2	2

Tabelle 3.2 Potentielle in planta Interaktionspartner des NbWRKY40 TFs.

Gefundenes Protein	Anzahl der Peptide					
	GFP1	GFP2	GFP3	W40-GFP1	W40-GFP2	W40-GFP3
WRKY40	0	0	0	10	12	12
Probable WRKY transcription factor 40	0	0	0	7	9	9
Probable WRKY transcription factor 42	0	0	0	1	1	1
Topless-related protein 3-like isoform X1	0	1	1	13	17	16
Proteasome subunit alpha type-6	0	0	0	1	2	3

W40-GFP bezieht sich auf die gefundenen Peptide der potentiellen NbWRKY40-GFP Interaktionspartner. Peptide dieser Proteine wurden ebenso in den analysierten NbWRKY40 + MG132 und NbWRKY40 + XopS-HA Proben identifiziert.

Die *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Referenzsequenzen zu den identifizierten Proteinen sind den Tabellen 6.5 und 6.6 im Anhang zu entnehmen.

Ein besonders interessanter Kandidat, der über die IP-MS als potentieller Interaktionspartner von XopS identifiziert werden konnte, ist das Deubiquitinierungs-Protein UBP12 (von *Ubiquitin-Specific Protease 12*). Deubiquitinierungs-Proteine (DUBs) interferieren mit der Ubiquitinmarkierung von Substratproteinen und können somit auch deren Stabilität modulieren (Miricescu *et al.*, 2018). So konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass XopS evtl. über eine Wechselwirkung mit UBP12 die Stabilität seines Zielproteins WRKY40 beeinflussen kann.

3.3.2. NtUBP12 interagiert in planta direkt mit XopS und NbWRKY40

Um auszuschließen, dass es sich bei der IP-MS identifizierten Interaktion zwischen XopS und UBP12 um ein Artefakt der Analyse handelt, sollte deren *in planta* Interaktion in einem nächsten Schritt über eine weiterführende Analyse verifiziert werden. Dazu wurde die Vollängensequenz des identifizierten UBP12 aus *Nicotiana tabacum* (NtUBP12) in einen Pflanzenexpressionsvektor kloniert um es mit einer carboxyterminalen HA (+ Strep)-Markierung zu versehen (NtUBP12-HA). NtUBP12-HA wurde anschließend zusammen mit XopS-GFP oder freiem GFP über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Da ein Vorexperiment gezeigt hatte, dass NtUBP12-HA erst 48 Stunden nach Infiltration gut exprimiert, wurde dieser Zeitpunkt für die Ernte des Blattmaterials gewählt. GFP-gekoppeltes XopS, sowie freies GFP, wurden über die magnetische Affinitätsmatrix *GFP-Trap*[®], welche auch für die IP-MS verwendet worden war, aufgereinigt. Im Falle einer Wechselwirkung zwischen XopS-GFP bzw. freiem GFP und dem potentiellen Interaktionspartner NtUBP12-HA, würde letzterer über die *GFP-Trap*[®] ko-präzipitiert werden.

Eine solche Ko-Präzipitation könnte in diesem Fall durch seine HA-Markierung anhand einer anti-HA Western Blot Analyse sichtbar gemacht werden. Die Abbildung 3.36A zeigt, dass *NtUBP12*-HA über den verwendeten anti-HA Antikörper im Eluat von XopS-GFP detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde im Eluat des aufgereinigten freien GFPs keinerlei Signal im anti-HA Western Blot detektiert (Abb. 3.36B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass XopS *in planta* an *NtUBP12* bindet. Zudem konnte anhand der GFP Kontrolle ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des Proteins an die GFP-Markierung handelt.

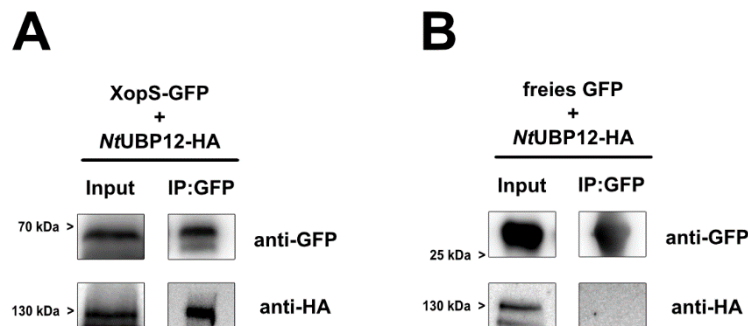


Abbildung 3.36: XopS interagiert *in planta* mit *NtUBP12*.

(A) Ko-Immunopräzipitation von XopS-GFP mit *NtUBP12*-HA. XopS-GFP und *NtUBP12*-HA wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. 48 h nach der Agrobakterien-Infiltration wurden Blattproben geerntet und einer Proteinextraktion unterzogen. Der somit gewonnene Rohextrakt (Input) wurde im Anschluss auf die magnetische Matrix der *GFP-Trap*[®] geladen um XopS-GFP über seine Affinitätsmarkierung aufzureinigen (IP:GFP). Zur Detektion von XopS und seinem möglicherweise gebundenen putativen Interaktionspartner *NtUBP12* wurde eine Western Blot Analyse mit anti-GFP und anti-HA Antikörpern durchgeführt. (B) Spezifitätskontrolle der in (A) gezeigten *in planta* Interaktion zwischen XopS-GFP und *NtUBP12*-HA. Hier wurde freies GFP zusammen mit *NtUBP12* transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert und der in (A) beschriebenen Analyse unterzogen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass XopS an das DUB UB12 bindet, sollte im Folgenden ein Zusammenhang mit dem zweiten XopS Interaktionspartner WRKY40 hergestellt werden. In erster Linie sollte demnach untersucht werden, ob auch die beiden XopS Interaktionspartner miteinander interagieren können. Dazu wurde eine Ko-Immunopräzipitation von GFP-markiertem *NbWRKY40* und HA-markiertem *NtUBP12* mittels *GFP-Trap*[®] durchgeführt. Die anschließende anti-HA Western Blot Analyse zeigte deutlich, dass *NtUBP12* *in planta* auch mit dem Transkriptionsfaktor *NbWRKY40* interagiert (Abb. 3.37). Allerdings war die Signalstärke von *NtUBP12*-HA bei gleicher Belichtungszeit schwächer als das detektierte Signal des XopS-GFP ko-immunopräzipitierten *NtUBP12*-HA. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die Interaktion zwischen *NbWRKY40* und *NtUBP12* weniger stark als die zwischen XopS und *NtUBP12* ist.

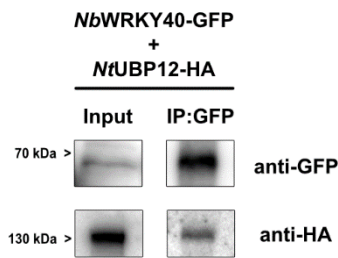


Abbildung 3.37: *NbWRKY40* interagiert *in planta* mit *NtUBP12*.

Ko-Immunopräzipitation von *NbWRKY40*-GFP mit *NtUBP12*-HA. *NbWRKY40*-GFP und *NtUBP12*-HA wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert. 48 h nach der Agrobakterien-infiltration wurden Blattproben geerntet und einer Proteinextraktion unterzogen. Der somit gewonnene Rohextrakt (Input) wurde im Anschluss auf die magnetische Matrix der *GFP-Trap*[®] geladen um *NbWRKY40*-GFP über seine Affinitätsmarkierung aufzureinigen (IP:GFP). Zur Detektion von *NbWRKY40* und seinem möglicherweise gebundenen putativen Interaktionspartner *NtUBP12* wurde eine Western Blot Analyse mit anti-GFP und anti-HA Antikörpern durchgeführt.

3.3.3. Eine transiente Expression von XopS und *NbWRKY40* führt zur Akkumulation von *NtUBP12*

Die Bestätigung der direkten *in planta* Interaktion von *NtUBP12* mit XopS und *NbWRKY40* gab den Anstoß zu weiterführenden Untersuchungen dieser Wechselwirkung. So wurde *NtUBP12*-HA entweder einzeln, oder aber zusammen mit XopS-myc, *NbWRKY40*-GFP oder beiden Interaktionspartnern über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Zwei Tage nach Infiltration wurden die Proteinmengen von *NtUBP12* in den jeweiligen Proben über eine anti-HA Western Blot Analyse bestimmt. Die Ko-Expression von XopS-myc, und zu einem höheren Maße jene von *NbWRKY40*-GFP brachte eine Akkumulation des *NtUBP12*-HA Proteins mit sich (Abb. 3.38). Wurden sowohl XopS-myc als auch *NbWRKY40*-GFP mit *NtUBP12*-HA ko-exprimiert, führte dies zu einem massiven Anstieg des *NtUBP12*-HA Proteinlevels (Abb. 3.38).

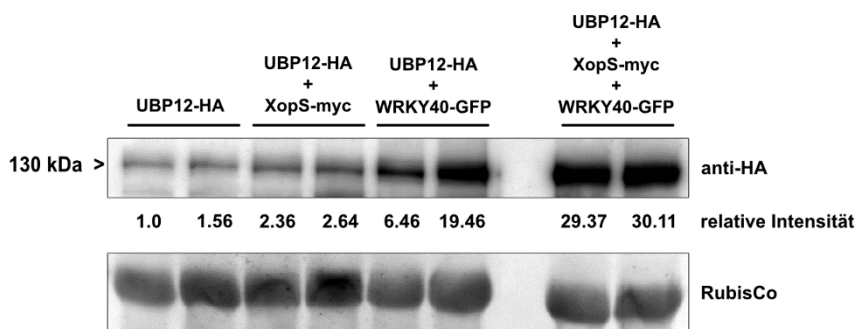


Abbildung 3.38: XopS und *NbWRKY40* führen zu einer Proteinakkumulation von *NtUBP12*.

NtUBP12-HA (UBP12-HA) wurde entweder alleine oder zusammen mit XopS-myc, *NbWRKY40*-HA oder XopS-myc und *NbWRKY40*-HA über Agrobakterien-vermittelte Transformation transient in *N. benthamiana* exprimiert. 48 h nach Agrobakterien-Infiltration wurden Proteinextrakte aus dem *N. benthamiana* Blattgewebe gewonnen und die Proteinmengen von *NtUBP12* wurden über eine Western Blot Analyse mittels anti-HA Antikörper detektiert und anschließend densitometrisch quantifiziert (relative Intensität). Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle.

Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die drei Interaktionspartner möglicherweise einen Komplex bilden, der eine Akkumulation oder Stabilisierung des jeweils anderen Partners herbeiführt.

3.3.4. Die Genstilllegung von *NbUBP12* führt zur Stabilisierung seines Interaktionspartners *NbWRKY40*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass XopS und *NbWRKY40* die Akkumulation von *NtUBP12* beeinflussen, sollte im weiteren Verlauf dieser Studie der Effekt des DUBs *NtUBP12* auf die Stabilität seines Interaktionspartners *NbWRKY40* genauer beschrieben werden. Dazu wurde die Expression von *NbUBP12* über Virus-induzierte Genstilllegung in *N. benthamiana* herunterreguliert. Zwei Wochen nach Agrobakterien-Infiltration des Stilllegungs-Konstrukts pTRV2-*NbUBP12* bzw. der Leervektorkontrolle pTRV2 in Tabakpflanzen, die gerade das vierte Blattstadium erreicht hatten, wurden die mRNA-Mengen von *NbUBP12* in pTRV2-*NbUBP12* und pTRV2 Pflanzen über eine qRT-PCR bestimmt und miteinander verglichen. Es konnte hier eine etwa 80%ige Herunterregulierung von *NbUBP12* in pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen erzielt werden (Abb. 3.39A). Im Folgenden wurde *NbWRKY40*-GFP in pTRV2-*NbUBP12* und pTRV2 Pflanzen über Agrobakterien-vermittelte Transformation exprimiert und dessen Proteinmengen 24 Stunden nach Infiltration über einen anti-GFP Western Blot analysiert. Die Abb. 3.39B zeigt, dass *NbWRKY40*-GFP in pTRV2-*NbUBP12* stabiler exprimiert ist als in den pTRV2 Kontrollpflanzen, was darauf hindeutet, dass das DUB *UBP12* *in planta* möglicherweise über seine biochemische Funktion zu einer Destabilisierung des Transkriptionsfaktors *WRKY40* führen könnte. Zusätzlich dazu führte eine Ko-Expression von *NbWRKY40*-GFP und XopS-HA in pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zu einer noch erheblicheren Akkumulation des *NbWRKY40* TFs (Abb. 3.39C).

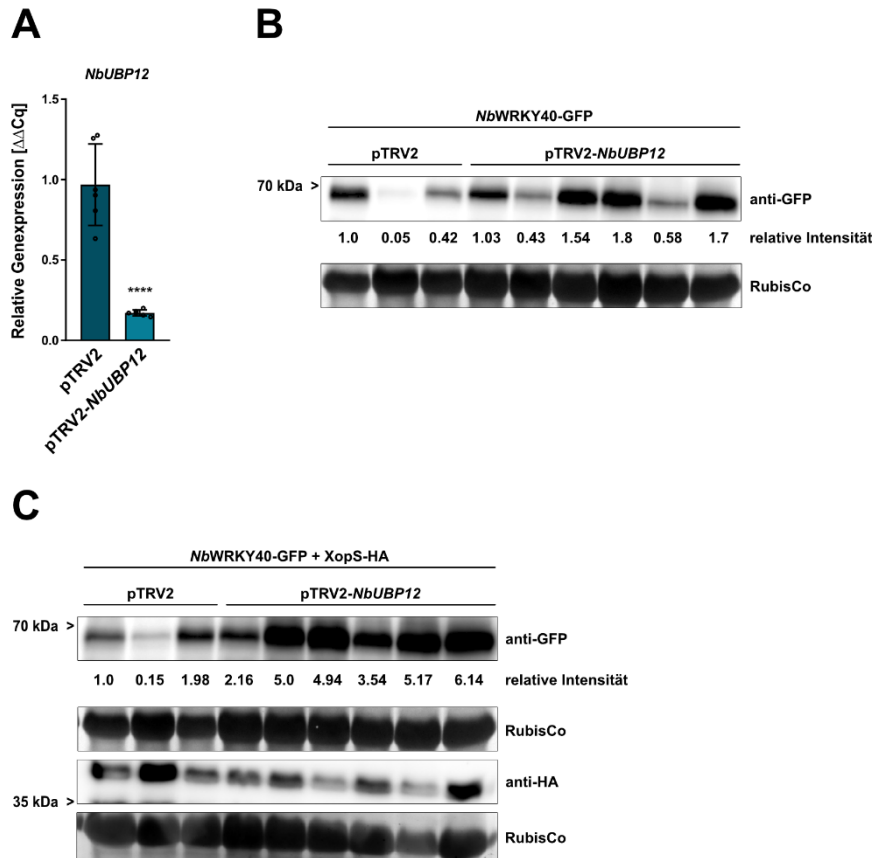


Abbildung 3.39: Transient in *N. benthamiana* exprimierendes *NbWRKY40* akkumuliert bei einer Virus-induzierten Genstilllegung von *NbUBP12*.

(A) Verifizierung der Herunterregulierung der *NbUBP12* Genexpression in pTRV-*NbUBP12* *N. benthamiana* VIGS Pflanzen. Zwei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der angegebenen *silencing*-Konstrukte in Keimblätter von *N. benthamiana* Pflanzen wurde die Gesamt-RNA aus einer Blattprobe pro Pflanze extrahiert. Die mRNA-Mengen von *NbUBP12* wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-Leervektor (pTRV2) Kontrollpflanzen verglichen. *Actin* (*NbActin*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit ****, $P < 0.0001$ gekennzeichnet. (B) *NbWRKY40*-GFP wurde transient über Agrobakterien-vermittelte Transformation in pTRV2 und pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen exprimiert. 24 h nach Agrobakterien-Infiltration wurde das Probenmaterial einer Proteinextraktion unterzogen und die Proteinmengen von *NbWRKY40*-GFP wurden mittels Western Blot über einen anti-GFP Antikörper analysiert. Die densitometrische Analyse (relative Intensität) diente der Quantifizierung der Proteinmengen. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente als Ladekontrolle. (C) Um einen potentiellen Einfluss von XopS auf die *NbWRKY40*-GFP Proteinmengen in pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen zu untersuchen wurde *NbWRKY40*-GFP zusammen mit XopS-HA transient über Agrobakterien-Infiltration in pTRV2 und pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen exprimiert. Die Analyse der *NbWRKY40*-GFP Proteinmengen erfolgte wie in (B) beschrieben. Die Western Blot Analyse mit dem anti-HA Antikörper bestätigte die Expression von XopS-HA im aufgearbeiteten Probenmaterial. Eine AmidoBlack Färbung von RubisCo diente auch hier als Ladekontrolle.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu bekräftigen, sollte ausgeschlossen werden, dass die veränderten Proteinmengen durch einen Nebeneffekt der VIGS Methode zustande kamen. Dies könnte der Fall sein, wenn sich der angewandte Ansatz bereits auf transkriptioneller Ebene auf die Expression von *NbWRKY40* auswirken würde.

Durch eine qRT-PCR auf cDNA Proben des mit entsprechenden Konstrukten infiltrierten Blattmaterials konnte gezeigt werden, dass es keinerlei Unterschiede im Transkriptlevel von *NbWRKY40* zwischen den untersuchten Proben gab (Abb. 3.40). Dementsprechend hatte die angewandte VIGS Methode keinen Nebeneffekt auf die Genexpression von transient exprimiertem *NbWRKY40*. Anhand der Resultate des beschriebenen Versuchs könnte spekuliert werden, dass der T3E XopS mit einer potentiellen Destabilisierung des WRKY40 TFs durch UBP12 interferiert und seinen Interaktionspartner auf diesem Wege stabilisiert.

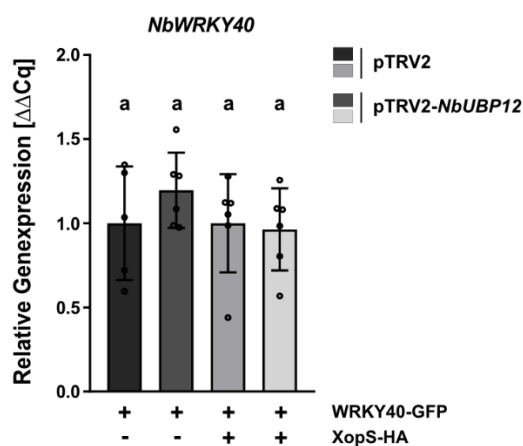


Abbildung 3.40: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *NbUBP12* hat keinen Einfluss auf das *NbWRKY40* Transkriptlevel.

NbWRKY40-GFP (WRKY40-GFP) wurde entweder alleine oder zusammen mit XopS-HA transient über Agrobakterienvermittelte Transformation in pTRV-*NbUBP12* *N. benthamiana* VIGS Pflanzen exprimiert. 24 h nach Agrobakterien-Infiltration wurde die Gesamt-RNA aus den Blattproben extrahiert und die mRNA-Mengen von *NbWRKY40* in den angeführten Proben wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2 (+ WRKY40-GFP) verglichen. *Actin* (*NbActin*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Die Buchstaben über den Balken zeigen statistische Signifikanzen die über *one-way* ANOVA ($P < 0.05$) determiniert wurden.

3.3.5. UBP12 beeinflusst pflanzliche Immunantworten während einer kompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion

Die durchgeführten Interaktionsstudien zwischen XopS, WRKY40 und UBP12 sollten im Rahmen dieser Arbeit auch in den Kontext der Beeinflussung des pflanzlichen Immunsystems gebracht werden. So sollte die Rolle von UBP12 in der Immunantwort während einer kompatiblen *Xcv*-Wirt Interaktion entschlüsselt werden. Dafür wurde ein 600 bp langes Fragment von *UBP12* aus Paprika (*CaUBP12*) in den zur Virus-induzierten Genstilllegung verwendeten pTRV2 Vektor kloniert (pTRV2-*CaUBP12*). pTRV2-*CaUBP12* wurde daraufhin über Agrobakterien in Keimblätter von Paprika ECW Pflanzen infiltriert. pTRV2-*GFP* transformierte Pflanzen sollten als Kontrollpflanzen dienen. Drei Wochen nach Infiltration wurde die Herunterregulierung von *CaUBP12* über eine qRT-PCR verifiziert (Abb. 3.41A). Anschließend wurden die mit der höchsten Effizienz herunterregulierten pTRV2-*CaUBP12* Pflanzen, sowie die pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen mit *Xcv* WT und *XcvΔxopS* Bakterien infiziert. Fünf Tage nach der Druckinfiltration wurde der Bakterientiter im infizierten Blattgewebe bestimmt. *Xcv* WT Bakterien waren durch die Herunterregulierung der *CaUBP12*

Transkription in pTRV2-*CaUBP12* Pflanzen in der Lage, sich dort signifikant besser zu vermehren als in Kontrollpflanzen (Abb. 3.41B). Der Stamm *XcvΔxopS* hatte hingegen lediglich einen leichten, aber keinen signifikanten Wachstumsvorteil in Pflanzen mit einem verminderten *CaUBP12* mRNA-Level (Abb. 3.41B). Diese Ergebnisse lieferten erste Indikationen, dass das DUB UBPI2 eine positive Rolle in der Abwehr des phytopathogenen Bakteriums *Xcv* spielen könnte.

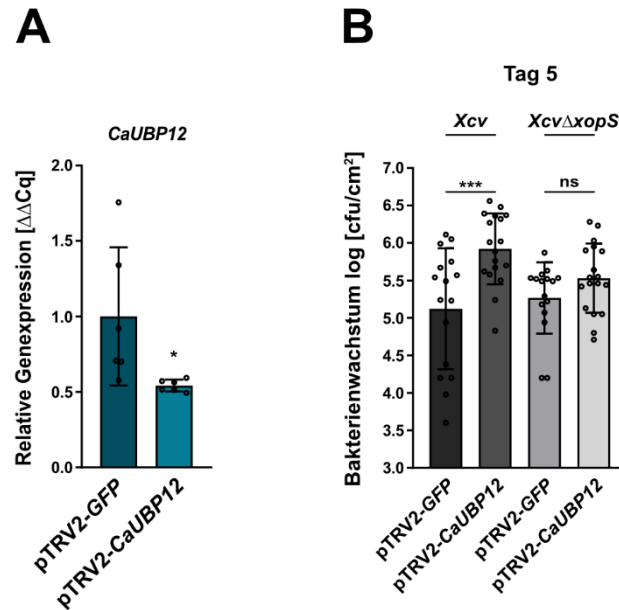


Abbildung 3.41: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *UBPI2* in Paprika beeinflusst Abwehrantworten gegen *Xcv*.

(A) Verifizierung der Herunterregulierung der *CaUBP12* Genexpression in pTRV-*CaUBP12* Paprika VIGS Pflanzen. Drei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der angegebenen *silencing*-Konstrukte in Keimblätter von Paprika Pflanzen wurde die Gesamt-RNA aus einer Blattprobe pro Pflanze extrahiert. Die mRNA-Mengen von *CaUBP12* wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen. *Tubulin* (*CaTUB*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit *, $P < 0.05$ gekennzeichnet. (B) Das Bakterienwachstum von *Xcv* Wildtyp und *XcvΔxopS* in pTRV2-*CaUBP12* wurde mit jenem in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen. Paprika Blätter wurden *per* Druckinfiltration mit *Xcv* WT bzw. *XcvΔxopS* bei einer Bakteriendichte von 1×10^4 CFU mL⁻¹ infiziert und koloniebildende Einheiten im infizierten Blattgewebe wurden fünf Tage nach Infektion quantifiziert. Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens $n = 8$ biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) \pm Standardabweichung SD ($n = 8$ für pTRV2-*GFP* und $n = 9$ für pTRV2-*CaUBP12*). Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit ***, $P < 0.001$ gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob UBPI2 tatsächlich eine positive Rolle während der pflanzlichen Immunantwort gegen *Xcv* einnimmt, sollte dieses Experiment in Tabak wiederholt werden, da VIGS in dieser Modellpflanze meist effizienter ist als in Paprika.

Da Wildtyp *N. benthamiana* aber über das R-Protein Roq1 verfügt, welches die Typ-III Effektoren XopQ und HopQ1 aus *Xanthomonas* bzw. *Pseudomonas* erkennen kann und dementsprechend eine ETI auslöst, können WT Pflanzen nicht für Bakterienwachstumskurven mit diesen Pathogenen benutzt werden (Schultink *et al.*, 2017).

Aus diesem Grund wurde *UBP12* in diesem Fall in einer *roq1* Tabakmutante, *N. benthamiana roq1* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Johannes Stuttmann; Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg), über VIGS herunterreguliert. Die Genstilllegungs-Effizienz von *UBP12* in *N. benthamiana*, gezeigt in Abb. 3.42A, war wie angenommen um ca. 30% höher als jene in Paprika. Erfolgreich herunterregulierte pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen wurden neben den pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen mit den Stämmen *Xcv* WT und *XcvΔxopS* infiziert und der Bakterientiter wurde nach drei und sechs Tagen bestimmt (Abb. 3.42B). Drei Tage nach Infektion ermöglichte die Genstilllegung von *NbUBP12* es beiden Bakterienstämmen, sich signifikant stärker zu vermehren. Dieser Effekt war sechs Tage nach Infektion nicht mehr so deutlich sichtbar, wobei der *Xcv* WT Bakterientiter in pTRV2-*NbUBP12* Pflanzen immer noch signifikant höher war als in den Kontrollpflanzen.

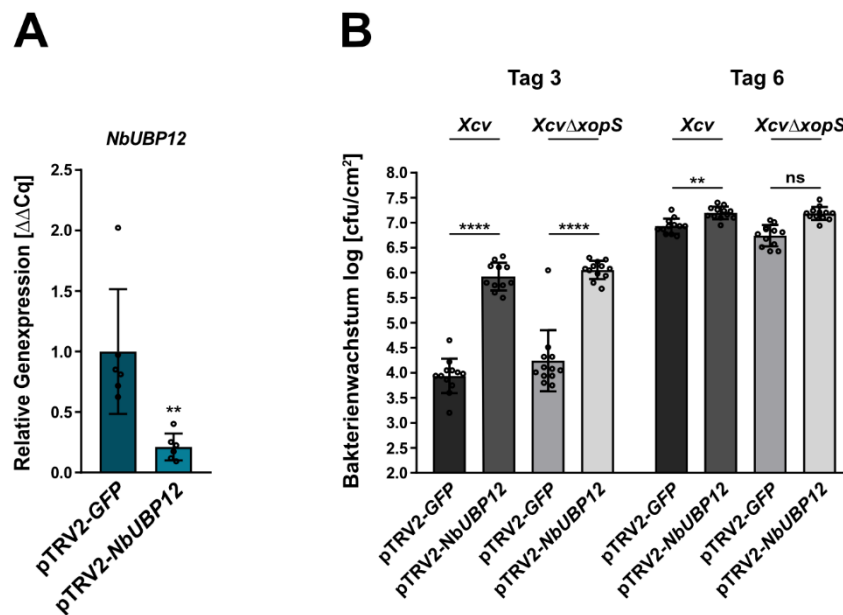


Abbildung 3.42: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *UBP12* in *N. benthamiana roq1* beeinflusst Abwehrantworten gegen *Xcv*.

(A) Verifizierung der Herunterregulierung der *NbUBP12* Genexpression in pTRV-*NbUBP12* *N. benthamiana roq1* VIGS Pflanzen. Zwei Wochen nach Agrobakterien-vermittelter Transformation der angegebenen *silencing*-Konstrukte in Keimblätter von *N. benthamiana roq1* Pflanzen wurde die Gesamt-RNA aus einer Blattprobe pro Pflanze extrahiert. Die mRNA-Mengen von *NbUBP12* wurden *per* qRT-PCR quantifiziert und mit jenen in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen. *Actin* (*NbActin*) diente als Referenzgen. Balken zeigen die Mittelwerte $n = 6$ biologischen Replikaten \pm Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über einen *student's t-test* ermittelt und sind mit **, $P < 0.01$ gekennzeichnet. (B) Das Bakterienwachstum von *Xcv* Wildtyp und *XcvΔxopS* in pTRV2-*NbUBP12* wurde mit jenem in pTRV2-*GFP* Kontrollpflanzen verglichen.

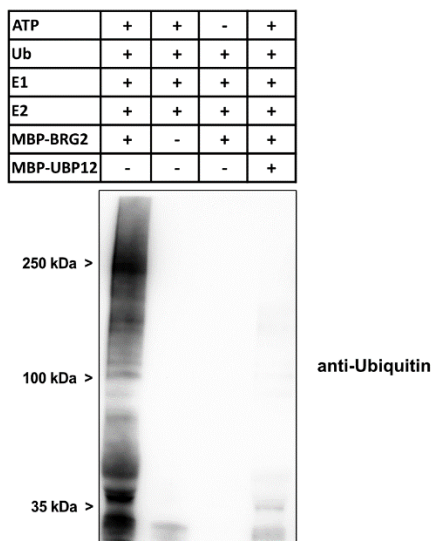
Paprika Blätter wurden per Druckinfiltration mit *Xcv* WT bzw. *Xcv*Δ*xopS* bei einer Bakteriendichte von 4×10^4 CFU mL⁻¹ infiziert und koloniebildende Einheiten im infizierten Blattgewebe wurden drei und sechs Tage nach Infektion quantifiziert. Balken zeigen die Mittelwerte von n = 6 biologischen Replikaten (und 2 technischen Replikaten pro biologisches Replikat) ± Standardabweichung SD. Statistisch signifikante Unterschiede wurden über *one-way* ANOVA ermittelt und sind mit **, P < 0.01 oder ****, P < 0.0001 gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

Diese Resultate bestätigen das Ergebnis aus dem vorangegangenen Paprikaversuch (Abb. 3.41) und bekräftigen die Hypothese, dass UBP12 eine positive Rolle in der Immunantwort gegen *Xcv* spielt. Zudem lassen die Ergebnisse aus dem Tabakversuch vermuten, dass UBP12 vor allem in einem frühen Stadium der Infektion bzw. Abwehr wichtig ist, da die beobachteten Unterschiede zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr so stark ausgeprägt waren.

3.3.6. Bestätigung der biochemischen Funktion von *Nt*UBP12

Durch die Etablierung eines *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays (Abschnitt 3.1.6.2) wurde die Möglichkeit geschaffen, unterschiedliche Komponenten dieser Kaskade auf deren biochemische Funktion zu überprüfen. Da die biochemische Aktivität als Deubiquitinierungs-Enzym für UBP12 bereits beschrieben worden war, sollte in diesem Zusammenhang getestet werden, ob sich die für diese Arbeit entwickelte Methode für weiterführende Analysen von UBP12 eignen würde. Dementsprechend wurde der Versuch unternommen, die DUB Aktivität von *Nt*UBP12 im *in vitro* Assay zu bestätigen. Dazu wurde eine MBP-Markierung an das aminoternale Ende von *Nt*UBP12 fusioniert und das in *E. coli* produzierte rekombinante Protein wurde über eine Amylose-Matrix aufgereinigt. Neben MBP-*Nt*UBP12 wurde die putative, MBP-markierte E3 Ligase *Nb*BRG2 auf gleichem Wege aufgereinigt. Die Abb. 3.43 zeigt, dass MBP-*Nb*BRG2 in Anwesenheit aller für den *in vitro* Assay notwendigen Komponenten (E1, E2, Ubiquitin und ATP) in der Lage war einen typischen 'Ubiquitin-Schmier' zu generieren (Spur 1). Dieser konnte über einen anti-Ubiquitin Western Blot sichtbar gemacht werden. Somit konnte die enzymatische Aktivität dieser E3 Ligase bestätigt werden. Die Zugabe von MBP-*Nt*UBP12 zu einem Reaktionsansatz der ebenso alle notwendigen Komponenten der Kaskade enthielt, verringerte die Polyubiquitinketten-Bildung der aktiven E3 Ligase *Nb*BRG2 enorm bis fast gänzlich (Abb. 3.43, Spur 4). In den beiden Negativkontrollen (Spur 2 und 3), in denen jeweils eine der essentiellen Komponenten fehlte, konnte wie erwartet kein Signal im anti-Ubiquitin Western Blot detektiert werden.

Abbildung 3.43: Bestätigung der DUB Aktivität von *NtUBP12* *in vitro*.



Die für den *in vitro* Ubiquitinierungs-bzw. Deubiquitinierungs-Assay notwendigen rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und über die jeweilige Affinitätsmarkierung aufgereinigt. E1-aktivierendes Enzym: His_{6x}-AtUBA1, E2-konjugierendes Enzym: His_{6x}-AtUBC8, E3 Ligase: MBP-*NbBRG2*, DUB: MBP-*NtUBP12*. Zur Überprüfung der enzymatischen DUB Aktivität von *NtUBP12* wurde dieses zusammen mit den Enzymen E1, E2 und E3 sowie den restlichen notwendigen Komponenten in einem Reaktionsansatz zusammengeführt und für 1 h bei 30°C inkubiert. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der generellen Funktionalität des Ubiquitinierungs-Assays mit *NbBRG2* als E3 Ligase diente ein Ansatz dem kein *NtUBP12* beigemischt wurde. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze denen jeweils eine notwendige Komponente fehlte. Nach 1 h bei 30°C wurden jeweils 20 µL der Reaktionsansätze auf ein SDS-Gradientengel (4-15%) aufgetragen, gefolgt von einer Western Blot Analyse. Die Aktivität der E3 Ligase, sowie jene des DUBs *NtUBP12* wurde mittels anti-Ubiquitin Antikörper analysiert.

Diese Resultate bestätigen, dass *NtUBP12* auch in dem hier etablierten *in vitro* Ansatz ein aktives Deubiquitinierungs-Enzym ist. Dadurch wurde der Grundstein für eine nähere biochemische Charakterisierung der XopS/WRKY40/UBP12 Interaktion gelegt, welche auf die hier vorgelegte Arbeit folgen könnte.

3.4. Identifikation post-translationaler Modifikationen von XopS und *NbWRKY40*

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte IP-MS Analyse von XopS-GFP und *NbWRKY40*-GFP (Abschnitt 3.3.1) sollte nicht nur neue potentielle *in planta* Interaktionspartner identifizieren, sondern auch mögliche post-translationalen Modifikationen an den analysierten Proteinen aufdecken. Solche post-translationalen Modifikationen (PTMs, von *Post-Translationalal Modifications*) sind häufig der Schlüssel zur korrekten Funktionsweise eines Proteins und könnten dementsprechend wichtig für ein besseres Verständnis von spezifischen Protein-Protein Interaktionen sein. Zu den häufigsten post-translationalen Modifikationen gehören die Phosphorylierung und die Ubiquitinierung von Substratproteinen (Hunter, 2007).

3.4.1. Identifikation von Phosphorylierungsstellen an XopS

Zunächst wurde über eine *in silico* Analyse die Aminosäuresequenz von XopS (Abb. 3.44A) mit dem *Online-Tool* NetPhos3.1 (Blom et al., 1999; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) auf mögliche Phosphorylierungsstellen überprüft.

Damit wurden innerhalb der 308 Aminosäuren langen XopS Sequenz 29 potentielle Phosphorylierungsstellen vorhergesagt, 24 davon an der Aminosäure Serin (S), zwei an Threonin (T) und drei an Tyrosin (V) (Abb. 3.44B). Zehn dieser 29 Aminosäuren wiesen in der durchgeführten Analyse einen hohen Konfidenzwert (*score*), wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um wirkliche Phosphorylierungsstellen handelt angezeigt wird, auf.

A

>gi|78034310|emb|CAJ21955.1| conserved hypothetical protein
[Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10]

```
MGDVQMGNCLRIPSANMAPALPEHGTAEEASTSNPMPHAGNMTAGPQEHTAVEGCAGRQIADMWLSLERPAR
RPSGSRSQPTAQSRPQSKLEKLTEQRQSM LQRAIILEDQWRSLQERCARTSVGGRQAFNLDILKGIIDRDQKQ
ALERMGGEGSYIAERHLHRIERTLQDFEKKISNQKQLQSHLAKANDFLARLKLKDELSSRGENKDILNDID
LNIKDLEGILNELTRIEANGAGIQYDGCRRGAIAYFDSVTISLEAMLRSDSGYFDYMRPALANVLQDGYSP
SRRKAVSDAGMRGGASDGIS
```

B

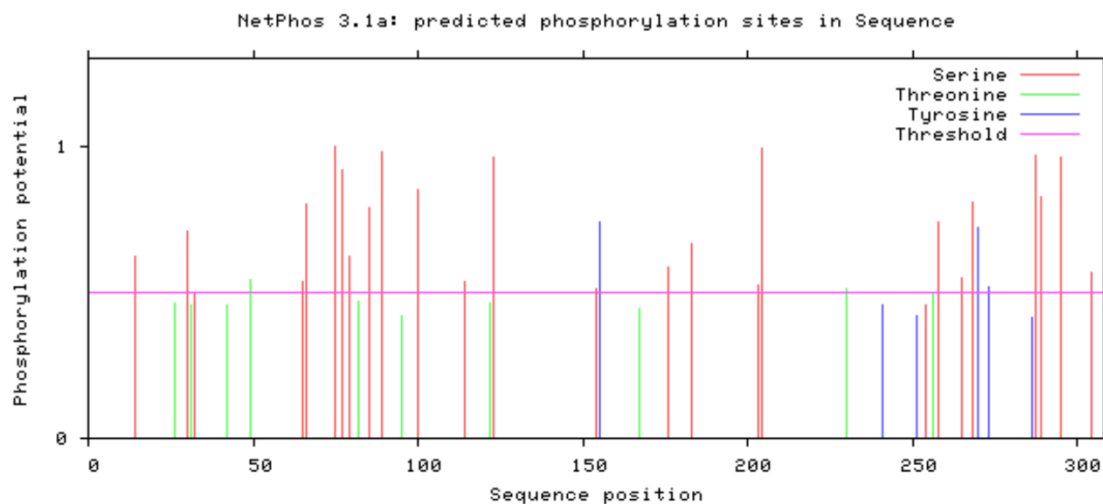


Abbildung 3.44: *In silico* Analyse der XopS Aminosäuresequenz zur Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen.

(A) Aminosäuresequenz von XopS bestehend aus 308 Aminosäuren. (B) Mögliche Phosphorylierungsstellen innerhalb der XopS Aminosäuresequenz wurden mit dem *Online-Tool* NetPhos3.1 (Blom et al., 1999; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) vorhergesagt. Dabei zeigen die unterschiedlichen Farben der Balken die verschiedenen Aminosäuren an die potentiell phosphoryliert werden. Rot: Serin, Grün: Threonin, Blau: Tyrosin. Die pinke Linie zeigt den Schwellenwert an. Bei den angezeigten *peaks* die diesen Schwellenwert überschreiten handelt es sich um Aminosäuren die mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert werden. *Sequence position*: Position der jeweiligen Aminosäure innerhalb der XopS Aminosäuresequenz. *Phosphorylation potential*: Das Potential einer angezeigten Aminosäure tatsächlich phosphoryliert zu werden.

Mittels der durchgeführten IP-MS Analyse konnte die vorhergesagte Phosphorylierung am Serin an Position 287 im C-Terminus von XopS *in planta* nachgewiesen werden (Abb. 3.45). Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass diese PTM des T3Es XopS für dessen Funktion *in planta* wichtig sein könnte.

Um die Phosphorylierung an diesem Aminosäurerest und auch dessen Einfluss auf die Funktion von XopS zu bestätigen, müssten allerdings noch weiterführende Analysen durchgeführt werden.

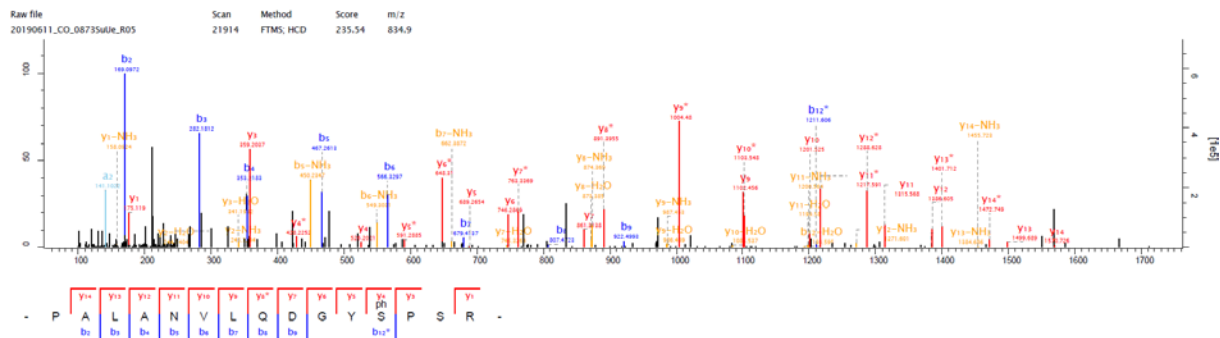


Abbildung 3.45: Identifizierung einer *in planta* Phosphorylierungsstelle in der Aminosäuresequenz von XopS mittels LC-MS/MS.

XopS-GFP wurde transient über Agrobakterien-vermittelter Transformation in *N. benthamiana* exprimiert und 48 h später wurde XopS-GFP aus dem Probenmaterial *per GFP-Trap*[®] aufgereinigt (gezeigt in Abbildung 3.35). Nach einem tryptischen Verdau wurden phosphorylierte Peptide über LC-MS/MS detektiert. Das Spektrum zeigt das Fragmentierungsmuster des phosphorylierten Peptids PALANVLQDGY^{ph}SPSR, welches den Aminosäuren 276-290 der XopS Aminosäuresequenz entspricht. ^{ph}S zeigt die identifizierte Phosphorylierungsstelle an Position 287.

3.4.2. Identifikation post-translationaler Modifikationen an *NbWRKY40*

Weil sich im Laufe dieser Arbeit die Hinweise darauf, dass Ubiquitinierung bei der Wechselwirkung des WRKY40 TFs mit seinen Interaktionspartnern XopS und UBP12 eine wichtige Rolle spielt immer weiter verdichtet haben, wurde der Versuch unternommen, Ubiquitinierungsstellen des TFs über die IP-MS Analyse zu identifizieren. Die Verwendung des *Online-Tools* UbPred (Service steht derzeit nicht mehr zur Verfügung) zur *in silico* Analyse der *NbWRKY40* Aminosäuresequenz prognostizierte potentielle Ubiquitinierungsstellen an 15 Lysinresten (K), wobei die Konfidenzrate der Vorhersage nur bei 7 von 15 Lysinen hoch war. Die Aminosäuresequenz von *NbWRKY40* mit Markierung der sieben wahrscheinlichsten Ubiquitinierungsstellen ist in Abb. 3.46 dargestellt. Leider konnte über die durchgeführte IP-MS Analyse keine dieser Ubiquitinierungsstellen bestätigt werden. Dies könnte daran gelegen haben, dass für diese spezifische Analyse zu wenig *NbWRKY40* Protein in den immunopräzipitierten Proben angereichert worden war.

>NbWRKY40

```
MEFTSLVDTSLDLNFRLRVPDGI PKQEVESNFIGLGKDLTPVKDEASDLLEELNRVSAE 60
NKKLTEMLTVMCQNYNALRNQVTEYMSKHNTTTTTTSADDYSAGSKKRKSENNEILKSVQG 120
ESSSSDEDNSCTKPREEHIKTKTTRVYFRTEPSDTSLNVDGYQWRKYGQKVTRDNPSP 180
RAYFKCSFAPTCPVKKKVQRSVEDQSILVATYEGEHNHSHPSKTDAANAVRTSPSSRLNG 240
KSNLGVTVASVPCHTLNSTEPKNMLQIEDKVASSTSTSTAGGHKRKSLSGGSDNNNHQNR 300
PEFQHFLIEQMANS�TKDPSFQAALAAAISGKFLPNNHTDK 341
```

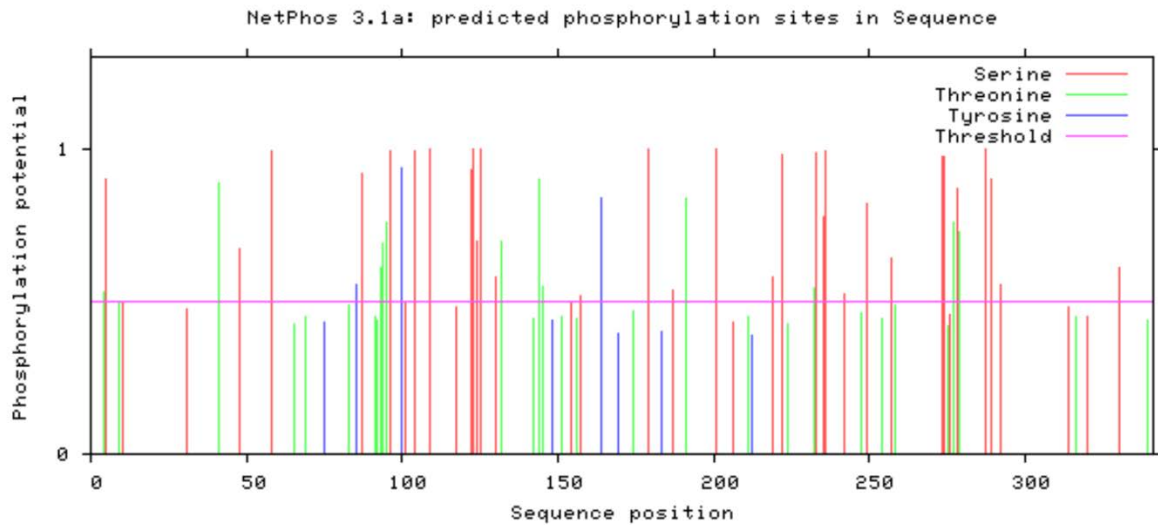
Abbildung 3.46: Aminosäuresequenz von NbWRKY40.

Dargestellt ist die 341 lange Aminosäuresequenz des WRKY40 Transkriptionsfaktors aus *N. benthamiana* (NbWRKY40). In Türkis sind Lysine (K) angefärbt, die über eine *in silico* Analyse mittels des *Online-Tools* UbPred als putative Ubiquitinierungsstellen identifiziert worden waren.

Eine *in silico* Analyse potentieller Phosphorylierungsstellen in der NbWRKY40 Aminosäuresequenz über NetPhos3.1 sagte 48 putative Phosphorylierungsstellen voraus, 33 davon an Serinresten, 12 an Threonin und weitere 3 an Tyrosinresten (Abb. 3.47A). Die Untersuchung auf *in planta* Phosphorylierungsstellen von NbWRKY40 über IP-MS konnte das Serin an Position 109 als solche identifizieren (Abb. 4.47B). Die Phosphorylierung an diesem Aminosäurerest war auch in der *in silico* Analyse mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorausgesagt worden. Ein Sequenzvergleich der Aminosäuren zwischen NbWRKY40 und seinen Orthologen aus Arabidopsis und Paprika ergab jedoch, dass dieses Serin 109 nicht konserviert ist, wodurch eine Rolle dieser PTM in der XopS/WRKY40/UBP12 Interaktion fast ausgeschlossen werden kann.

Trotzdem könnte man über weiterführende Analysen dieser Phosphorylierungsstelle, sowie Untersuchungen der Phosphorylierungsstellen an den WRKY40 Orthologen die Wichtigkeit von Phosphorylierung in der Regulation dieses TFs genauer aufschlüsseln.

A



B

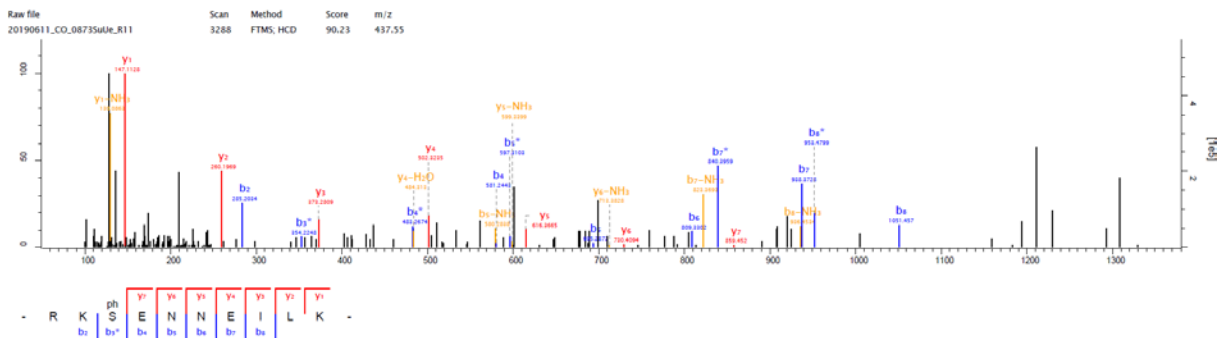


Abbildung 3.47: Identifizierung einer *in planta* Phosphorylierungsstelle in der Aminosäuresequenz von *NbWRKY40* mittels LC-MS/MS.

(A) Mögliche Phosphorylierungsstellen innerhalb der *NbWRKY40* Aminosäuresequenz wurden mit dem *Online-Tool* NetPhos3.1 (Blom et al., 1999; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) vorhergesagt. Dabei zeigen die unterschiedlichen Farben der Balken die verschiedenen Aminosäuren an die potentiell phosphoryliert werden. Rot: Serin, Grün: Threonin, Blau: Tyrosin. Die pinke Linie zeigt den Schwellenwert an. Bei den angezeigten *peaks* die diesen Schwellenwert überschreiten handelt es sich um Aminosäuren die mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert werden. *Sequence position*: Position der jeweiligen Aminosäure innerhalb der *NbWRKY40* Aminosäuresequenz. *Phosphorylation potential*: Das Potential einer angezeigten Aminosäure tatsächlich phosphoryliert zu werden. (B) *NbWRKY40*-GFP wurde transient über Agrobakterien-vermittelter Transformation in *N. benthamiana* exprimiert und 48 h später wurde *NbWRKY40*-GFP aus dem Probenmaterial *per GFP-Trap*[®] aufgereinigt (gezeigt in Abbildung 3.35). Nach einem tryptischen Verdau wurden phosphorylierte Peptide über LC-MS/MS detektiert. Das Spektrum zeigt das Fragmentierungsmuster des phosphorylierten Peptids *RKphSENNEILK*, welches dem Aminosäuren 107-116 der *NbWRKY40* Aminosäuresequenz entspricht. *phS* zeigt die identifizierte Phosphorylierungsstelle an Position 109.

4. Diskussion

Die sessile Lebensweise einer Pflanze fordert eine gute und rasche Adaption von Wachstums- und Entwicklungsprozessen an stetig schwankende Umweltbedingungen. Eine große Herausforderung stellt dabei die Verteidigung gegen ein breites Spektrum an Krankheitserregern dar. In der freien Natur ist die Abwehr von Schädlingen meist äußerst effizient, was der Vielschichtigkeit des sich evolvierten pflanzlichen Immunsystems zuzuschreiben ist (Nürnberger *et al.*, 2004; Jones & Dangl, 2006). Trotzdem ist im Laufe der Evolution ein regelrechter Wettstreit im Kampf um das bessere Überleben zwischen Pflanzen und phytopathogenen Organismen entstanden, wobei es gerade bei Nutzpflanzen immer wieder zu Ausbrüchen von Pflanzenkrankheiten kommt, die mit großen Ernteverlusten einhergehen (Gill *et al.*, 2015). Erfolgreich angepasste phytopathogene Organismen verfügen über ein Arsenal von Virulenzfaktoren, welche ihnen die Besiedelung entsprechender Wirtspflanzen ermöglicht. Bei Gram-negativen Bakterien spielen Typ-III Effektorproteine eine zentrale Rolle für die Virulenz. Deren Funktionsweise beeinflusst verschiedenste Ebenen der pflanzlichen Pathogenabwehr, wodurch ihre Charakterisierung einerseits zum Verständnis von Virulenzmechanismen des Pathogens beiträgt, andererseits aber auch zu Erkenntnissen über Abwehrstrategien der Pflanze führt.

4.1. Das *Xanthomonas* Typ-III Effektorprotein XopS

Typ-III Effektorproteine phytopathogener Bakterien manipulieren über ihre enzymatischen Aktivitäten vielerlei Makromoleküle der Wirtspflanze, wie z.B. Proteine, Metaboliten oder Nukleinsäuren (Khan *et al.*, 2018). Weil die Charakterisierung von Effektorproteinen in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht hat, hat sich mittlerweile heraus kristallisiert, dass deren Zielproteine am häufigsten eine wichtige Rolle während der Immunantwort spielen (Lewis *et al.*, 2009; Deslandes & Rivas, 2012; Büttner, 2016). Die Manipulation anderer Zielproteine kann wiederum die Nährstoffaufnahme, oder aber eine optimale Nischenbildung für das Pathogen fördern (Chen *et al.*, 2010; Macho, 2016). Trotz einer Vielzahl an Studien, die die biochemischen Funktionen verschiedener T3Es und die Identifikation ihrer Substrate beschreiben, sind sowohl die Wirkungsweise, als auch die Zielproteine vieler anderer Effektoren bisher noch unbekannt. Der Typ-III Effektor XopS (von *Xanthomonas* *Outer Protein S*) aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) Stamm 85-10 ist ein bislang kaum charakterisiertes Protein.

XopS wurde mittels eines PIP (von *Plant-Inducible Promotor*)-Box Motivs in dessen Promotorregion als *Xanthomonas* T3E identifiziert (Schulze *et al.*, 2012). Dies ist eine konservierte Sequenz, welche von HrpX, einem der zwei wichtigsten regulatorischen Proteinen des T3SS, gebunden werden kann (Thieme *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass die Bindung von HrpX an diese Sequenz zur Aktivierung der Genexpression führt (Fenselau & Bonas, 1995; Wengelnik & Bonas, 1996). Dass es sich bei XopS tatsächlich um einen über das T3SS translozierten Effektor handelt, konnten Schulze und Kollegen in einer Studie von 2012 zeigen. Dazu wurde der aminoternale Bereich (Aminosäuren 1-157 von insgesamt 308) des Proteins an das Reporterprotein AvrBs3 Δ 2, ein Derivat des TAL Effektors AvrBs3, welches weder ein Typ-III Sekretions- noch ein Translokationssignal besitzt (Szurek *et al.*, 2002; Noël *et al.*, 2003), fusioniert. Diese Fusion führte in Paprika (*Capsicum annuum*) Pflanzen des Kultivars ECW-30R, über die Erkennung von AvrBs3 Δ 2 durch das entsprechende Resistenzgen *Bs3*, zur Ausbildung einer HR. Ohne die XopS-vermittelte Translokation von AvrBs3 Δ 2 über das *Xcv* 85* (ein Stamm mit konstitutiv exprimiertem Typ-III Sekretionssystem) T3SS hätte eine solche Immunantwort nicht zustande kommen können. Zudem wurde eine Abhängigkeit von dem Chaperon HpaB für die Translokation von XopS festgestellt, wodurch dieser T3E zur Klasse A der *Xcv* Typ-III Effektoren gezählt werden kann (Büttner *et al.*, 2006; Schulze *et al.*, 2012). Anhand von *in silico* Analysen der XopS Gensequenz konnten, bis auf das Vorhandensein des PIP-Motivs in seiner Promotorregion, keine weiteren bekannten Strukturen ermittelt und keine Homologien zu bekannten Effektorproteinen festgestellt werden (Schulze *et al.*, 2012). Somit ergibt sich daraus keine Herleitung zu seiner biochemischen Funktion oder Wirkungsweise. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es in erster Linie, das *Xcv* Typ-III Effektorprotein XopS funktionell zu charakterisieren. Dabei sollte im Speziellen auf eine in Vorarbeiten bestätigte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40 und dessen Rolle während der pflanzlichen Immunantwort eingegangen werden.

4.1.1. Die Virulenzfunktion des Typ-III Effektors XopS

Als ein effizienter Ansatz zur Funktionsaufklärung von Typ-III Effektoren wird häufig die genetische *gain-of-function*-Methode beschrieben (Munkvold & Martin, 2009). Dabei werden die zu untersuchenden Effektorproteine entweder stabil, induzierbar oder aber auch transient in Modellsystemen, wie z.B. Modellpflanzen oder Hefe, exprimiert, um daraufhin über weiterführende Analysen feststellen zu können, welchen Beitrag sie zur Virulenz oder Avirulenz des entsprechenden Pathogens leisten (Hauck *et al.*, 2003; López-Solanilla *et al.*, 2004; Munkvold *et al.*, 2008).

Die Herstellung stabiler transgener Pflanzen, die einen T3E über einen CaMV35S Promotor konstitutiv, oder über Dexamethason- oder β -Estradiol-Systeme induzierbar exprimieren, ist zwar zeitaufwendig, ermöglicht aber beispielsweise die Durchführung von aussagekräftigen Bakterienwachstumsanalysen (Munkvold & Martin, 2009). Um die Virulenzaktivität eines einzelnen Effektors zu analysieren werden transgene Linien vorzugsweise mit Pathogenmutanten infiziert, die nicht in der Lage sind, selbst T3Es in die Pflanzenzelle einzuschleusen und somit nicht virulent sind.

Darüber kann ausgeschlossen werden, dass eventuell sichtbare Effekte auf die pflanzlichen Immunreaktionen auf die Aktivität von pathogeneigenen Effektoren zurückzuführen ist. Ein bekanntes Beispiel für eine solche Pathogenmutante ist der T3SS-defiziente *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Stamm $\Delta hrcC$ (*Pst* $\Delta hrcC$). Das Gen *hrcC* (von *hrp-conserved C*) kodiert für eine Komponente des für die Pathogenität essentiellen Typ-III Sekretionssystems und seine Deletion führt dementsprechend dazu, dass die daraus resultierende Mutante weder in der Lage ist, sich im Pflanzengewebe zu vermehren, noch eine Krankheit der Pflanze auszulösen (Alfano & Collmer, 1997; Deng *et al.*, 1998; Boch *et al.*, 2002). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Herstellung transgener Arabidopsislinien, die mittels β -Estradiol Behandlung die Expression eines XopS-GFP Fusionsproteins induzieren, zur Aufdeckung einer XopS-abhängigen Interferenz mit PTI-Antworten führen. Es wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von XopS-GFP in unabhängigen transgenen Linien das Bakterienwachstum eines druckinfiltrierten *Pst* $\Delta hrcC$ Stammes signifikant förderte (Abb. 3.2) und dementsprechend in der Lage ist, basale induzierte Immunreaktionen während der apoplastischen Abwehr zu unterdrücken. Diese Schlussfolgerung deckt sich auch mit publizierten Daten aus Arabidopsis Protoplasten-Assays. In diesem experimentellen Ansatz wurde die Expression eines unter der Kontrolle von Promotoren verschiedener flg22-induzierbarer Gene stehenden Reportergens in Anwesenheit von T3Es quantifiziert. Während andere getestete T3Es nicht in der Lage waren, die Expression der Reportergenkonstrukte negativ zu beeinflussen, inhibierte XopS diese signifikant (Schulze *et al.*, 2012; Popov *et al.*, 2016). Obwohl sich der *gain-of-function* Ansatz bei der Analyse von Effektorproteinen häufig bewährt, birgt dieser allerdings auch Risiken. Die Überexpression von T3Es im Pflanzengewebe resultiert oftmals in deren unspezifische Aktivität. So werden wichtige zelluläre Prozesse umgesteuert, was zu physiologischen Veränderungen und gegebenenfalls auch zum Absterben von Zellen führen kann (Göhre & Robatzek, 2008). Dadurch können falsche Interpretationen der beobachteten Effekte nicht ausgeschlossen werden.

Zudem lässt im Falle der hier vorliegenden Studie die ektopische Expression von XopS in Arabidopsis keine Schlüsse über dessen tatsächliche Virulenzfunktion während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion zu. Ein genetischer *loss-of-function* Ansatz zur Untersuchung der Virulenzfunktion von XopS wurde von Schulze und Kollegen verfolgt (Schulze *et al.*, 2012). In dieser Studie wurde beschrieben, dass bei einer Druckinfiltration des Blattgewebes suszeptibler Paprika ECW Pflanzen *xopS*-defiziente *Xcv* 85-10 Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, keinen Wachstumsnachteil hatten. Erst durch die Deletion eines zweiten T3Es, XopB, wurde die bakterielle Vermehrung signifikant vermindert, was zur Hypothese führte, dass XopS und XopB redundante Funktionen innehaben.

Zudem führte die Tatsache, dass die alleinige Deletion von XopS keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum hatte, zu der Annahme, dass es sich bei XopS um keinen essentiellen Virulenzfaktor von *Xcv* 85-10 handelt (Schulze *et al.*, 2012). In der hier vorliegenden Studie konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass ein *xopS*-defizienter *Xcv* 85-10 (*XcvΔxopS*) Stamm bei einer *Dip*-Inokulation auf die Blattoberfläche von suszeptiblen Paprika ECW Pflanzen eine signifikant geringere Populationsdichte als der *Xcv* WT Stamm erreichen konnte (Abb. 3.7). Dieser Wachstumsnachteil der Pathogenmutante wurde durch die Wiedereinführung eines ektopisch exprimierenden XopS-HA Fusionsproteins über triparentale Konjugation in *XcvΔxopS* (*XcvΔxopS/XopS-HA*) wieder aufgehoben, was deutlich macht, dass der beobachtete Effekt allein abhängig von XopS ist (Abb. 3.7). Über die Druckinfiltration gelangen Bakterien direkt in den Apoplasten, während diese bei einer Inokulation von Blattoberflächen eigenständig bis ins Blattinnere vordringen müssen. So lassen sich die beschriebenen unterschiedlichen Beobachtungen vermutlich auf die verschiedenen angewandten experimentellen Ansätze zurückführen, wobei die Infektion über Druckinfiltration im Vergleich zur *Dip*-Inokulationsmethode eine wichtige Ebene der frühen pflanzlichen Abwehr, die präinvasive Immunantwort, umgeht. Die Ergebnisse des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperiments ähneln stark jenen aus der Studie an einem Coronatin (*cor*)-defizienten Stamm des Gram-negativen Phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3661) aus dem Jahre 1995. Dabei wurde gezeigt, dass *Pst* DC3661 im Vergleich zum COR-produzierenden Stamm *Pst* DC3000 bei einer *Dip*-Inokulation von Arabidopsis Pflanzen vier Tage nach Infektion einen ca. 4-6-fach geringeren Bakterientiter erreichte. Dem war nicht so, wenn *Pst* DC3661 über Druckinfiltration in das Blattgewebe eingebracht wurde (Mittal & Davis, 1995). Es sollte an dieser Stelle allerdings erwähnt werden, dass Coronatin kein Typ-III Effektorprotein ist.

Hierbei handelt es sich um ein phytotoxisches Polyketid, welches vielerlei Virulenzmechanismen von *Pseudomonas syringae* unterstützt (Völksch *et al.*, 1989; Mitchell, 1991; Geng *et al.*, 2012a). Dazu gehören beispielsweise die Wiederöffnung von Stomata, die bakterielle Vermehrung im Apoplasten, oder die Entwicklung von Krankheitssymptomen (Bender *et al.*, 1987; Brooks *et al.*, 2004; Melotto *et al.*, 2006; Uppalapati *et al.*, 2008). Die Entdeckung von Melotto und Kollegen im Jahre 2006, dass das von *Pst* DC3000 produzierte Coronatin eine Wiederöffnung von Stomata induziert, war das fehlende Puzzleteil, um die beobachteten Wachstumsunterschiede zwischen Druckinfiltration und *Dip*-Inokulation des *cor*-defizienten *Pst* DC3661 in der Studie von Mittal und Davis zu erklären. Somit wurde postuliert, dass Coronatin ein in die Unterdrückung der präinvasiven Immunreaktion involvierter Virulenzfaktor von *Pst* DC3000 ist (Melotto *et al.*, 2006). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Paprika ECW Blattscheiben auf einer *Xcv* Δ *xopS* Bakteriensuspension zur Schließung der Stomata führte, während sowohl *Xcv* WT, als auch der Komplementationsstamm *Xcv* Δ *xopS*/*XopS*-HA in der Lage waren, eine solche Schließung zu verhindern (Abb. 3.11). Die Reaktion der Stomata auf *Xcv* Δ *xopS* war hierbei vergleichbar mit dem Stomataschluss von Blattscheiben, welche mit dem T3SS-defizienten *Xcv* Δ *hrpF* Stamm (Büttner *et al.*, 2002) inkubiert wurden. Die Tatsache, dass die alleinige Deletion von XopS in *Xcv* Δ *xopS* den gleichen Effekt auf die Schließung der Stomata erzielte wie *Xcv* Δ *hrpF*, der keinen T3E in das Wirtsgewebe einschleusen kann, lässt die Annahme zu, dass XopS ein Hauptvirulenzfaktor von *Xcv* während der stomatären Immunantwort ist. Ähnliche Beobachtungen konnten in Experimenten an den Modellpflanzen *N. benthamiana* und *Arabidopsis* gemacht werden, wo die ektopische Expression von XopS-GFP die flg22-induzierte Schließung der Stomata verhinderte (Abb. 3.9 und 3.10). Dies lässt stark vermuten, dass XopS entweder in der Lage ist, den Stomataschluss von vorn herein zu verhindern, oder aber nach einer anfänglichen Schließung deren Wiederöffnung herbeizuführen, um auf diese Weise die Möglichkeit für das Bakterium in das Wirtsgewebe einzudringen, aufrechtzuerhalten. Bisher ist nicht bekannt, ob das T3SS von *Xcv* bereits vor seinem Eindringen in das Pflanzengewebe ausreichend funktional ist, um T3Es direkt in Schließzellen zu translozieren, oder ob die stomatäre Immunität ausgehend von nicht-stomatären Zellen beeinflusst wird. In einer im Jahre 2009 publizierten Studie von Zhang und Kollegen wurde ein *Xcv* *hrp-gfp* Reporterstamm dazu verwendet, um die Ausbildung eines T3SS während der epiphytischen Wachstumsphase zu untersuchen. Deren Daten lassen vermuten, dass die Expression des *hrp* Gens bereits in Zellen an der Blattoberfläche und vor allem in nächster Nähe zu den Schließzellen aktiviert wird (Zhang *et al.*, 2009).

Dementsprechend ist es durchaus möglich, dass *Xcv* T3Es, XopS eingeschlossen, direkt in die Schließzellen seiner Wirtspflanze transloziert. Ob auch andere Phytopathogene, wie z.B. *Pst* DC3000, *hrp* Gene in Zellen an der Blattoberfläche exprimieren, ist bislang nicht gänzlich bewiesen. Eine Studie aus dem Jahre 2002 zeigte allerdings, dass im Gegensatz zum *Xcv hrp-gfp* Reporterstamm ein *Pst* DC3000 *hrpA-gfp* Reporterstamm keine Aktivierung der *hrp* Genexpression an der Blattoberfläche zeigte (Boureau *et al.*, 2002). Dabei konnte jedoch weder ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung aus einer technischen Limitierung des experimentellen Ansatzes resultierte, oder aber, dass das *hrpA* Gen möglicherweise keines der in Schließzellen exprimierenden *hrp* Gene ist. Somit wären weitere Studien nötig, um aufzuklären, ob das T3SS von *Pst* oder anderen Gram-negativen Bakterien auch in Zellen an der Blattoberfläche funktionsfähig ist. Auch wenn anhand der hier gezeigten Daten die Vermutung naheliegt, dass aus dem Effektorrepertoire von *Xcv* 85-10 XopS den größten Beitrag zur Unterdrückung der stomatären Immunantwort leistet, kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass weitere T3Es dieses Stammes ebenso auf dieser Ebene der PTI wirken. So hat man beispielsweise kürzlich herausgefunden, dass das Bakterienwachstum einer *Xcv* 85-10 Mutante, bei welcher der T3E XopL aus dem Bakteriengenom deletiert worden war (*Xcv*Δ*xopL*), im Vergleich zum Wildtyp lediglich bei einer Infektion über *Dip*-Inokulation signifikant vermindert war (Leong *et al.*, 2021). Dies war nicht der Fall, wenn die Bakterien über Druckinfiltration direkt in den apoplastischen Raum gelangten (Singer *et al.*, 2013). XopL besitzt eine E3 Ligaseaktivität und wurde in dieser Studie als ein Effektorprotein identifiziert, der durch seine Autoubiquitinierung und die Assoziation mit der pflanzlichen Autophagiemaschinerie abgebaut wird. Diese Degradation wird dabei über den Autophagierezeptor NEIGHBOR OF BRCA1 (NBR1)/Joka2 vermittelt, welcher eine nachweisliche Rolle in der pflanzlichen Immunantwort spielt (Dagdas *et al.*, 2016; Hafrén *et al.*, 2017; Üstün *et al.*, 2018). Interessanterweise konnten Leong und Kollegen neben der NBR1/Joka2-abhängigen Degradation von XopL auch zeigen, dass derselbe Effektor über die Ubiquitinierung und dem daraus resultierenden Abbau der Autophagiemaschinerie-Komponente SH3P2 aus *Arabidopsis* eine Autophagie-Antwort hemmt. Darüber hinaus wird seine eigene Degradation durch den Abbau von SH3P2 verhindert. Es wurde hier ein Mechanismus beschrieben, der erklärt, wie *Xcv* Autophagie über einen T3E blockieren kann, um so seine Virulenz zu steigern (Leong *et al.*, 2021). Eine Studie von Yamauchi und Kollegen aus dem Jahre 2019 stellte einen Zusammenhang zwischen Autophagie und der Regulation der Stomata-Öffnung her.

Dabei wurde postuliert, dass eine für die Öffnung von Stomata notwendige Homöostase des ROS-Spiegels in Schließzellen über die Autophagie-abhängige Degradation von oxidierten Peroxisomen gewährleistet wird (Yamauchi *et al.*, 2019).

Ob Autophagie auch in die Regulation präinvasiver Immunantworten gegen angreifende Pathogene involviert ist, wurde bisher nicht gezeigt. Nimmt man aber die Beobachtungen aus den beiden oben genannten Studien zusammen (Yamauchi *et al.*, 2019; Leong *et al.*, 2021), könnte es ein mögliches Szenario sein, dass beispielsweise XopL aus *Xcv* über die Störung oder Modellierung von Autophagieprozessen in Schließzellen, präinvasive Immunantworten unterdrückt. Für den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten T3E XopS konnte eine Beeinträchtigung der Autophagie bereits ausgeschlossen werden (Leong *et al.*, 2021). Daraus ergibt sich, dass dieser Effektor die stomatare Immunität mit ziemlicher Sicherheit über einen anderen Mechanismus hemmt.

4.1.2. XopS beeinträchtigt die SA-abhängige Genexpression zugunsten von JA-vermittelten Immunantworten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, wie im vorangehenden Paragraphen beschrieben, eine frühere Beobachtung, bei der XopS keinen Einfluss auf das *in planta* Bakterienwachstum von *Xcv* 85-10 im Gewebe suszeptibler Paprika ECW Pflanzen hatte (Schulze *et al.*, 2012), widerlegt werden. Dennoch weisen beide Studien neben der Erkenntnis, dass XopS basale PTI-Antworten im Apoplasten unterdrückt, eine weitere Gemeinsamkeit auf. In einer unabhängigen phänotypischen Untersuchung konnte hier bestätigt werden, dass XopS für die Ausprägung von Krankheitssymptomen während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion verantwortlich ist (Abb. 3.6 und 3.8). Dabei ist die Translokation von XopS für die Ausbildung charakteristischer Chlorosen erforderlich. Zusätzlich dazu führte die ektopische Expression eines XopS-GFP Fusionsproteins in unabhängigen transgenen Arabidopsislinien ebenfalls zur Entwicklung von Blattchlorosen (Abb. 3.3). Dieser Phänotyp erinnert stark an zwei in der Literatur beschriebene Beispiele. Zum einen ist das von *Pst* DC3000 produzierte Phytotoxin Coronatin Auslöser für ähnliche chlorotische Symptome an Arabidopsis- und Tomatenblättern (Mittal & Davis, 1995). Zum anderen vermittelt die ektopische Expression des T3Es HopX1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pta*) Stamm 11528 die Entstehung von Blattchlorosen (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Interessanterweise wurde beiden genannten Virulenzfaktoren eine Rolle in der positiven Beeinflussung des JA-abhängigen Signalweges zugeschrieben.

Das Phytohormon Jasmonsäure wird meist als essentieller Botenstoff bei der Signalweiterleitung in Antwort auf einen Herbivorangriff oder auf ein nekrotrophes Pflanzenpathogen beschrieben (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003, 2004).

Dem gegenüber steht ein zweiter Signalweg, der in Abhängigkeit des Phytohormons Salicylsäure typischerweise, aber nicht ausschließlich an der Abwehr biotropher pathogener Mikroben beteiligt ist (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2012). Weil Pflanzen in der freien Natur meist gleichzeitig mehreren Stressfaktoren bzw. unterschiedlichsten Pathogenen ausgesetzt sind, gewährleistet ein Netzwerk aus Phytohormon-Wechselwirkungen eine auf den jeweiligen Angreifer zugeschnittene Regulation der Immunantwort (Reymond & Farmer, 1998). Andere Phytohormone, wie z.B. Auxin oder Ethylen, spielen in der pflanzlichen Immunantwort auch eine wichtige Rolle (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), wurden im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Studie aber nicht untersucht, weshalb darauf an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Diverse Studien zur Wechselwirkung zwischen JA und SA an der Modellpflanze *Arabidopsis*, aber auch an anderen Pflanzenspezies, postulierten einen Wirkantagonismus der beiden Phytohormone (Doherty *et al.*, 1988; Pena-Cortés *et al.*, 1993; Van Wees *et al.*, 1999; Spoel *et al.*, 2003). Die Einflussnahme auf die Hormonnetzwerke wurde im Laufe der Evolution zu einer Virulenzstrategie vieler phytopathogener Mikroben (Spoel & Dong, 2008). So gibt es beispielsweise Studien dazu, dass einige hemibiotrophe Phytopathogene wie z.B. *Pseudomonas syringae* in der Lage sind, durch die Aktivierung von JA-abhängigen Signalwegen eine Perturbation der gegen biotrophe und hemibiotrophe Mikroben wirkende SA-Antworten zu ermöglichen und infolgedessen die Suszeptibilität ihrer Wirtspflanze zu erhöhen (Katsir *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Das von verschiedenen *Pseudomonas syringae* Pathovaren gebildete Coronatin wurde beispielsweise als molekulare Mimikry der biologisch aktiven Form der Jasmonsäure, JA-Ile, identifiziert (Nomura *et al.*, 2005). Dabei bindet COR direkt an den JA Rezeptor COI1, einem F-box Protein, welches den proteasomalen Abbau von JAZ Proteinen über einen SCF^{COI1} E3 Ligase Komplex reguliert (Katsir *et al.*, 2008). Bei JAZ Proteinen handelt es sich um negativregulatorische Proteine, die die Transkription JA-responsiver Gene durch die Repression von Transkriptionsfaktoren wie z.B. MYC2, MYC3 oder MYC4 unterdrückt (Fernández-Calvo *et al.*, 2011). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass COR ca. 1000-fach aktiver ist als JA-Ile selbst und dass seine Bindung an COI1 essentiell für dessen Virulenzfunktion ist, da *coi1* bzw. *jai1* Mutanten aus jeweils *Arabidopsis* bzw. Tomate nicht in der Lage sind, auf eine COR Behandlung zu reagieren (Feys *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2003; Katsir *et al.*, 2008).

Die Produktion von COR von Seiten des hemibiotrophen Phytopathogens *Pseudomonas syringae* hat zur Folge, dass durch den Abbau von JAZ Proteinen JA-abhängige Immunantworten induziert werden, was wiederum zu einer indirekten Unterdrückung des antagonistischen SA-Signalwegs führt (Brooks *et al.*, 2005; Ishiga *et al.*, 2010).

So konnten Zhao und Kollegen beispielsweise zeigen, dass verschiedene SA-responsive Gene wie *PR-1b*, *PR-2b* oder *PR-7* in *Pst* DC3000 infizierten Tomaten geringer exprimiert sind als in Pflanzen, die mit einer *cor*-defizienten Mutante infiziert worden waren (Zhao *et al.*, 2003). Zudem konnten Brooks und Kollegen im Jahre 2005 diese Daten untermauern, indem sie Studien an SA-insensitiven Arabidopsis Pflanzen durchführten. Während das Bakterienwachstum eines *cor*-defizienten *Pst* DC3000 Stammes in Arabidopsis Col-0 Wildtyp Pflanzen im Vergleich zu *Pst* DC3000 Wildtyp geringer war, waren beide Stämme in transgenen *NahG* Arabidopsislinien und *sid2-2* Mutanten, die nicht in der Lage sind hohe Level an SA zu akkumulieren, gleichermaßen virulent (Brooks *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob der *Xcv* T3E XopS, ähnlich wie COR, einen Einfluss auf das Phytohormonnetzwerk hat, wurden im Rahmen dieser Studie u.a. Genexpressionsanalysen an *Xcv* WT- und *Xcv*Δ*xopS*-infizierten Paprika Pflanzen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass XopS sowohl die Expression des SA-responsiven Gens *CaPRI*, als auch die des Negativregulators der JA-abhängigen Antwort *CaJAZ8* reprimiert (Abb. 3.12). Die daraus resultierende Annahme, dass XopS während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion möglicherweise JA-abhängige Antworten induziert, um SA-abhängige Antworten zu reprimieren, wurde durch eine Messung der SA- und JA-Gehalte in infiziertem Blattgewebe unterstützt. Während die gemessenen Gehalte an freiem und konjugiertem (freies SA und SA-Glucoside) SA in *Xcv* WT infiziertem Blattgewebe bereits höher waren als in Kontrollpflanzen, führte die Infektion der Pflanzen mit *Xcv*Δ*xopS* zu einem noch signifikanteren Anstieg der SA-Mengen (Abb. 3.13). Die Messung der JA Level in *Xcv* WT, *Xcv*Δ*xopS* und *Xcv*Δ*xopS*/*XopS*-HA Pflanzen zeigten den Trend, dass ein *xopS*-defizienter *Xcv* Stamm zur Akkumulation eines geringeren JA-Gehalts im infizierten Blattgewebe führt, als es eine Infektion mit *Xcv* WT oder einem *Xcv*Δ*xopS*/*XopS*-HA Komplementationsstamm tut. Allerdings sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass die für die Bestimmung der JA-Gehalte aus Paprika Blattgewebe verwendete Methode vermutlich nicht besonders gut geeignet war. In nicht-infizierten Blattproben war der gemessene JA-Gehalt beispielsweise unter der Nachweisgrenze, was auf eine technische Limitierung hindeuten könnte. Vermutlich konnte mit der angewandten Methode nicht genügend JA aus dieser Pflanzenspezies extrahiert werden, sodass auch die Unterschiede zwischen den Behandlungen in der Messung weniger markant waren.

Durch eine Optimierung der Extraktionsmethode könnte eine technische Limitierung ausgeschlossen werden. Für die Messung der JA-Gehalte wurde, in Anlehnung an die SA Messung, das zu untersuchende Blattmaterial zwei Tage nach der Infektion mit den verschiedenen Stämmen geerntet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Zeitpunkt der Probennahme ein weiterer limitierender Faktor war. Das Infektionsgeschehen ist schon alleine wegen der Vielzahl an verschiedenen eingeschleusten T3Es in das Wirtsgewebe, die zum Teil unterschiedliche, zum Teil aber auch redundante Funktionen innehaben, ein äußerst dynamischer Prozess. Dazu kommt, dass in den Pflanzen im Laufe der Infektion eine drastische Umprogrammierung verschiedenster zellulärer Prozesse stattfindet, welche sich ebenso auf die Regulation des Phytohormonnetzwerks auswirken. Ein Zeitkursexperiment, bei welchem die JA-Gehalte in infiziertem Blattgewebe an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt werden, könnte Aufschluss über eventuelle Dynamiken in der XopS-abhängigen Akkumulation des Phytohormons während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion geben. Dass der *Xcv* T3E XopS tatsächlich eine positive Wirkung auf JA-abhängige Antworten hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit über durchgeführte Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis* bestätigt werden. So zeigte eine β -Estradiol induzierte ektopische Expression des XopS-GFP Fusionsproteins in transgenen *Arabidopsis*linien im Vergleich zu Kontrollpflanzen einen signifikanten Anstieg im mRNA-Level der JA-responsiven Gene *AtMYC2* und *AtJAZ10* (Abb. 3.4). Zusätzlich zu den Genexpressionsanalysen wurde der JA-Gehalt in jener Linie, die den Effektor stärker exprimiert, bestimmt. Aus der Analyse ergab sich, dass XopS-GFP 24 Stunden nach Induktion für eine signifikante Akkumulation dieses Phytohormons verantwortlich war (Abb. 3.5).

Zusammengefasst kann aus den hier erworbenen Erkenntnissen geschlussfolgert werden, dass der *Xcv* T3E XopS einerseits SA-abhängige Immunantworten supprimiert und andererseits eine Aktivierung des JA Signalweges begünstigt, was eine höhere Suszeptibilität der Wirtspflanze zur Folge hat. Diese Ergebnisse passen nicht nur zu den beschriebenen Effekten von Coronatin auf die Suppression pflanzlicher Abwehrreaktionen, sondern auch auf publizierte Daten zum T3E HopX1 aus *Pta* 11528, der, wie eingangs erwähnt, ebenso wie XopS und COR einen stark chlorotischen Phänotyp in infiziertem Blattgewebe auslöst (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). *Pta* 11528 produziert im Gegensatz zu *Pst* DC3000 kein Coronatin und es wird deshalb angenommen, dass *Pta* 11528 HopX1 als alternativen Virulenzfaktor verwendet, um durch die Aktivierung der JA-abhängigen Antworten eine Hemmung SA-vermittelter Antworten zu fördern und dementsprechend die Krankheitsanfälligkeit von *Arabidopsis* zu erhöhen.

HopX1 übt diese Virulenzfunktion über seine enzymatische Aktivität als Protease aus, indem er die bereits erwähnten JAZ Proteine degradiert (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Im Falle des *Xcv* 85-10 translozierten Typ-III Effektors XopS lassen die neuen Erkenntnisse, zusammen mit der starken Übereinstimmung der XopS-abhängigen Symptomausprägung mit jener, die durch Coronatin oder den *Pta* Effektor HopX1 ausgelöst wird, stark vermuten, dass dieser T3E ebenso einen direkten Einfluss auf die JA Antwort hat und dass die Repression von SA-abhängigen Antworten indirekt daraus resultiert. Derzeit gibt es allerdings keine direkten experimentellen Hinweise darauf, über welchen Mechanismus XopS eine Aktivierung JA-abhängiger Signalwege auslöst. Obwohl bislang keine Protein-Protein Interaktionsstudien nahelegen, dass XopS wie HopX1 zu einer Destabilisierung von JAZ Proteinen führt, kann dies nicht ausgeschlossen werden. Eine transiente Ko-Expression von affinitätsmarkierten XopS und JAZ Fusionsproteinen in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* mit einer angeschlossenen Western Blot Analyse könnte erste Indikationen zu Tage bringen, ob XopS die JA Antwort möglicherweise über diesen Weg aktivieren könnte.

Für das hemibiotrophe Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* wurde bislang kein weiterer T3E beschrieben, der durch die Aktivierung des JA-abhängigen Signalweges indirekt SA Antworten unterdrückt. Allerdings gibt es Beispiele dafür, dass andere *Xcv* Effektoren durch alternative Strategien zur Suppression SA-induzierter Abwehrmechanismen beitragen. So wurde beispielsweise für den *Xcv* Effektor XopJ gezeigt, dass er über seine Cystein-Proteaseaktivität eine wichtige Komponente des 26S Proteasoms, die 19S regulatorische Untereinheit RPT6 (von *Regulatory Particle AAA-ATPase 6*), abbaut, um so die Degradation von NPR1, einer Schlüsselkomponente im SA-vermittelten Signalweg, zu verhindern (Üstün *et al.*, 2013; Üstün & Börnke, 2015). Weil eine solche Degradation zur vollständigen und effizienten Aktivierung SA-responsiver Gene notwendig ist (Spoel *et al.*, 2009), kann *Xcv* über den XopJ-vermittelten inhibitorischen Effekt auf den proteasomalen NPR1 Abbau SA-abhängige Immunantworten auf direktem Wege unterdrücken. Ein anderer T3E aus dem Effektorenrepertoire von *Xcv* 85-10, XopD, hemmt den SA-vermittelten Signalweg ebenfalls. Dabei dachte man aufgrund der Beobachtung, dass dieser Effektor in der Lage ist, die Akkumulation von SA in Tomatenpflanzen zu hemmen zunächst auch an eine direkte Beeinflussung des SA-Signalweges (Kim *et al.*, 2008). Einige Jahre später konnten Kim und Kollegen allerdings zeigen, dass die Hemmung der SA Akkumulation durch XopD indirekt aus der Suppression von Ethylen-abhängigen Abwehrantworten resultierte (Kim *et al.*, 2013). Da zum jetzigen Zeitpunkt der Wirkmechanismus mit dem XopS die Aktivierung des JA-Weges fördert noch nicht aufgeklärt werden konnte, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass

XopS möglicherweise zusätzlich dazu auch direkt auf die Unterdrückung SA-abhängiger Immunantworten Einfluss nehmen könnte.

Die Tatsache, dass *Xcv* nicht nur einen, sondern mehrere T3Es dazu verwendet phytohormonelle Signalnetzwerke zu manipulieren, könnte verschiedene Gründe haben. So könnte man davon ausgehen, dass die Unterdrückung des SA-Weges durch mehrere T3Es die Effektivität eines einzelnen um ein Vielfaches potenziert. Da der phytohormonelle *cross-talk* sich nicht auf eine Ebene der pflanzlichen Immunantwort beschränkt, sondern während des gesamten Infektionsgeschehens eine wichtige Rolle spielt, wäre eine weitere mögliche Erklärung für den Einsatz mehrerer T3Es, dass diese raum-zeitlich getrennt voneinander wirken. Im Falle von XopS lässt sich die Beobachtung, dass seine Translokation während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion, sowie seine ektopische Expression in transgenen Arabidopsislinien zu einer Induktion des JA-Signalweges führen, beispielsweise gut mit der Erkenntnis verknüpfen, dass dieser Effektor die sehr frühe stomatäre Immunantwort manipuliert. Die Jasmonsäure wurde im Gegensatz zur Abscisin- und Salicylsäure als Negativregulator der präinvasiven Immunantworten beschrieben (Melotto *et al.*, 2017). Verschiedene Studien an *Pseudomonas syringae* zeigten, dass dieses Pathogen mittels verschiedener T3Es, wie z.B. AvrB, HopZ1 oder HopX1, aber auch mittels Coronatin eine Aktivierung des JA-Weges in Schließzellen herbeiführt, um deren Schließung in Antwort auf die Pathogenerkennung zu verhindern, oder aber um verschlossene Stomata wieder zu öffnen (Melotto *et al.*, 2006; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). Der einzige bisher charakterisierte T3E der von einem Vertreter der Gattung *Xanthomonas* transloziert wird und auf der Ebene der präinvasiven Immunität wirkt, ist XopR aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Wang *et al.*, 2016). Allerdings geht man hier nicht davon aus, dass XopR einen PAMP-induzierten Stomataschluss durch die Aktivierung des JA-Signalweges supprimiert, sondern dass dies über eine Interaktion mit der RLCK BIK1 und anderen RLCKs geschieht. Man weiß, dass BIK1 in der Lage ist, die für die ROS Produktion notwendige NADPH Oxidase RBOHD zu regulieren (Li *et al.*, 2014). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist ein wichtiges Signal für die PAMP-vermittelte Schließung der Stomata (Macho *et al.*, 2012). Somit wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass XopR durch seine Interaktion mit BIK1 die RBOHD-Aktivität inhibiert und somit zur Hemmung präinvasiver Immunantworten beiträgt (Wang *et al.*, 2016). Diese Hypothese konnte bislang allerdings nicht bestätigt werden. Es ist also naheliegend, dass das hier untersuchte Effektorprotein XopS der erste T3E aus dem Effektorenrepertoire von *Xcv* ist, welche über die Aktivierung des JA-Signalweges stomatäre Immunantworten manipuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere Parallelen zwischen dem *Xcv* T3E XopS und den aus *Pseudomonas syringae* stammenden Virulenzfaktoren Coronatin und HopX1 aufgedeckt werden. Um vollends zu klären, ob XopS tatsächlich eine analoge Wirkungsweise zu Coronatin hat, sollten an dieser Stelle weitere Analysen durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel, über triparentale Konjugation ein XopS-Fusionsprotein in einen *cor*-defizienten *Pseudomonas syringae* Stamm einzubringen und folglich zu untersuchen, ob XopS in der Lage ist, das Fehlen von Coronatin beispielsweise während präinvasiver Immunreaktionen zu komplementieren.

4.1.3. XopS interagiert mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40

Die Identifikation pflanzlicher Zielproteine eines zu untersuchenden, translozierten Typ-III Effektors ist wichtig, um ein besseres Verständnis dafür, wie zelluläre Prozesse in der Wirtspflanze durch den entsprechenden T3E manipuliert werden, erlangen zu können. In Vorarbeiten zu dieser Studie konnte zunächst anhand einer Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung ein WRKY Transkriptionsfaktor (TF) als potentieller Interaktionspartner von XopS ermittelt werden. Basierend auf einem Polypeptid Sequenzvergleich mit der am besten untersuchten Referenzdatenbank aus Arabidopsis konnte über eine *BLAST* Analyse festgestellt werden, dass das im Y2H identifizierte Protein die größte Ähnlichkeit (64%) zum Arabidopsis TF WRKY40 hat, woraufhin es als *NtWRKY40* bezeichnet wurde. Darauf aufbauend wurde eine Interaktion zwischen XopS und dem *NtWRKY40* Ortholog aus *N. benthamiana* (*NbWRKY40*) in Hefe und *in planta* über BiFC und Ko-IP Analysen in *N. benthamiana* bestätigt, wobei die BiFC Analyse außerdem zeigen konnte, dass es sich um eine im Zellkern stattfindende Wechselwirkung handelt. Während eine *in planta* Interaktionsstudie nicht ausschließen kann, dass weitere pflanzliche Komponenten die Wechselwirkung zwischen zu untersuchenden Proteinen vermittelt, konnte eine zusätzliche *in vitro* Ko-IP, bei welcher lediglich die zwei potentiellen Interaktionspartner im Reaktionsansatz vorhanden sind, eine direkte Interaktion zwischen XopS und *NbWRKY40* bestätigen. Somit wird nicht davon ausgegangen, dass für die Bindung des T3Es XopS an den TF *NbWRKY40* ein zusätzliches pflanzliches Protein oder ein anderer eukaryotischer Faktor von Nöten ist. Dennoch konnte bzw. kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass diese Interaktion durch weitere, bisher nicht identifizierte Partner beeinflusst wird. Die im vorangehenden Absatz beschriebenen Vorarbeiten sind in Abb. 1.6 dargestellt. Während für die Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung eine cDNA Bibliothek aus *Nicotiana tabacum* verwendet worden war, wurden die *in planta* Interaktionsstudien an der Modellpflanze *N. benthamiana* durchgeführt.

Obwohl keine der beiden Tabakgattungen eine natürliche Wirtspflanze von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist, konnte bereits eine Studie von Üstün und Kollegen zeigen, dass sich beide Systeme dennoch für Protein-Protein Interaktionsstudien zwischen *Xcv* T3Es und pflanzlichen Zielproteinen eignen (Üstün *et al.*, 2013). Eine direkte Interaktion in Hefe zwischen XopS und den *Nb*WRKY40 Orthologen Proteinen aus Arabidopsis (*At*WRKY40) und der *Xcv* Wirtspflanze Paprika ECW (*Ca*WRKY40a, *Ca* für *Capsicum annum*) konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 3.15). An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass es im Paprikagenom zwei annotierte Versionen des WRKY40 TFs gibt (Ca00g87690 und Ca03g32070), die in einer *BLAST* Analyse allerdings nur eine 71%ige Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Ein *Clustal W* Sequenzvergleich mit den XopS interagierenden *Nt*WRKY40 und *Nb*WRKY40 Orthologen zeigte, dass sich die Aminosäuresequenz von Ca03g32070 damit eher deckt als jene von Ca00g87690 (Abb. 3.14). Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum *Nb*WRKY40 Ortholog aus Paprika beziehen sich dementsprechend auf das Protein mit dem Genlocus Ca03g32070, welches hier vorläufig *Ca*WRKY40a genannt wurde. Eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor WRKY40 im Zellkern suggeriert, dass XopS möglicherweise die Genexpression der Wirtspflanze modulieren könnte. Dies ist keine unbekanntes Virulenzstrategie phytopathogener Organismen. So gibt es in der Literatur beschriebene Beispiele von T3Es die entweder direkt auf die Aktivität der Transkriptionsmaschinerie wirken, wie z.B. die TAL Effektoren aus verschiedenen *Xanthomonas* spp., oder aber andere wie HopD1 oder HopM1 aus *Pseudomonas syringae*, die durch das Binden an Transkriptionsfaktoren oder RNA Bindeproteine die Genexpression auf eine indirekte Weise umsteuern (Büttner, 2016). Die hier beobachtete Interaktion des XopS T3Es mit einem WRKY Transkriptionsfaktor ist ebenfalls kein Präzedenzfall. So konnte gezeigt werden, dass der T3E PopP2, der vom Gram-negativen Bakterium *Ralstonia solanacearum* in das Gewebe seiner Wirtspflanzen transloziert wird, über seine Acetyltransferaseaktivität eine Reihe an WRKY TFs acetyliert (Le Roux *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2015). Die PopP2-vermittelte Acetylierung von WRKY Domänen mehrerer Abwehr-assoziiertes WRKY TFs interferiert dabei mit deren Bindung an W-Boxen innerhalb der Promotorregionen ihrer Zielgene, was zu einer reduzierten Genexpression von Abwehrgenen führt (Le Roux *et al.*, 2015).

Interessanterweise scheint PopP2 dabei die Bindung an WRKY TFs der Untergruppe IIa, wie z.B. *At*WRKY40 und *At*WRKY60, spezifisch zu vermeiden, was sich darin widerspiegelt, dass die genannten TFs kein Acetylierungssubstrat dieses Effektors sind (Le Roux *et al.*, 2015).

Sowohl *At*WRKY40 als auch *At*WRKY60 wurden, zusammen mit *At*WRKY18, als Negativregulatoren der Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis beschrieben (Xu *et al.*, 2006). Nennenswert dabei ist allerdings die Vermutung, dass *At*WRKY18 alleine eine positivregulatorische Funktion während der systemisch erworbenen Resistenz (SAR, von *Systemic Acquired Resistance*) zu haben scheint (Wang *et al.*, 2006). Im Vergleich zu *At*WRKY40 und *At*WRKY60 wird *At*WRKY18 vom T3E PopP2 acetyliert (Le Roux *et al.*, 2015). So wurde von Le Roux und Kollegen postuliert, dass PopP2 vermutlich einen gewissen Grad an Substratspezifität entwickelt hat, wodurch die Acetylierung und die damit verbundene Inaktivierung von Negativregulatoren der pflanzlichen Abwehr, die für eine erfolgreiche bakterielle Infektion von Nachteil wäre, vermieden werden kann (Le Roux *et al.*, 2015).

Eine Interaktion zwischen dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Xanthomonas* T3E XopS und dem bislang für Arabidopsis bestätigten Negativregulator der pflanzlichen Immunantwort WRKY40 deutete darauf hin, dass *Xcv* mit XopS eine andere Virulenzstrategie verfolgt, als es *Ralstonia solanacearum* mit PopP2 tut. XopS interagiert mit WRKY40 Orthologen aus verschiedenen Pflanzenspezies, aber bindet nicht an den TF *Nb*WRKY8 (Raffener *et al.*, 2021), einem WRKY TF aus der Untergruppe I, welcher die Induktion von Abwehrgenen fördert (Ishihama *et al.*, 2011). Dies spricht wieder für eine im Vergleich zum Effektor PopP2 gegenläufige Selektivität der Zielproteine seitens XopS. Die Charakterisierung der Interaktion zwischen XopS und dem WRKY40 TF war eine wichtige Zielsetzung dieser Arbeit.

4.1.4. Untersuchungen zur biochemischen Funktion von XopS

Neben der Identifikation von WRKY40 als Zielprotein des *Xcv* T3Es XopS konnten Vorarbeiten zu dieser Studie auch Hinweise liefern, dass der Effektor durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors führt, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abb. 1.7 und Abb. 3.16). Dabei führte die transiente Ko-Expression zweier Fusionsproteine in *N. benthamiana*, XopS-GFP und *Nb*WRKY40-HA, zu einer XopS-abhängigen Akkumulation des *Nb*WRKY40-HA Proteinlevels. Bei einer Ko-Expression von XopS-GFP und *At*DUF851-18-myc (Nietzsche *et al.*, 2014), einem Protein ohne nachgewiesene oder vermutete Beteiligung an der pflanzlichen Immunantwort, blieb eine Akkumulation des Proteins im Vergleich zur Kontrolle ohne Ko-Infiltration von XopS-GFP aus (Abb. 3.16). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der T3E wahllos pflanzliche Proteine stabilisiert, sondern dass der Effekt auf den *Nb*WRKY40 TF spezifisch sein muss. Dennoch sollte an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass XopS mögliche andere pflanzliche Zielproteine, falls vorhanden, ebenfalls stabilisieren könnte.

Die Akkumulation von *NbWRKY40*-HA durch XopS-GFP war ähnlich ausgeprägt wie jene, die die Infiltration eines *NbWRKY40*-HA exprimierenden *N. benthamiana* Blattes mit dem bekannten Proteasominhibitor MG132 zur Folge hatte (Abb. 1.7). Weiter konnte die transiente Ko-Expression eines *NbWRKY40*-GFP Fusionsproteins mit MG132 oder XopS-HA, gefolgt von einer Aufreinigung des GFP-markierten Proteins aus dem Pflanzenextrakt über *GFP-Trap*[®] anhand einer anti-Ubiquitin Western Blot Analyse zeigen, dass sowohl MG132 als auch XopS-HA zu einer starken Akkumulation von ubiquitiniertem *NbWRKY40*-GFP Protein führten (Experiment durchgeführt von Dr. Suayb Üstün, ZMBP Tübingen, Abbildung 1.7). Aufgrund dieser Daten wird angenommen, dass *NbWRKY40* *in planta* über das 26S Proteasom reguliert wird und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass XopS vermutlich mit dem proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors interferiert.

Eine Degradation über das 26S Proteasom wurde schon für mehrere WRKY TFs als Regulationsmechanismus beschrieben, worüber die Expression ihrer Zielgene in Antwort auf eine ganze Reihe an verschiedenen Stimuli, einschließlich der Immunantworten, gesteuert werden kann (Miao & Zentgraf, 2010; Matsushita *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021a). Die für die 26S Proteasom-vermittelte Degradation notwendige Ubiquitin-Markierung eines Substratproteins erfolgt über eine dreistufige enzymatische Kaskade, welche die Enzyme E1 (aktivierendes Enzym), E2 (konjugierendes Enzym) und eine E3 Ligase benötigt (Furlan & Trujillo, 2017). Diese enzymatische Signalkaskade bildet zusammen mit dem proteasomalen Abbau eines Substratproteins über das eukaryotische 26S Proteasom das sogenannte Ubiquitin-Proteasom-System (UPS, von *Ubiquitin Proteasome System*). Weil das UPS ein wichtiger Knotenpunkt zur Regulation vieler zellulärer Prozesse ist und demnach ebenfalls eine zentrale Rolle in Kontrolle von Hormonsignalnetzwerken und Immunantworten einnimmt, wurde es im Laufe der Evolution zu einem Virulenzziel verschiedener Typ-III Effektoren (Price & Abu Kwaik, 2010; Dudler, 2014; Duplan & Rivas, 2014; Banfield, 2015). Während der bereits genannte T3E XopJ aus *Xcv* das 26S Proteasom zum direkten Ziel hat, indem er den Abbau einer regulatorischen Untereinheit katalysiert, binden diverse andere T3Es an E3 Ligasen oder haben selbst eine enzymatische E3 Ligase Funktion, um mit der Regulation ihrer Zielproteine zu interferieren (Nomura *et al.*, 2006; Angot *et al.*, 2006; Singer *et al.*, 2013; Üstün *et al.*, 2013). Die Beobachtungen zur XopS-abhängigen Proteinstabilität des WRKY40 TFs legen nahe, dass dieser Effektor entweder mit der Aktivität des Proteasoms als solches, oder aber mit der Ubiquitinierungskaskade interferieren könnte. Die Beeinflussung der 26S Proteasomaktivität konnte in einem weiteren Vorexperiment zu dieser Studie bereits ausgeschlossen werden (Experiment durchgeführt von Dr. Suayb Üstün, ZMBP Tübingen, Abbildung 1.7).

Das Binden von T3Es an E3 Ligasen oder das Ausüben einer E3 Ligase Funktion wird meist damit in Verbindung gebracht, dass Komponenten, die für die Etablierung einer effizienten Immunantwort essentiell sind, abgebaut werden. Ein Beispiel für ein solches Szenario ist der T3E AvrPtoB aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. So konnten Göhre und Kollegen beispielsweise zeigen, dass AvrPtoB über seine E3 Ligase Funktion die Polyubiquitinierung und somit die anschließende Degradation der FLS2 Kinasedomäne vermittelt und dementsprechend für die volle Virulenz von *Pst* DC3000 notwendig ist (Göhre *et al.*, 2008).

Die Untersuchungen zur XopS-vermittelten Proteinstabilität von *NbWRKY40* sprechen allerdings für einen gegenteiligen Effekt dieses Effektors auf sein Zielprotein. Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass es sich, zumindest anhand der bekannten Daten aus *Arabidopsis*, bei WRKY40 um einen Negativregulator der Abwehr handelt (Xu *et al.*, 2006). Dementsprechend würde es für die Virulenz von *Xcv* förderlich sein einen Effektor einzusetzen, der in der Lage ist, die Bindung des transkriptionellen Repressors an die Promotorregionen seiner Zielgene durch die Inhibierung seines proteasomalen Abbaus stabil zu halten, um damit die bei einem Pathogenangriff ausgelösten Immunantworten zu schwächen. So wäre es zunächst naheliegend, eine E3 Ligaseaktivität für XopS auszuschließen. Allerdings wird die Vermittlung eines Substratproteins an die 26S Proteasom-Degradationsmaschinerie klassischerweise dann eingeleitet, wenn dieses von E3 Ligasen mit K48-verbundenen Polyubiquitinketten markiert wird (Finley, 2009). Jedoch gibt es auch andere Arten der Ubiquitinierung, welche sowohl die Mono-als auch die Polyubiquitinierung einschließen. Dabei werden Ubiquitinketten beispielsweise über die Verbindung der Lysinreste K6-, K11-, K27-, K29-, K33- oder K63 innerhalb der Ubiquitinmoleküle, oder aber über eine Aneinanderreihung der C-oder N-Termini einzelner Ubiquitineinheiten (z.B. lineare Ubiquitinierung) hergestellt (Kulathu & Komander, 2012). Obwohl diese Arten der Ubiquitinierung bisher nicht besonders gut untersucht sind, scheinen sie dennoch eine wichtige Rolle in unterschiedlichen nicht-proteolytischen zellulären Prozessen, wie z.B. der Chromatin-Organisation, der DNA Reparatur, der Transkription oder des Protein Transportes, einzunehmen (Mukhopadhyay & Riezman, 2007).

Derzeit ist es unklar, wie genau sich solche atypischen Ubiquitinkonjugate bilden oder ob XopS sich direkt oder indirekt über weitere Hilfsproteine auf die Ubiquitinketten-Topologie von WRKY40 auswirken könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen geführt, die Aufschluss über eine mögliche enzymatische Aktivität als E3 Ligase für den T3E XopS geben sollten. Dabei wurde gezeigt, dass XopS unter keiner der getesteten *in vitro* Bedingungen eine solche biochemische Funktion inne zu haben scheint (Abb. 3.19).

Vollends kann diese Möglichkeit jedoch nicht ausgeschlossen werden, da z.B. nur drei E2-konjugierende Enzyme zusammen mit XopS als putativer E3 Ligase getestet werden konnten. Weil aber gerade die E2-konjugierenden Enzyme hauptsächlich dafür verantwortlich sind, welche Polyubiquitinverbindung auf das jeweilige Substrat übertragen wird (Ye & Rape, 2009), wäre eine Untersuchung mehrerer E2-XopS Kombinationen nötig, um diese Hypothese zu verifizieren oder zu dementieren. Weiter wäre es an dieser Stelle wichtig, Ubiquitinierungsstellen innerhalb der WRKY40 Polypeptidsequenz zu identifizieren. So wäre es hier beispielsweise interessant, eventuelle Veränderungen im WRKY40 Ubiquitinierungsmuster in An- und Abwesenheit des T3Es XopS aufzudecken.

Eine *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz von *NbWRKY40* ermöglichte die Vorhersage von sieben Lysinresten, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als Ubiquitinierungsstellen fungieren (Abb. 3.46). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte IP-MS Analyse ermöglichte allerdings keine Identifizierung von *in planta* Ubiquitinierungsstellen am WRKY40 Transkriptionsfaktor. Der Grund dafür war voraussichtlich technischer Natur. So ist es naheliegend, dass für diese Art der Analyse nicht genug *NbWRKY40* Protein über die Immunopräzipitation angereichert werden konnte. Eine Wiederholung der Analyse mit vorangehender Anreicherung der Zellkernfraktion könnte eine solche technische Limitierung minimieren und könnte dementsprechend eine Identifikation von *in planta* WRKY40 Ubiquitinierungsstellen ermöglichen.

Aus der Literatur sind Typ-III Effektoren bekannt, die durch die Hemmung von E3 Ligaseaktivitäten eine Krankheitsausprägung begünstigen. So interagiert das Effektorprotein XopP aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mit der E3 Ligase PUB44 in Reis (*Oryza sativa*, *OsPUB44*), um über einen bisher unbekanntem Mechanismus dessen Aktivität zu inhibieren und somit Immunantworten zur Eindämmung des Pathogens zu unterdrücken (Ishikawa *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel für eine solche Virulenzstrategie lieferten Lin und Kollegen in einer kürzlich publizierten Studie. Darin wurde postuliert, dass das Effektorprotein Avr1d aus dem Oomyceten *Phytophthora sojae* die Aktivität der für die Immunantwort seiner Wirtspflanze Soja (*Glycine max*, *Gm*) wichtigen E3 Ligase *GmPUB13* reprimiert (Lin *et al.*, 2021). Die Inhibierung einer E3 Ligase, die den Abbau des WRKY40 TFs katalysiert, kann für XopS derzeit nicht ausgeschlossen werden, ist aber eher unwahrscheinlich, da hierfür keine direkte Interaktion mit bzw. Bindung an den Transkriptionsfaktor notwendig wäre. Außerdem ist der von XopS stabilisierte WRKY40 TF weiterhin mit Ubiquitinmolekülen verbunden (Abb. 1.7), was für eine post-translationale Modifikation (PTM) seitens einer E3 Ligase spricht.

Die Ubiquitinierung von Substratproteinen und somit auch von WRKY TFs kann über E3 Ligasen aus verschiedenen Familien vermittelt werden (Chen & Hellmann, 2013). Besonders gut charakterisiert wurden z.B. multimere Komplexe aus *Ring-finger* E3 Ligasen, die sogenannte SCF (von *SKP1-like-Cullin1-F-box*) Komplexe bilden (Büttner, 2016). Sie bestehen aus dem Gerüstprotein Cullin, dessen C-Terminus mit dem RING Protein RBX1 (von *RING box 1*) assoziiert. Die N-terminale Region des Cullins ist dagegen über ein SKP1 (von *S-phase Kinase-associated Protein 1*)-ähnliches Protein mit einem Mitglied aus der F-box Proteinfamilie verbunden. F-box Proteine stellen dabei die Bindungsstellen für Substratproteine dar (Vierstra, 2009; Chen & Hellmann, 2013; Büttner, 2016). Das charakteristische, aus ca. 50 Aminosäuren bestehende, F-box Motiv innerhalb dieser F-box Proteine vermittelt wiederum deren Interaktion mit den SKP1-ähnlichen Proteinen (Schulman *et al.*, 2000). Interessanterweise kommen SCF Komplexe in ihrer Gesamtheit nur in Eukaryoten vor, wobei eine Vielzahl an nicht-eukaryotischen Pathogenen ebenfalls Gene besitzen, die für F-box Proteine kodieren (u.a. T3Es), um damit das UPS ihres Wirts für eine erfolgreiche Infektion umzusteuern (Magori & Citovsky, 2011). Es wurde beispielsweise kürzlich gezeigt, dass der Typ-III Effektor XopI aus dem afrikanischen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Stamm BAI3 ein klassisches F-box Motiv besitzt und mit seiner Funktion als F-box Protein den proteasomalen Abbau eines Thioredoxin Proteins (*OsTrxh2*) fördert. Dies führt wiederum dazu, dass die von *OsTrxh2* katalysierte Dissoziation von *OsNPR1* Oligomeren in Monomere inhibiert und somit ein erfolgreicher Aufbau von systemisch erworbener Resistenz in der Reispflanze ausbleibt (Ji *et al.*, 2020). In der Sequenz des *Xcv* T3Es XopS findet sich kein typisches F-box Motiv und aufgrund der Beobachtung, dass dieser Effektor zu einer Akkumulation seines Zielproteins führt liegt die Annahme fern, dass XopS die klassische Funktion eines F-box Proteins innehat, um damit einen proteasomalen Abbau von WRKY40 über einen SCF Komplex zu vermitteln. Allerdings wurde in einer Studie von Jia und Kollegen aus dem Jahre 2016 beschrieben, dass der pflanzenpathogene Geminivirus CLCuMuV (von *Cotton Leaf Curl Multan Virus*) das Protein β C1 dazu verwendet, um durch eine Wechselwirkung mit *NbSKP1* dessen Interaktion mit dem Cullin *NbCUL1* zu verhindern. β C1 ist somit in der Lage, die Integrität immunrelevanter SCF Komplexe zu stören, was demzufolge zu einer gesteigerten Geminiviren-Infektion von *N. benthamiana* führt (Jia *et al.*, 2016). Diese Art von Interferenz mit einem SCF Komplex könnte durchaus auch im Zusammenhang mit XopS interessant sein. So wurden in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten IP-MS Analyse z.B. ein putatives Cullin 1 Protein, sowie das Cullin-assoziierte NEDD8-dissoziierte Protein 1 als potentielle weitere *in planta* Interaktionspartner des T3Es identifiziert (Tabelle 3.1).

Da dieser Hinweis auf eine mögliche Funktion von XopS im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden konnte, müssten nun weiterführende Analysen, wie zunächst beispielsweise die Überprüfung einer direkten Interaktion zwischen den möglichen Interaktionspartnern, zur Aufklärung dieser Hypothese durchgeführt werden.

Zusammengefasst gibt es klare Hinweise darauf, dass der *Xcv* T3E XopS sein Zielprotein WRKY40 stabilisiert, indem dessen proteasomaler Abbau verhindert wird. Allerdings konnte der dahinterstehende biologische Mechanismus bisher nicht aufgedeckt werden. Somit wären künftige experimentelle Ansätze zur Aufklärung der biochemischen Funktion von XopS wichtig, um dieser Frage auf den Grund zu gehen.

Die ektopische Expression eines XopS-GFP Fusionsproteins transient in *N. benthamiana*, gefolgt von dessen Immunopräzipitation mittels *GFP-Trap*® und daran angeschlossener LC-MS/MS Analyse führte zur Identifikation einer Phosphorylierungsstelle am Serin 287 im C-terminalen Bereich der XopS Aminosäuresequenz (Abb. 3.45). Es gibt Beispiele dafür, dass verschiedene Effektorproteine durch eine Phosphorylierung von Seiten wirtseigener Proteinkinasen die Virulenz des Pathogens steigern können (Xing *et al.*, 2002; Bhattacharjee *et al.*, 2015). So konnten Xiao und Kollegen zeigen, dass die Phosphorylierung am Serin 258 des *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Effektors AvrPtoB für eine ausgeprägte Krankheitsentwicklung auf Tomatenpflanzen sorgte. Wurde diese Aminosäure hingegen durch ein Alanin ausgetauscht, konnte die Phosphorylierung nicht mehr stattfinden und die Pflanzen waren dadurch signifikant weniger anfällig (Xiao *et al.*, 2007). Auch für andere Effektoren aus *Pseudomonas syringae*, wie z.B. AvrPto, AvrB und HopQ1, sowie für die T3Es NopL und NopP aus der Bakteriengattung *Rhizobium*, wurde die Phosphorylierung beschrieben, die über eine pflanzliche Kinase katalysiert wird (Skorpil *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; Desveaux *et al.*, 2007; Yeam *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013c).

Interessanterweise konnte bisher allerdings nur für einen Nematodeneffektor, 10A07, die Kinase aus der Wirtspflanze identifiziert werden, die für seine Phosphorylierung verantwortlich ist (Hewezi *et al.*, 2015). Erst kürzlich konnte der Kinase SnRK2.8 aus Arabidopsis eine Rolle in der Phosphorylierung des *Pst* Effektors AvrPtoB zugewiesen werden, wobei darin höchstwahrscheinlich auch weitere Kinasen involviert sind (Lei *et al.*, 2020). In der mit XopS durchgeführten IP-MS Analyse konnten ebenfalls zwei pflanzliche Rezeptor-ähnliche zytoplasmatische Kinasen, PBS1-like und PBL27-like, als potentielle Interaktionspartner des T3Es identifiziert werden. So besteht die Möglichkeit, dass diese RLCKs eine Phosphorylierung von XopS vermitteln könnten. Allerdings gibt es bisher noch keinerlei experimentelle Hinweise darauf, ob die Phosphorylierung am Serin 287 relevant für die

Funktion des Effektors ist, oder welche Kinasen tatsächlich für diese PTM verantwortlich sind. Zunächst sollte die Phosphorylierung am Serin 287 durch z.B. *in vivo* oder *in vitro* Phosphorylierungs-Assays, unter Einbeziehung eines XopS(S287A) mutierten Fusionsproteins, verifiziert werden. Ein weiterer interessanter experimenteller Ansatz zur Klärung dieser Hypothese wäre beispielsweise die Überprüfung der Virulenzfunktion eines *Xcv*Δ*xopS*(*XopS*-*HA*) Stammes, dessen ektopisch exprimierendes XopS-HA Protein eine Mutation im Serin 287 besitzt. Würde diese PTM die Aktivität des Virulenzfaktors XopS positiv beeinflussen, müsste ihr Fehlen das *in planta* Bakterienwachstum, wenn verglichen mit *Xcv* WT, bei einer Infektion suszeptibler Paprikapflanzen *per Dip*-Inokulation in ähnlichem Maße wie die Infektion mit dem *Xcv*Δ*xopS* Stamm vermindern.

Falls sich daraus experimentelle Hinweise ergeben sollten, dass eine Phosphorylierung des Effektors innerhalb der Wirtszelle tatsächlich zu dessen Virulenzfunktion beiträgt, wären weitere Untersuchungen möglich, die zur Identifizierung der dafür verantwortlichen Proteinkinasen beitragen könnten. So wäre es in erster Linie notwendig, eine direkte Interaktion zwischen XopS und den in der IP-MS gefundenen RLCKs durch unabhängige Interaktionsstudien zu bestätigen. Im Falle einer direkten Interaktion müsste dann verifiziert werden, ob sie in die Vermittlung dieser PTM involviert sind oder ob andere *in planta* Interaktionspartner dabei eine Rolle spielen.

4.2. Die Rolle des WRKY40 TFs in der kompatiblen *Xcv*-Paprika Interaktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen dem Typ-III Effektorprotein XopS aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und orthologen WRKY40 TFs aus *N. benthamiana* (*NbWRKY40*), Arabidopsis (*AtWRKY40*) und Paprika (*CaWRKY40a*) über mehrere unabhängige experimentelle Ansätze bestätigt werden (Abschnitt 4.1.3).

Während die Funktion des WRKY40 TFs aus Arabidopsis gut untersucht ist, ist dies für *CaWRKY40a* nicht der Fall. Hier konnte die biologische Relevanz dieses TFs für die *Xcv* Wirtspflanze Paprika aufgedeckt werden und es konnten Hinweise darauf gefunden werden, wie die Interaktion zwischen XopS und WRKY40 zur Virulenz von *Xcv* beitragen könnte.

4.2.1. Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* fördert die Abwehr von *Xcv* in Paprika

WRKY Transkriptionsfaktoren steuern eine Vielzahl pflanzlicher Entwicklungsprozesse und nehmen daneben sowohl in abiotischen, als auch biotischen Stressantworten essentielle regulatorische Rollen ein (Pandey & Somssich, 2009). So fungieren sie als Initiatoren oder Repressoren der Abwehr-assoziierten Genexpression auf den Ebenen der PTI, ETI und auch der systemisch-erworbenen Resistenz (SAR) (Rushton *et al.*, 2010).

Dabei wird zunehmend klarer, dass WRKY TFs in größeren Interaktionsnetzwerken zusammengeschlossen sind, worin jedes einzelne WRKY Protein einen additiven, kooperativen oder auch antagonistischen Beitrag zur gesamten transkriptionellen Aktivität eines gegebenen Transkriptionsfaktorkomplexes leistet (Chi *et al.*, 2013). So wurde beispielsweise in *Arabidopsis* gezeigt, dass die drei der Untergruppe IIa angehörigen WRKY TFs *AtWRKY18*, *AtWRKY40* und *AtWRKY60* mit sich selbst und auch untereinander über Leucin-Zipper Motive innerhalb ihrer aminoterminalen Regionen interagieren (Xu *et al.*, 2006).

In der Modellpflanze nehmen die genannten TFs eine additive und teils redundante Funktion als Negativregulatoren in der Abwehr gegen das hemibiotrophe Pathogen *Pst* DC3000 ein. Während weder die *wrky40* noch die *wrky18* Einzelmutante eine gesteigerte Resistenz gegen *Pst* DC3000 aufweist, konnten sich Bakterien in einer *wrky40 wrky18* Doppelmutante signifikant schlechter vermehren. Die Resistenz gegen *Pst* wurde durch die zusätzliche Ausschaltung des *AtWRKY60* Gens in der Dreifachmutante *wrky40 wrky18 wrky60* noch weiter verstärkt (Xu *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu waren transgene *Arabidopsis*linien, die die Transkriptionsfaktoren *WRKY40* und *WRKY18* unter der Kontrolle eines CaMV35S Promotors konstitutiv überexprimierten, signifikant suszeptibler als der Wildtyp, was sich in einem ca. zehnfach stärkeren Bakterienwachstum widerspiegelte (Xu *et al.*, 2006). Die redundante negativregulatorische Wirkung von *AtWRKY40* und *AtWRKY18* wurde auch im Zusammenhang mit der Abwehr gegen den pathogenen Pilz *Golovinomyces orontii*, dem Erreger des Mehltaus, beobachtet (Shen *et al.*, 2007).

Allerdings gibt es auch Studien die suggerieren, dass z.B. eine Überexpression von *AtWRKY18* die Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* erhöht, bzw. das Fehlen dieses TFs zu einer ausgeprägteren Krankheitssymptomentwicklung führt (Chen & Chen, 2002; Wang *et al.*, 2006). Auch der WRKY40 TF wird nicht immer mit der Rolle als Negativregulator der pflanzlichen Immunantwort in Verbindung gebracht.

So gibt es Studien zu einem Arabidopsis Orthologen WRKY40 aus Paprika (*Capsicum annuum*) und der Kichererbse (*Cicer arietinum L.*), die eine erhöhte WRKY40-abhängige Resistenz gegen jeweils *Ralstonia solanacearum* bzw. *Fusarium oxysporum* postulierten (Dang *et al.*, 2013; Chakraborty *et al.*, 2019). Der von Dang und Kollegen untersuchte *CaWRKY40* (Ca00g87690) TF unterscheidet sich, wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben, in seiner Aminosäuresequenz von dem im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten *CaWRKY40a* (Ca03g32070). Dementsprechend kann von der beschriebenen positivregulatorischen Wirkung von *CaWRKY40* auf die Abwehr gegen *Ralstonia solanacearum* nicht automatisch auf eine ähnliche Funktion des *CaWRKY40a* TFs in der Abwehr phytopathogener Mikroben in Paprika geschlossen werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in suszeptiblen Paprika Pflanzen, ähnlich wie der *wrky40 wrky18 knock-out* in Arabidopsis, das Bakterienwachstum von *Xcv* nach Infektion im Vergleich zu *CaWRKY40a* exprimierenden Kontrollpflanzen mehr als zehnfach stärker hemmte (Abb. 3.22). Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von *CaWRKY40a* zu einer erhöhten apoplastischen Abwehrantwort gegen dieses hemibiotrophe Phytopathogen führt, womit es naheliegend ist, dass es sich bei *CaWRKY40a* um einen Negativregulator der pflanzlichen Immunantwort handelt.

Die Tatsache, dass die Genstilllegung von *CaWRKY40a* allein einen erheblicheren Effekt auf die Resistenz gegen *Xcv* hat als sein Ortholog aus Arabidopsis, deutet darauf hin, dass dieser TF in Paprika eine zentralere negativregulatorische Rolle einnimmt. Ob oder wie *CaWRKY40a* allerdings eine funktionelle Wechselwirkung mit anderen WRKY Transkriptionsfaktoren eingeht, ist derzeit nicht bekannt. Kürzlich wurden Daten einer Transkriptomanalyse aus *Xcv* infizierten Paprika Pflanzen publiziert, woraus hervorging, dass insgesamt 46 WRKY TFs im Vergleich zu Kontrollpflanzen differentiell exprimiert waren (Gao *et al.*, 2021). Dies spricht sicherlich dafür, dass neben *CaWRKY40a* weitere WRKY Proteine in die Regulation der kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion verwickelt sind. Eine Protein-Protein Interaktionsstudie in Hefe zeigte eine Interaktion zwischen *NbWRKY40* und *NtWRKY31* (Raffener *et al.*, 2021). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte IP-MS Analyse konnte zudem den *NtWRKY42* TF als möglichen *in planta* Interaktionspartner von *NbWRKY40* identifizieren (Tab. 3.2).

Aufgrund dieser Hinweise ist es naheliegend, dass der orthologe *CaWRKY40a* TF auch in Paprika in ein übergeordnetes WRKY Regulationsnetzwerk eingebettet ist. Durch eine *BLAST*-Analyse der Aminosäuresequenzen beider möglichen *NbWRKY40* Interaktionspartner konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden.

Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen sowohl *NtWRKY31* (62.24%), als auch *NtWRKY42* (81.24%) zu dem TF *WRKY6* aus Paprika. Dem Paprika *WRKY6* orthologen Protein aus *Arabidopsis* wurde bereits im Jahre 2002 eine duale Rolle in der Regulation der Blattseneszenz sowie der Pathogenabwehr zugeschrieben, wobei postuliert wurde, dass er sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Expression bestimmter Gene wirken kann (Robatzek & Somssich, 2002). An dieser Stelle sollte die mögliche Interaktion zwischen *CaWRKY40a* und *CaWRKY6* über experimentelle Ansätze wie beispielsweise BiFC, *in planta* und *in vitro* Ko-IPs überprüft werden. Im Falle einer tatsächlichen *in planta* Interaktion zwischen den beiden TFs wären weiterführende Analysen notwendig um festzustellen, ob deren Wechselwirkung die negativregulatorische Wirkung von *CaWRKY40a* während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion beeinflusst. So könnte man beispielsweise versuchen, die Expression beider TFs über eine Virus-induzierte Genstilllegung zu unterdrücken, um eine mögliche Potenzierung des *CaWRKY40a* Effektes auf die Suszeptibilität von Paprika ermitteln zu können. Obwohl *CaWRKY40a* ein zentraler Faktor in der Negativregulation pflanzlicher Immunantworten gegen *Xcv* zu sein scheint, ist es dennoch naheliegend, dass auch andere WRKY TFs überlappende Funktionen einnehmen. Diese Annahme basiert auf einer Studie von Oh und Kollegen in der postuliert wurde, dass der WRKY TF *CaWRKY1* in der Chili-Paprika (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang) ein Negativregulator der Abwehr gegen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (eine andere Bezeichnung für *Xcv*) *race 1* ist. Analog zu den hier präsentierten Ergebnissen des *CaWRKY40a* VIGS Versuchs konnten die Autoren dieser Studie zeigen, dass die Herunterregulierung von *CaWRKY1* eine Ausbreitung des Pathogens im infizierten Blattgewebe eindämmt (Oh *et al.*, 2008).

4.2.2. WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assozierten Genexpression

Die Erkenntnis, dass *CaWRKY40a* die Suszeptibilität von Paprika gegenüber einer Infektion mit *Xcv* steigert, legt nahe, dass dieses Protein als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Expression Abwehr-assoziierter Gene inhibiert. In *Arabidopsis* wurde das gesteigerte Bakterienwachstum in *wrky18 wrky40 wrky60* Dreifachmutanten beispielsweise von einem hohen Expressionslevel des Pathogen-induzierten und SA-abhängigen Gens *PR1* begleitet (Xu *et al.*, 2006).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen der hier vorliegenden Studie die Expression Abwehr-assoziierter Gene in *Xcv* infizierten VIGS *CaWRKY40a* Paprika Pflanzen analysiert.

Aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt dieses Experiments keine *CaWRKY40a* Zielgene bekannt waren, wurden für die Genexpressionsanalyse in der Literatur beschriebene WRKY TF Zielgene ausgewählt. So sind *JAZ8* und das bereits genannte *PRI* der Negativregulation über die WRKY18 und WRKY40 TFs in *Arabidopsis* unterworfen (Pandey *et al.*, 2010; Birkenbihl *et al.*, 2017a), während die untersuchte Expression von *CaCDPK15* und *CaPR4* ebenfalls über WRKY TFs in Paprika reguliert wird (Huh *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016). Das reduzierte Bakterienwachstum von *Xcv* in *CaWRKY40a* herunterregulierten Paprika Pflanzen korrelierte mit einer signifikant erhöhten Expression der untersuchten Abwehr-assoziierten Gene (Abb. 3.29), was die Annahme untermauert, dass es sich bei *CaWRKY40a* um einen Negativregulator der Genexpression handelt. Die Genexpressionsanalyse von *CaCDPK15* konnte auch hier ein weiteres Mal den funktionellen Unterschied zwischen dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *CaWRKY40a* und dem von Dang und Kollegen untersuchten *CaWRKY40* TF verdeutlichen. So zeigten Shen und Kollegen im Jahre 2016, dass *CaWRKY40* die *CaCDPK15* Genexpression verstärkt (Shen *et al.*, 2016) und somit einen gegenläufigen Effekt zu der *CaWRKY40a*-abhängigen Inhibierung dieses Gens erzielt. Die *CaWRKY40a*-vermittelte Drosselung der Abwehr-assoziierten Genexpression in Antwort auf eine Infektion mit dem Phytopathogen *Xcv* lässt zwar stark vermuten, dass dieser TF eine direkte Repressorfunktion inne hat, wobei aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Effekte auch auf die Aktivität anderer WRKY Proteine oder Transkriptionsfaktoren aus anderen Familien zurückzuführen sind.

Weitere Indizien für eine Repressoraktivität des *CaWRKY40a* TFs und seines Orthologen *NbWRKY40* lieferte ein Transaktivierungs-Assay in Hefe. Während die Fusion des *NbWRKY8* TFs, der die Induktion Abwehr-assoziierten Gene bekanntermaßen fördert (Ishihama *et al.*, 2011), eine Transaktivierung zweier Reportergene (*HIS3* und *LacZ*) einleitete, wurde diese sowohl von *NbWRKY40* als auch *CaWRKY40a* verhindert (Abb. 3.26). Allerdings kann man anhand dieses experimentellen Ansatzes noch nicht auf eine tatsächliche Repressorfunktion des TFs schließen. Dieses Ergebnis lässt lediglich den Schluss zu, dass WRKY40 im Gegensatz zu WRKY8 keine aktivierende Funktion in der Regulation der Genexpression besitzt. Einen eindeutigeren Hinweis darauf, dass WRKY40 die Genexpression reprimiert, konnte mittels Durchführung eines *in planta* GUS Aktivitätstests erlangt werden. So zeigte die Ko-Expression eines *NbWRKY40*-HA Fusionsproteins und eines *GUS* Reportergenkonstrukts die *NbWRKY40*-HA-vermittelte Suppression der Reportergenexpression bis unter dessen basales Expressionslevel (Abb. 3.28).

Das *GUS* Reportergen war dabei unter die Kontrolle eines minimalen CaMV35S Promotors gestellt worden, welchem vier W-box Elemente vorangeschaltet worden waren. So kann weiter davon ausgegangen werden, dass die Repressoraktivität von *NbWRKY40* durch seine Bindung an diese W-box Elemente vermittelt wird.

Im Verlauf dieser Studie konnten also unterschiedliche experimentelle Ansätze dazu beitragen, den Beleg für eine negativregulatorische Wirkungsweise des WRKY40 TFs auf pflanzliche Immunantworten zu liefern.

Trotzdem wurde die Expression von *CaWRKY40a* sowohl in Antwort auf das Abwehr-assoziierte Signalmolekül SA, als auch während einer Infektion mit *Xcv* signifikant hochreguliert. Dabei erscheint es für den Aufbau einer effektiven Immunantwort in Antwort auf Stressstimuli kontraintuitiv, die Expression eines Negativregulators der Abwehr-assoziierten Genexpression anzuschalten. Eine ähnliche Hochregulierung des WRKY40 TFs aus der Weinrebe (*Vitis vinifera*), welcher ebenfalls als Negativregulator der Immunantwort beschrieben worden war, wurde in Antwort auf eine Infektion mit dem pathogenen Oomyceten *Plasmopara viticola* beobachtet (Ma *et al.*, 2021). Auch für den Arabidopsis WRKY40 TF wurde ein ähnliches Expressionsmuster bei Infektion mit dem Pilz *Golovinomyces orontii* beschrieben (Pandey *et al.*, 2010). Dabei sollte ein gewisses Augenmerk auf die Zeitkinetik der *WRKY40* Genexpression gelegt werden. Zeitkursexperimente zeigten, dass die Expression von *CaWRKY40a* in Antwort auf einen SA Stimulus binnen weniger Stunden stark anstieg, bis sie vier Stunden nach SA Behandlung ihr höchstes Expressionslevel erreichte (Abb. 3.20).

Auch die Infektion mit *Xcv* führte bereits zehn Stunden später zu einem ca. 150-fachen Anstieg der *CaWRKY40a* Transkriptmenge, was mit den Versuchen von Pandey und Kollegen korrelierte, in denen ein maximaler Anstieg des *AtWRKY40* Levels acht Stunden nach Infektion mit *Golovinomyces orontii* gemessen wurde (Pandey *et al.*, 2010). Eine naheliegende Erklärung für die beobachteten Expressionsmuster wurde von Pandey und Kollegen vorgeschlagen. So ist davon auszugehen, dass diese Art der transkriptionellen Regulation eine gewisse Dynamik gewährleistet, durch die frühe PTI Antworten zwar rasch aktiviert werden, anschließend aber auch wieder unterdrückt werden können. Damit würde eine unnötige, in die Länge gezogene Ressourcenverteilung zugunsten von Immunantworten vermieden werden (Pandey *et al.*, 2010).

Die Identifikation von *in vivo* Zielgenen (*Targets*) eines Transkriptionsfaktors ist wichtig, um besser verstehen zu können, wie und in welchem Maße die Immunantwort einer Wirtspflanze während einer Infektion in dessen Abhängigkeit moduliert wird (Pandey *et al.*, 2010).

Eine kürzlich durchgeführte genomweite Chromatin-Immunopräzipitationsanalyse (ChIP-Seq, von *Chromatin Immunoprecipitation DNA-Sequencing*) konnte beispielsweise über 1400 *in vivo Targets* des Arabidopsis WRKY40 TFs identifizieren und damit zudem zeigen, dass dieser TF mit einer klaren Präferenz an Genloci bindet, die in die frühe PTI Wahrnehmung und die Signalweiterleitung involviert sind (Birkenbihl *et al.*, 2017a). Einen solchen genomübergreifenden Ansatz gibt es für den WRKY40a TF aus Paprika bisher nicht und grundsätzlich wurden bisher keine Versuche unternommen, *in vivo* Zielgene dieses TFs zu identifizieren. Die erworbenen Erkenntnisse zu seinem Orthologen aus Arabidopsis lassen aber vermuten, dass auch *CaWRKY40a* eine Vielzahl an Genen reguliert.

Dies würde sich ebenfalls mit den Erkenntnissen aus den *CaWRKY40a* VIGS Versuchen decken, wo das Fehlen dieses TFs weitreichende Folgen für die Abwehr-assoziierte Genexpression hatte (Abb. 3.29), die wiederum in eine erhöhte Resistenz gegen *Xcv* resultierten (Abb. 3.22).

Im Rahmen dieser Studie konnten die Gene *CaJAZ8* und *CaPR4* als *bona fide CaWRKY40a* Zielgene identifiziert werden. Die Grundlage dafür, diese beiden Gene auf eine mögliche Regulation seitens *CaWRKY40a* zu überprüfen, lieferte die Genexpressionsanalyse nach Infektion mit *Xcv* in VIGS *CaWRKY40a* Pflanzen. Diese zeigte, dass sowohl *CaJAZ8* als auch *CaPR4* in Abwesenheit des TFs stärker exprimiert sind (Abb. 3.29). Über eine elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Analyse (EMSA, von *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) wurde eine *in vitro* Bindung von *CaWRKY40a* an die W-Boxen enthaltenden Promotorfragmente von *CaJAZ8* und *CaPR4* nachgewiesen (Abb. 3.31).

Eine *CaPR4* Promotor-vermittelte Expression des *GUS* Reportergens wurde *in planta* durch die Ko-Expression eines *NbWRKY40-HA* Fusionsproteins reprimiert (Abb. 3.33), was die Annahme, dass es sich hierbei um ein WRKY40 Zielgen handelt, zusätzlich untermauert. Ein interessanter Aspekt dieses Versuchs war die Miteinbeziehung des *Xcv* T3Es XopS in die durchgeführte Analyse. So konnte gezeigt werden, dass eine Ko-Expression des Effektors und einer HA-Leervektorkontrolle, vermutlich über die Stabilisierung des endogenen WRKY40 TFs, bereits eine Repression der *pCaPR4::GUS* Expression vermittelte. Allerdings war XopS nicht in der Lage, die Expression des Reportergens zu unterdrücken, wenn zusätzlich der positive Regulator *NbWRKY8* ko-exprimiert wurde.

Diese Daten deuten einerseits auf einen Wirkantagonismus zwischen den beiden WRKY TFs hin und unterstützen andererseits wieder die Hypothese, dass XopS über den WRKY40 TF in der Lage ist, die Expression Abwehr-assoziiierter Gene zugunsten von *Xcv* zu manipulieren.

Ein analoges Experiment sollte nun folgen, um auch *CaJAZ8* als *in vivo* Zielgen von *CaWRKY40a* zu bestätigen. Aufgrund der Vielzahl an identifizierten *in vivo Targets* des Arabidopsis WRKY40 TFs (Birkenbihl *et al.*, 2017a) ist es eher unwahrscheinlich, dass *CaPR4* und *CaJAZ8* die einzigen *CaWRKY40a* Zielgene sind. Somit wäre ein genomweiter ChIP-Seq Ansatz an dieser Stelle eine Möglichkeit, um eine genauere Wirkungsweise des TFs während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion aufzuschlüsseln zu können.

Für einige WRKY Transkriptionsfaktoren wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass ihre Aktivität durch eine Phosphorylierung gesteigert werden kann. So wird beispielsweise WRKY8 in *N. benthamiana* über die MAP Kinasen WIPK und SIPK phosphoryliert, was seine DNA Bindeaktivität an entsprechende W-Box Sequenzen seiner Zielgene steigert (Ishihama *et al.*, 2011). In Arabidopsis wird der dem *NbWRKY8* am ähnlichsten kommende *AtWRKY33* TF phosphoryliert, um das in die Camalexin Produktion involvierte Gen *PAD3* (von *Phytoalexin-Deficient 3*) und das in die Ethylen-Synthese involvierte Gen *ACS2* (von *1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase 2*) zu induzieren (Mao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Eine Studie von Chakraborty und Kollegen konnte kürzlich auch zeigen, dass die Stabilität des WRKY40 TFs aus der Kichererbse während einer Pilzinfektion durch die Phosphorylierung seitens einer MAP Kinase (*CaMPK9*, *Ca* hier für *Cicer arietinum L.*) gesteigert wird (Chakraborty *et al.*, 2019). Interessanterweise konnte die im Rahmen der hier vorliegenden Studie durchgeführten IP-MS Analyse eine *in planta* Phosphorylierungsstelle am Serin 109 des *NbWRKY40* TFs identifizieren (Abb. 3.47). Allerdings ist dieses Serin unter den Orthologen WRKY40 TFs aus Arabidopsis und Paprika nicht konserviert, was durch einen Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen festgestellt werden konnte.

Zudem ergab die Suche nach potentiellen *in planta* WRKY40 Interaktionspartnern über IP-MS keine Hinweise auf mögliche Kinasen, die die Phosphorylierung des TFs katalysieren würden, wobei hier eine technische Limitierung nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterführende Analysen sollten eine tatsächliche Phosphorylierung am Serin 109 des *NbWRKY40* TFs zunächst verifizieren. Um eine technische Limitierung auszuschließen, sollte ebenfalls ein erneuter Versuch, basierend auf den bereits erhaltenen Hinweisen, zur Identifikation potentieller Phosphorylierungsstellen, bestenfalls unter Einbeziehung des *NbWRKY40* Orthologen *CaWRKY40a*, unternommen werden, um anschließend einen möglichen Einfluss dieser PTM auf die Funktion des TFs aufzudecken.

4.2.3. Der WRKY40 TF vermittelt die XopS-abhängige Manipulation der stomatären Immunantwort und beeinflusst dabei möglicherweise Phytohormon-Signalnetzwerke

Wurde die Expression von *CaWRKY40a* mittels VIGS in Paprika Pflanzen herunterreguliert, zeigten diese Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen bei einer Infektion mit *Xcv* eine beträchtliche Verminderung typischer Krankheitssymptome (Abb. 3.23). Infizierte Kontrollpflanzen entwickelten dagegen starke Chlorosen, die mit einer signifikanten Reduktion des Chlorophyllgehalts und einem Anstieg der Ionen Leckage einhergingen (Abb. 3.24). Sowohl die hier vorliegende Studie, als auch jene von Schulze und Kollegen (Schulze *et al.*, 2012) zeigten, dass die Ausbildung von Chlorosen bei einer *Xcv* Infektion von suszeptiblen Paprika Pflanzen größtenteils von der Translokation des T3Es XopS abhängig ist. Die phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen Wildtyp Paprika Pflanzen, die mit einem *XcvΔxopS* Stamm infiziert wurden und *Xcv* infizierten *CaWRKY40a* VIGS Pflanzen (Abb. 3.8 und 3.23) geben einen starken Anlass zu der Annahme, dass XopS den *CaWRKY40a* TF zur Ausübung seiner Virulenzfunktion benötigt. Die Hypothese, dass eine direkte Verbindung zwischen der Virulenzfunktion von XopS und seiner Interaktion mit dem WRKY40 TF besteht, wurde im Laufe dieser Arbeit weiter bekräftigt. So konnte gezeigt werden, dass XopS die Fähigkeit, Stomata von *N. benthamiana* Blättern in Antwort auf einen PAMP Stimulus (flg22) offen zu halten, verliert, wenn die Expression von *NbWRKY40* mittels VIGS herunterreguliert wird (Abb. 3.34). Auch hier besteht eine gewisse Ähnlichkeit zwischen XopS und der Virulenzfunktion des Phytotoxins Coronatin aus *Pseudomonas syringae*. Genetische Studien lieferten Beweise dafür, dass Transkriptionsfaktoren ANAC019, ANAC055 und ANAC072 aus der pflanzenspezifischen NAC TF Familie die COR-induzierte Wiederöffnung der Stomata vermitteln.

Dabei wird davon ausgegangen, dass durch die Aktivierung dieser NAC TFs die Expression von SA Biosynthesegenen unterdrückt und die Expression von Genen, die für das Metabolisieren von SA verantwortlich sind, aktiviert werden (Zheng *et al.*, 2012; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017). Dies führt dementsprechend zu einem Abbau des SA-Levels, was wiederum eine gedämpfte präinvasive Immunantwort zur Folge hat (Melotto *et al.*, 2017). Ein ähnliches Szenario wurde für den NAC homologen TF JA2L (von *Jasmonic Acid 2-Like*) in Tomate beschrieben (Du *et al.*, 2014).

Auch WRKY Transkriptionsfaktoren (z.B. *AtWRKY54* und *AtWRKY70*) wurden bereits Funktionen in der Regulation der Stomata-Öffnung zur Vermittlung der osmotischen Stresstoleranz zugesprochen (Li *et al.*, 2013b), sodass die Manipulation präinvasiver Immunantworten über den WRKY40 TF keineswegs abwegig ist. An dieser Stelle wären Untersuchungen der stomatären Öffnung in *CaWRKY40a* herunterregulierten Paprika Pflanzen nach Behandlung mit *Xcv* WT, *XcvΔxopS* und *XcvΔxopS/XopS-HA* Stämmen notwendig, um diese Hypothese vollends belegen zu können.

Die Ausbildung von Chlorosen, begleitet von einem verminderten Chlorophyllgehalt, wird als charakteristisches Merkmal der JA-abhängigen Immunantwort angesehen (Creelman & Mullet, 1995). In *Arabidopsis* bindet WRKY40 an Promotorregionen verschiedener JA-assoziierter Gene wie beispielsweise *AtJAZ8* (Pandey *et al.*, 2010; Birkenbihl *et al.*, 2017a). Obwohl *wrky18 wrky40* Doppelmutanten und *wrky18 wrky40 wrky60* Dreifachmutanten in *Arabidopsis* eine erhöhte Resistenz gegenüber biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen aufweisen (Xu *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2010), zeigen diese eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea*, welche wiederum mit einer geschwächten JA Antwort korreliert werden konnte (Xu *et al.*, 2006). So wurde von den Autoren dieser Studien vorgeschlagen, dass diese WRKY TFs eine redundante Funktion in der negativen Regulation SA-abhängiger Signalwege innehaben und gleichzeitig als Positivregulatoren JA-vermittelter Signalwege wirken. Neben der Bindung von WRKY40 an die Promotorregion von *AtJAZ8* konnten in Genexpressionsanalysen an *wrky18 wrky40* Doppelmutanten ebenso konstitutiv hohe Expressionslevel mehrerer Mitglieder der JAZ Proteinfamilie gemessen werden (Pandey *et al.*, 2010). Dies untermauert die Hypothese, dass die untersuchten WRKY TFs durch die Repression von Negativregulatoren der JA Antwort letztere stimulieren. In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *CaWRKY40a* an die Promotorregion des *AtJAZ8* Orthologen *CaJAZ8* in Paprika bindet (Abb. 3.31) und dass dessen Expression in *CaWRKY40a* herunterregulierten Paprika Pflanzen bei einer *Xcv* Infektion hochreguliert wird (Abb. 3.29). Dies wurde ebenfalls von dem Verlust des JA-assozierten chlorotischen Phänotyps begleitet (Abb.3.23).

Weiter korrelieren die erworbenen Daten mit einer an *Xcv* infizierten *CaWRKY40a* VIGS Pflanzen durchgeführten Quantifizierung der SA-Mengen im infizierten Blattgewebe, die bestätigte, dass *CaWRKY40a* in der Lage ist, einer infektiionsabhängigen SA-Akkumulation entgegenzuwirken (Abb. 3.25).

Demzufolge legen die hier präsentierten Daten nahe, dass *CaWRKY40a*, ähnlich wie *AtWRKY40*, einen positiven Einfluss auf JA-assoziierte Signalwege hat, indem er die Expression von mindestens einem Negativregulator (*CaJAZ8*) reprimiert. Dies würde wiederum eine indirekte Repression des antagonistisch wirkenden SA-Signalwegs erklären. Die Beobachtung, dass *Xcv* WT infizierte Paprika Pflanzen einen deutlich chlorotischeren Phänotyp aufweisen als *XcvΔxopS* infizierte Pflanzen impliziert erneut, dass XopS die Repressoraktivität von WRKY40 steigern kann.

Über die IP-MS Analyse zur Identifikation potentieller *in planta* Bindungspartner von *NbWRKY40* wurde TPR3 (von *TOPLESS-Related 3*) als ein möglicher Interaktor des TFs gefunden. Es handelt sich hierbei um ein Mitglied einer Proteinfamilie von Ko-Repressoren der Genexpression, die unterschiedlichste zelluläre Prozesse beeinflussen (Ke *et al.*, 2015). So wurde beispielsweise auch gezeigt, dass JAZ Proteine TPLs (von *TOPLESS*) und TPRs entweder direkt oder über das Adapterprotein NINJA (von *Novel Interactor of JAZ*) rekrutieren können, um die transkriptionelle Aktivität des MYC2 TFs und somit JA-responsive Gene zu unterdrücken (Pauwels *et al.*, 2010; Liu & Timko, 2021). Eine Wechselwirkung zwischen WRKY40 und TPR3 könnte gegebenenfalls die Beeinflussung von JA-Antworten durch den WRKY40 TF erklären. Allerdings müsste die direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen zunächst über unabhängige experimentelle Ansätze bestätigt werden. Sollte diese verifiziert werden können, wären weiterführende Studien notwendig, um einen dahinterstehenden funktionellen Mechanismus aufzuschlüsseln zu können. So könnte beispielsweise die Genstilllegung von *CaWRKY40a* über VIGS Aufschluss darüber geben, ob sich die Transkriptmenge von *TPR3* bei einer *Xcv* Infektion in Abhängigkeit des TFs verändert. Es wäre weiter interessant zu untersuchen, ob der T3E XopS eine mögliche Interaktion zugunsten von *Xcv* modulieren könnte. So könnte zunächst getestet werden, ob der Effektor bei einer transienten Ko-Expression mit einem TPR3 Fusionsprotein in *N. benthamiana* einen Effekt auf dessen Proteinstabilität hat.

Zusammengefasst deuten die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erworbenen Daten darauf hin, dass XopS durch die Interaktion mit seinem pflanzlichen Zielprotein WRKY40 dessen Repressorfunktion positiv beeinflusst, um auf diese Weise JA-assoziierte Antworten zu induzieren und dabei gleichzeitig SA-abhängige Immunantworten zu hemmen.

4.3. Die Deubiquitinase UBP12 als *in planta* Interaktionspartner von XopS und WRKY40

Im Gegensatz zu dem bereits gründlich untersuchten Wirkmechanismus von E3 Ligasen, wurde die Aufklärung der Rolle von Deubiquitinasen (DUBs) in pflanzlichen Prozessen erst kürzlich zu einem wichtigen Forschungszweig (Vanhaeren *et al.*, 2020).

DUBs können über ihre enzymatische Aktivität eine Ubiquitinierung von Substratproteinen auf verschiedene Weise modifizieren. So können sie z.B. in *Tandem* geschaltete lineare Wiederholungen (von *tandem-linear repeats*) von Ubiquitinmolekülen zu freiem Ubiquitin spalten, sie können Ubiquitinketten trimmen, indem sie die Spaltung der Isopeptidbindungen zwischen Ubiquitinmolekülen katalysieren und sie können eine kovalent gebundene Ubiquitinmarkierung von einem Substratprotein lösen (Callis *et al.*, 1990, 1995; Komander *et al.*, 2009).

Die Regulation der Genexpression über das UPS erfolgt größtenteils über die Kontrolle der Abundanz ihrer transkriptionellen Regulatoren. So ist es beispielsweise im Falle eines Pathogenangriffs wichtig, dass Negativregulatoren abgebaut werden, um die Transkription von Abwehrgenen gewährleisten zu können. Ein paradoxeres Beispiel ist dabei hingegen der notwendige Abbau von Transkriptionsfaktoren, die für die Aktivierung Abwehr-assoziiierter Gene verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass damit eine kontinuierliche Versorgung der Zielgenpromotoren mit frischen Aktivatoren gewährleistet wird, was eine Reinitiation der Transkription und somit eine Maximierung der Genexpression ermöglichen sollte (Kodadek *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2012b). Allerdings handelt es sich dabei um einen äußerst energieaufwendigen Prozess (Peth *et al.*, 2013; Collins & Goldberg, 2017). Skelly und Kollegen konnten im Jahre 2019 am Beispiel von NPR1, der Schlüsselkomponente in der Aktivierung von SA-abhängigen Immunantworten demonstrieren, dass für eine Feinjustierung transkriptioneller *Outputs* der Abbau dieser regulatorischen Komponente nicht zwingend notwendig ist, sondern durch eine Veränderung ihrer Ubiquitinmarkierung vermittelt werden kann (Skelly *et al.*, 2019). In dieser Studie postulierten die Autoren, dass eine anfängliche Ubiquitinierung von NPR1 über die E3 Ligase CRL3 zu einer Verstärkung der Expression von NPR1 Zielgenen führt. Erst eine Verlängerung der Ubiquitinmarkierung zu einer Langketten-Polyubiquitinmarkierung über die E4 Ligase UBE4 leitet den tatsächlichen proteasomalen Abbau von NPR1 und somit die Inaktivierung seiner Zielgene ein.

Dem gegenüber gestellt sind wiederum die DUBs UBP6/7, welche die Degradation von NPR1 durch das Trimmen von Polyubiquitinketten limitieren, um damit seine Aktivität zu fördern (Skelly *et al.*, 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels IP-MS Analyse die Deubiquitinase UBP12 (*Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase 12-like*) als häufigster möglicher *in planta* Interaktionspartner des *Xcv* T3Es XopS identifiziert (Tabelle 3.1). Dies führte zu der Überlegung, dass XopS in einer bisher nicht definierten Form die Stabilität seines bestätigten Zielproteins WRKY40 über eine Interaktion mit UBP12 vermitteln könnte.

4.3.1. UBP12 interagiert *in planta* sowohl mit XopS als auch mit dem WRKY40 TF

Ein Nachteil der IP-MS Analyse zur Identifikation von *in planta* Protein-Protein Interaktionen ist, dass es sich aufgrund von technischen Limitierungen bei gefundenen Interaktoren durchaus um Artefakte aus der Analyse handeln kann. Dementsprechend gibt diese Methode lediglich Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen, die dann durch unabhängige experimentelle Ansätze verifiziert werden müssen. Hier konnte eine Interaktion zwischen dem T3E XopS und *Nt*UBP12 mittels Ko-Immunopräzipitation der beiden in *N. benthamiana* exprimierenden Fusionsproteine bestätigt werden (Abb. 3.36). Interessanterweise zeigte ein analog dazu durchgeführtes Experiment mit *Nt*UBP12 und dem *Nb*WRKY40 TF, dass auch diese beiden Fusionsproteine *in planta* miteinander wechselwirken (Abb. 3.37). Eine unspezifische Bindung von *Nt*UBP12 an die GFP Markierung von XopS oder *Nb*WRKY40 konnte ausgeschlossen werden (Abb. 3.36), sodass davon auszugehen ist, dass es sich um spezifische Interaktionen handelt. Eine weiterführende Analyse dieser Wechselwirkungen auf Proteinebene ergab, dass die transiente Ko-Expression von *Nt*UBP12 mit XopS und/oder *Nb*WRKY40 zu einer Akkumulation der Proteinmenge des DUBs führte (Abb. 3.38). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es in der Pflanze möglicherweise zu einer Komplexbildung zwischen den drei Interaktionspartnern kommt, die die Stabilität und demzufolge möglicherweise auch die biologische Funktion der einzelnen Komponenten beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden. So könnte beispielsweise ein FRET-FLIM (von Förster-Resonanzenergietransfer - Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie, engl. *Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging*) Ansatz verfolgt werden (Hink *et al.*, 2002). Diese Technik beruht auf die Kopplung potentieller Interaktionspartner an Fluorophore mit überlappenden Emissions-bzw. Extinktionsspektren (z.B. CFP, von *Cyan Fluorescent Protein* und YFP, von *Yellow Fluorescent Protein*). Bei einer Protein-Protein Interaktion in direkter räumlicher Nähe kommt es zu einem Energietransfer vom ersten angeregten Fluoreszenzmolekül auf das zweite Fluoreszenzmolekül, was sich wiederum anhand seines Emissionsspektrums mikroskopisch detektieren lässt (Hink *et al.*, 2002).

Diese Methode ist zwar komplexer und zeitaufwändiger als die ebenso häufig verwendete BiFC Methode (Herrera *et al.*, 2013), dafür aber spezifischer, da die Detektion beider Fluoreszenzen nur dann möglich ist, wenn die Wechselwirkung stabil genug ist und die beiden Proteine sehr nahe beieinander lokalisieren (Xing *et al.*, 2016).

In einer Studie von Glöckner und Kollegen konnte auch gezeigt werden, dass sich dieser Ansatz unter Verwendung dreier Fluorophore dazu eignet, ternäre Protein-Assoziationen zu analysieren (Glöckner *et al.*, 2019). Weiter könnte die mögliche Komplexbildung über einen *in vitro* MST (von *Microscale Thermophoresis*) Ansatz untersucht werden. Diese Methode basiert auf der Bewegung von Molekülen entlang eines angelegten Temperaturgradienten. Dabei können Veränderungen an der Fluoreszenzmarkierung eines Proteins, die beispielsweise durch eine Bindung eines zweiten Proteins entstehen, detektiert werden (Wienken *et al.*, 2010). Zudem ermöglicht diese Technik nicht nur die Bestätigung einer vorliegenden Protein-Protein Interaktion, sondern auch die Bestimmung der Bindungsaffinität (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011).

Durch eine genauere Charakterisierung der XopS-WRKY40-UBP12 Interaktion könnten möglicherweise Rückschlüsse auf dessen biologische Relevanz gezogen werden.

4.3.2. UB12 beeinflusst die kompatible *Xcv*-Wirtsinteraktion

DUBs werden sowohl in Hefen und Säugern, als auch in Pflanzen in fünf Klassen unterteilt. Dabei stellt die Klasse der Ubiquitin Bindeproteine (UBPs, von *Ubiquitin Binding Proteins*), der auch das DUB UB12 angehört, die größte dieser Gruppen dar (Isono & Nagel, 2014). Den pflanzlichen DUBs UB12 und UB13 wurde bereits eine redundante Funktion in der Regulation verschiedener zelluläre Prozesse zugeschrieben. So werden sie beispielsweise vom Chaperon Protein GIGANTEA zum Photorezeptorkomplex ZEITLUPE (ZTL) rekrutiert, um dessen E3 Ligase Aktivität entgegenzuwirken und somit den circadianen Rhythmus der Pflanze zu steuern (Lee *et al.*, 2019). Weiter konnten sie mit der Feinjustierung pflanzlicher Wachstums- und Entwicklungsprozesse über die Restriktion der Proteaseaktivität von DA1, DAR1 und DAR2 in Verbindung gebracht werden und wurden ebenfalls als Positivregulatoren JA-abhängiger Signalwege beschrieben, indem sie voraussichtlich den TF MYC2 stabilisieren (Jeong *et al.*, 2017; Vanhaeren *et al.*, 2020). Ewan und Kollegen konnten im Jahre 2011 aufdecken, dass *AtUB12* und *AtUB13* in Arabidopsis und das homologe Protein *NtUB12* in *Nicotiana tabacum* eine negativregulatorische Funktion von pflanzlichen Immunantworten einnehmen (Ewan *et al.*, 2011).

Dabei wurde gezeigt, dass die Genstilllegung von *AtUBP12/AtUBP13* über RNAi (RNA-Interferenz) bei einer Infektion mit *Pst* DC3000 die Bakterienvermehrung verminderte und zu einer erhöhten Expression des SA-responsiven Gens *PR1* führte (Ewan *et al.*, 2011).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von *UBP12* während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion untersucht werden.

Dabei konnte festgestellt werden, dass durch die Genstilllegung des *UBP12* Orthologen aus Paprika (*CaUBP12*) mittels VIGS, im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Ewan und Kollegen, das *Xcv* Bakterienwachstum im infizierten Blattgewebe signifikant gefördert wurde (Abb. 3.41). Dies legt die Vermutung nahe, dass *UBP12* während einer kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion möglicherweise einen positiven Einfluss auf die pflanzliche Abwehr hat. Diese Annahme wurde durch ein unabhängiges Experiment in Tabak *roq1* Pflanzen, in denen *NbUBP12* über VIGS herunterreguliert wurde, nochmals bekräftigt (Abb. 3.42). Das Experiment in Tabak zeigte weiter, dass der Effekt von *UBP12* auf das *Xcv* Wachstum sechs Tage nach Infektion deutlich schwächer war als drei Tage nach Infektion. So kann gemutmaßt werden, dass dieses DUB vor allem in einem frühen Stadium der Infektion seine regulatorische Rolle ausübt. Aufgrund der Tatsache, dass die Wachstumsunterschiede der infizierten Bakterien zwischen *UBP12* VIGS Pflanzen und Kontrollpflanzen sehr stark voneinander abwichen, kann man weiter davon ausgehen, dass in diesem Pathosystem *UBP12* vermutlich nicht von weiteren UBPs mit redundanten Funktionen, wie z.B. *UBP13*, beeinflusst wird. Trotzdem kann dies zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. So wären beispielsweise Studien an Pflanzen, in denen die Expression von sowohl *UBP12* als auch *UBP13* herunterreguliert nötig, um diese Hypothese zu verifizieren.

4.3.3. Die Genstilllegung von *UBP12* beeinflusst die Stabilität des WRKY40 TFs

Es gibt vor allem aus dem tierischen aber auch aus dem pflanzlichen Forschungsfeld viele Beispiele dafür, dass DUBs, und somit auch UBPs, über ihren Wirkmechanismus eine Stabilisierung des jeweiligen Substratproteins herbeiführen, indem sie durch das Trimmen von K48-Polyubiquitinmarkierungen ihren proteasomalen Abbau verhindern (z.B. *vanLoosdregt et al.*, 2013; *Zhang et al.*, 2013; *Skelly et al.*, 2019).

Die transiente Expression eines *NbWRKY40*-GFP Fusionsproteins in *N. benthamiana* *UBP12* VIGS Pflanzen zeigte, dass die Proteinmengen des TFs in Abwesenheit von *UBP12* akkumulierten (Abb. 3.39). Dies spricht im Vergleich zu den eben genannten Beispielen für einen gegenteiligen Effekt auf das mögliche *UBP12* Substratprotein *WRKY40*.

Eine kürzlich publizierte Studie liefert ein Beispiel dafür, dass UBPs durchaus auch eine destabilisierende Wirkung auf Substratproteine ausüben können. So fanden Lindbäck und Kollegen, dass UBP12 und UBP13 in Arabidopsis das Pflanzenwachstum regulieren können, indem sie COP1 (von *Constitutive Photomorphogenic 1*) deubiquitinieren und stabilisieren, um damit indirekt die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau des Photorezeptors CRY2, seines zweiten Interaktors, zu vermitteln (Lindbäck *et al.*, 2021).

Eine ähnliche Regulation von WRKY40 seitens UBP12 könnte durchaus ein mögliches Szenario sein. Um diese Möglichkeit abzuwägen sind allerdings weiterführende Analysen notwendig. Eine Ko-Expression des T3Es XopS führte in dem durchgeführten Experiment zu einer noch stärkeren Akkumulation des WRKY40 TFs (Abb. 3.39). Dies deutet auf einen möglichen Wirkantagonismus zwischen XopS und UBP12 hin. So könnte es der Fall sein, dass der T3E XopS mit der möglichen destabilisierenden Funktion von UBP12 auf WRKY40 interferiert und dadurch die Stabilisierung des TFs erreicht. Dies würde auch zu der Beobachtung passen, dass eine Ko-Expression von XopS und WRKY40 zwar den proteasomalen Abbau des TFs verhindert (Abb. 1.7 und 3.16), dieser aber weiterhin mit Ubiquitinketten markiert bleibt (Abb. 1.7). Für einen Wirkantagonismus zwischen XopS und UBP12 sprechen auch die Daten aus den Bakterienwachstumsanalysen in *CaUBP12* und *NbUBP12* VIGS Pflanzen, die zeigten, dass UBP12 die Resistenz von Paprika und *N. benthamiana* Pflanzen gegenüber *Xcv* zu fördern scheint (Abb. 3.41 und Abb. 3.42). So könnte XopS die Virulenz von *Xcv* möglicherweise steigern, indem er durch die Manipulation des Positivregulators der Immunantwort UBP12 die Stabilisierung des Negativregulators WRKY40 herbeiführt. Um die Wechselwirkungen zwischen XopS, WRKY40 und UBP12 besser verstehen zu können, wäre es zunächst wichtig zu überprüfen, ob der WRKY40 TF tatsächlich der Regulation durch DUBs unterworfen ist. Aufschluss darüber könnte der Einsatz von kommerziell erhältlichen DUB Inhibitoren wie z.B. PR-619 oder NSC632839 (Aleo *et al.*, 2006; Altun *et al.*, 2011) bei einer transienten Expression von WRKY40 mit und ohne Ko-Expression von XopS geben, worüber man eventuelle DUB-abhängige Veränderungen der WRKY40 Ubiquitinierung detektieren könnte. An dieser Stelle könnte auch über eine weitere potentielle biochemische Funktion des T3Es XopS spekuliert werden. So wäre es durchaus eine Möglichkeit, dass dieser *Xcv* Effektor eine biochemische Funktion als E4 Ligase innehaben könnte, worüber eventuelle XopS-vermittelte Veränderungen des WRKY40 Ubiquitinierungsmusters bzw. der Polyubiquitin-Kettenlänge eine Stabilisierung verantworten könnten.

Bislang gibt es allerdings keinerlei experimentelle Indikationen, die eine solche Hypothese unterstützen würden. Hinweise auf Veränderungen im Ubiquitinierungsmuster von WRKY40 könnten beispielsweise Ko-Immünpräzipitationsanalysen der Interaktionspartner geben, bei denen für die angeschlossene Western Blot Analyse verschiedene Ubiquitin-Antikörper mit Spezifitäten für einzelne *Linkage*-Typen verwendet werden.

Die Aufklärung der biochemischen Funktion des *Xcv* T3Es XopS ist ein fehlendes Puzzleteil zum vollen Verständnis der Interaktion mit seinen Wirtsproteinen und sollte dementsprechend in weiterführenden Studien erforscht werden.

4.4. Ein Modell zur Darstellung der XopS-vermittelten Virulenz von *Xcv*

Zusammenfassend sollen die diskutierten Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit in einem aktuellen Modell veranschaulicht werden, das den vorgeschlagenen Virulenzmechanismus des *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Typ-III Effektors XopS erklären soll (Abb. 4.1). Aufgrund der Tatsache, dass die durchgeführten Analysen zu der Wechselwirkung von XopS und WRKY40 mit UBP12 noch keine fundierten Rückschlüsse über eine biologische Relevanz während der kompatiblen *Xcv*-Wirtsinteraktion zulassen, wurde dieser Teil der hier vorliegenden Arbeit nicht in das Modell mit einbezogen.

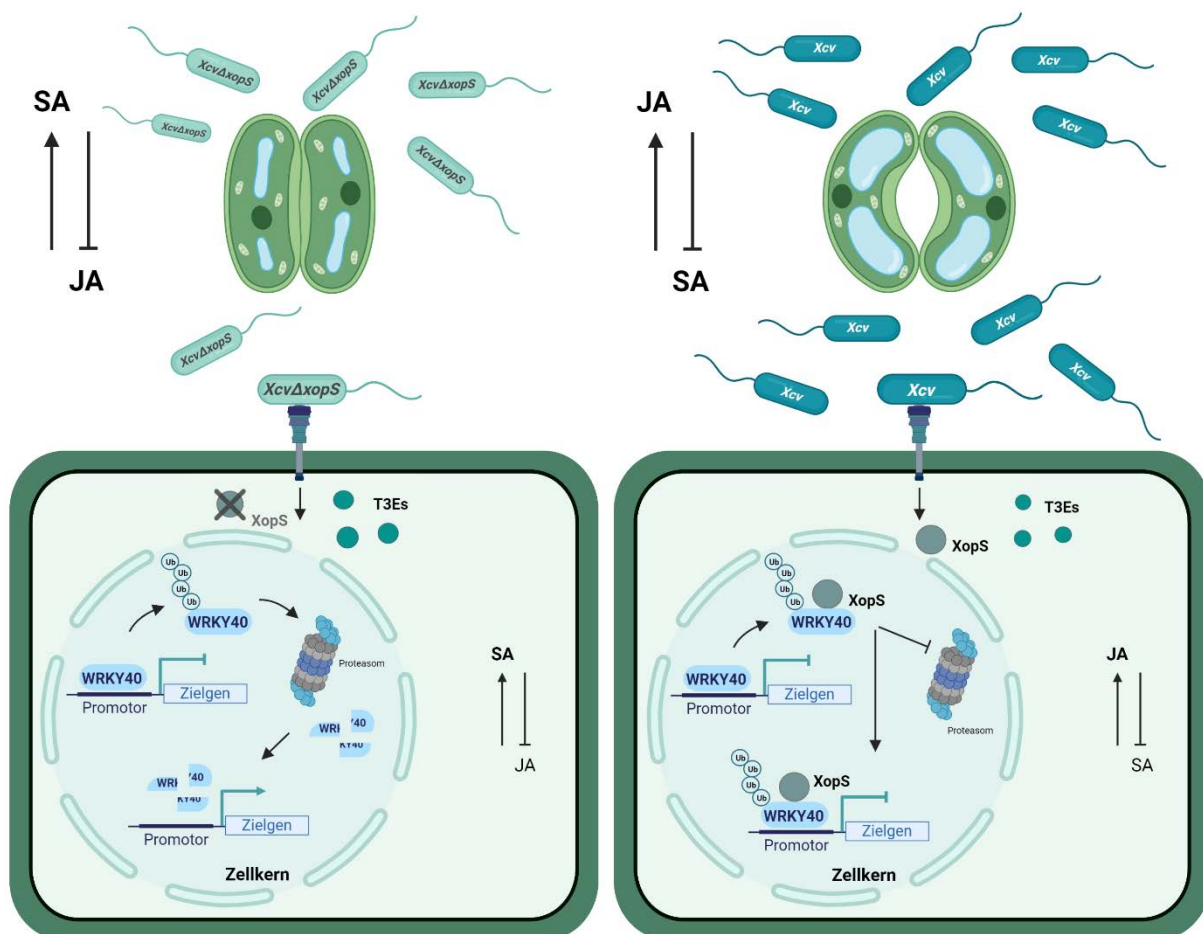


Abbildung 4.1: Arbeitsmodell zur Darstellung der XopS-vermittelten Virulenz von *Xcv*.

(A) zeigt in diesem Modell, dass bei der Infektion einer Paprika Pflanze mit einem *Xcv* 85-10 Stamm, der nicht in der Lage ist, den T3E XopS in die Pflanzenzelle einzuschleusen (*Xcv* Δ *xopS*), die Ubiquitinierung des WRKY40 TFs zu dessen Degradation über das 26S Proteasom führt. So wird wiederum die De-Repression seiner Zielgene eingeleitet, was die Induktion von SA-abhängigen Genen wie beispielsweise *PR1* ermöglicht. Gleichzeitig wird dabei der JA-abhängige Signalweg durch einen Anstieg der Genexpression seiner Negativregulatoren, wie z.B. *JAZ8*, gehemmt. Dies resultiert in einer Schließung der Stomata in Antwort auf einen PAMP Stimulus, ebenso wie in die Einleitung apoplastischer Abwehrreaktionen. Durch die Induktion sowohl präinvasiver, als auch postinvasiver Immunantworten wird somit die Ausbreitung des Pathogens limitiert. In (B) sind die Geschehnisse während einer Paprika Infektion mit einem *Xcv* 85-10 WT Stamm dargestellt. *Xcv* 85-10 WT transloziert das Typ-III Effektorprotein XopS in die Wirtszelle, was den proteasomalen Abbau des WRKY40 TFs über eine direkte, physische Interaktion verhindert. Der stabilisierte Negativregulator WRKY40 dämpft die Induktion SA-abhängiger Immunantworten und vermittelt ebenso eine verringerte Expression des Negativregulators der JA-Antwort *JAZ8*. Letzteres führt zu der Aktivierung JA-abhängiger Reaktionen, was im Umkehrschluss die Hemmung des antagonistischen SA Signalwegs zusätzlich unterstützt. Über diesen Weg ist XopS in der Lage, die Schließung der Stomata zu verhindern, um dadurch das Eindringen von *Xcv* in das Wirtsgewebe zu erleichtern.

5. Literaturverzeichnis

- Abramovitch RB, Martin GB. 2004.** Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 356–364.
- Adams EHG, Spoel SH. 2018.** The ubiquitin-proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity. *Journal of Experimental Botany* **69**: 4529–4537.
- Agarwal P, Reddy MP, Chikara J. 2011.** WRKY: Its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Molecular Biology Reports* **38**: 3883–3896.
- Aleo E, Henderson CJ, Fontanini A, Solazzo B, Brancolini C. 2006.** Identification of new compounds that trigger apoptosome-independent caspase activation and apoptosis. *Cancer Research* **66**: 9235–9244.
- Alfano JR, Collmer A. 1997.** The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology* **179**: 5655–5662.
- Altun M, Kramer HB, Willems LI, McDermott JL, Leach CA, Goldenberg SJ, Kumar KGS, Konietzny R, Fischer R, Kogan E, Mackeen MM, McGouran J, Khoronenkova SV, Parsons JL, Dianov GL, Nicholson B, Kessler BM. 2011.** Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chemistry and Biology* **18**: 1401–1412.
- Anderson JC, Pascuzzi PE, Xiao F, Sessa G, Martin GB. 2006.** Host-mediated phosphorylation of type III effector AvrPto promotes *Pseudomonas* virulence and avirulence in tomato. *Plant Cell* **18**: 502–514.
- Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S. 2006.** *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14620–14625.
- Arnaud D, Hwang I. 2015.** A sophisticated network of signaling pathways regulates stomatal defenses to bacterial pathogens. *Molecular Plant* **8**: 566–581.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. 2002.** Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977–983.
- Banfield MJ. 2015.** Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins. *Cellular Microbiology* **17**: 18–25.
- Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Börnke F. 2009.** The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **22**: 655–664.
- Bender CL, Stone HE, Sims JJ, Cooksey DA. 1987.** Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **30**: 273–283.
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN. 2011.** New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 512–518.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. 2002.** Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal* **29**: 23–32.
- Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N, Fukuda H. 2018.** Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains around the Infection Site during Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **59**: 8–16.
- Bhattacharjee S, Noor JJ, Gohain B, Gulabani H, Dnyaneshwar IK, Singla A. 2015.** Post-translational modifications in regulation of pathogen surveillance and signaling in plants: The inside-(and perturbations from) outside story. *IUBMB Life* **67**: 524–532.
- Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou JM. 2018.** Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse pattern recognition receptors to the activation of

- mitogen-activated protein kinase cascades in arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 1543–1561.
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. 2015.** Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**: 521–539.
- Birkenbihl RP, Kracher B, Somssich IE. 2017a.** Induced genome-wide binding of three arabidopsis WRKY transcription factors during early MAMP-triggered immunity. *Plant Cell* **29**: 20–38.
- Birkenbihl RP, Liu S, Somssich IE. 2017b.** Transcriptional events defining plant immune responses. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 1–9.
- Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CAM, Simon R. 2010.** Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology* **152**: 166–176.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. 1999.** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**: 1351–1362.
- Boch J, Bonas U. 2010.** Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 419–436.
- Boch J, Joardar V, Gao L, Robertson TL, Lim M, Kunkel BN. 2002.** Identification of Pseudomonas syringae pv. tomato genes induced during infection of Arabidopsis thaliana. *Molecular Microbiology* **44**: 73–88.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009.** Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bogdanove AJ, Beer S V., Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ, Van Gijsegem F. 1996.** Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* **20**: 681–683.
- Bonas U. 1994.** hrp Genes of Phytopathogenic Bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **192**: 79–98.
- Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. 1989.** Genetic and structural characterization of the avirulence gene avrBs3 from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *MGG Molecular & General Genetics* **218**: 127–136.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormac, M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J. 2010.** Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–422.
- Boureau T, Routtu J, Roine E, Taira S, Romantschuk M. 2002.** Localization of hrpA-induced Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 in infected tomato leaves. *Molecular Plant Pathology* **3**: 451–460.
- Breeden L, Nasmyth K. 1985.** Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **50**: 643–650.
- Brooks DM, Bender CL, Kunkel BN. 2005.** The Pseudomonas syringae phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant Pathology* **6**: 629–639.
- Brooks DM, Hernández-Guzmán G, Kloek AP, Alarcón-Chaidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Peñaloza-Vázquez A, Bender CL, Kunkel BN. 2004.** Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 162–174.
- Browse J. 2009.** Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 183–205.
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G. 2010.** A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9452–9457.
- Büttner D. 2016.** Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 894–937.
- Büttner D, Bonas U. 2002.** Getting across - Bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO Journal* **21**: 5313–5322.
- Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U. 2006.** Targeting of two effector protein classes to the type

- III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology* **59**: 513–527.
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U. 2002.** Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **184**: 2389–2398.
- Callis J, Carpenter T, Sun CW, Vierstra RD. 1995.** Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**: 921–939.
- Callis J, Raasch JA, Vierstra RD. 1990.** Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 12486–12493.
- Cao X. 2016.** Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **16**: 35–50.
- Chakraborty J, Ghosh P, Sen S, Nandi AK, Das S. 2019.** CaMPK9 increases the stability of CaWRKY40 transcription factor which triggers defense response in chickpea upon *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Race1 infection. *Plant Molecular Biology* **100**: 411–431.
- Chen C, Chen Z. 2000.** Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* **42**: 387–396.
- Chen C, Chen Z. 2002.** Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced arabidopsis transcription factor. *Plant Physiology* **129**: 706–716.
- Chen L, Hellmann H. 2013.** Plant E3 Ligases: Flexible Enzymes in a Sessile World. *Molecular Plant* **6**: 1388–1404.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010.** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B. 2009.** Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 493–496.
- Cheng YT, Germain H, Wiermer M, Bi D, Xu F, Garcia A V., Wirthmueller L, Després C, Parker JE, Zhang Y, Li X. 2009.** Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2503–2516.
- Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu JQ, Chen Z. 2013.** Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Molecular Plant* **6**: 287–300.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. 2006.** The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465–476.
- Chinchilla D, Boller T, Robatzek S. 2007.** Flagellin signalling in plant immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **598**: 358–371.
- Choi J, Tanaka K, Cao Y, Qi Y, Qiu J, Liang Y, Lee SY, Stacey G. 2014.** Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* **343**: 290–294.
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ. 2000.** Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology* **123**: 81–92.
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE. 2008.** Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Molecular Biology* **68**: 81–92.
- Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735–743.
- Collins GA, Goldberg AL. 2017.** The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **169**: 792–806.
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR. 2015.** Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 97–119.
- Corina Vlot A, Dempsey DA, Klessig DF. 2009.** Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat

disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.

Couto D, Zipfel C. 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* **16**: 537–552.

Creelman RA, Mullet JE. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4114–4119.

Cui H, Wang Y, Xue L, Chu J, Yan C, Fu J, Chen M, Innes RW, Zhou JM. 2010. Pseudomonas syringae Effector Protein AvrB Perturbs Arabidopsis Hormone Signaling by Activating MAP Kinase 4. *Cell Host and Microbe* **7**: 164–175.

Dagdas YF, Beihaj K, Maqbool A, Chaparro-Garcia A, Pandey P, Petre B, Tabassum N, Cruz-Mireles N, Hughes RK, Sklenar J, Win J, Menke F, Findlay K, Banfield MJ, Kamoun S, Bozkurt TO. 2016. An effector of the irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *eLife* **5**: e10856.

Dang F-F, Wang Y-N, Yu L, Eulgem T, Lai Y, Liu Z-Q, Wang X, Qiu A-L, Zhang T-X, Lin J, Chen Y-S, Guan D-Y, Cai H-Y, Mou S-L, He S-L. 2013. CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to Ralstonia solanacearum infection. *Plant, Cell & Environment* **36**: 757–774.

Darvill AG, Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 243–275.

Deblaere R, Bytebier B, de Greve H, Deboeck F, Schell J, van Montagu M, Leemans J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777–4788.

Deng WL, Preston G, Collmer A, Chang CJ, Huang HC. 1998. Characterization of the hrpC and hrpRS operons of Pseudomonas syringae pathovars syringae, tomato, and glycinea and analysis of the ability of hrpF, hrpG, hrcC, hrpT, and hrpV mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of Bacteriology* **180**: 4523–4531.

Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**: 720–723.

Deslandes L, Rivas S. 2012. Catch me if you can: Bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**: 644–655.

Desveaux D, Singer AU, Wu AJ, McNulty BC, Musselwhite L, Nimchuk Z, Sondek J, Dangl JL. 2007. Type III effector activation via nucleotide binding, phosphorylation, and host target interaction. *PLoS Pathogens* **3**: e48.

Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y. 2018. Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* **173**: 1454–1467.e15.

Doares SH, Narvâez-Vásquez J, Conconi A, Ryan CA. 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* **108**: 1741–1746.

Doherty HM, Selvendran RR, Bowles DJ. 1988. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**: 377–384.

Dombrecht B, Gang PX, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2225–2245.

Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN, Poovaiah BW. 2009. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**: 1154–1158.

Du M, Zhai Q, Deng L, Li S, Li H, Yan L, Huang Z, Wang B, Jiang H, Huang T, Li C-B, Wei J, Kang L, Li J, Li C. 2014. Closely related NAC transcription factors of tomato differentially regulate stomatal closure and reopening during pathogen attack. *Plant Cell* **26**: 3167–3184.

Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T. 2013.

- Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 8744–8749.
- Dudler R. 2014.** The role of bacterial phytotoxins in inhibiting the eukaryotic proteasome. *Trends in Microbiology* **22**: 28–35.
- Duplan V, Rivas S. 2014.** E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**: 42.
- Van Engelenburg SB, Palmer AE. 2008.** Quantification of Real-Time Salmonella Effector Type III Secretion Kinetics Reveals Differential Secretion Rates for SopE2 and SptP. *Chemistry and Biology* **15**: 619–628.
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman MA, Cooper RM. 2008.** Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry and Biology* **15**: 438–448.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**: 199–206.
- Ewan R, Pangestuti R, Thornber S, Craig A, Carr C, O'Donnell L, Zhang C, Sadanandom A. 2011.** Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity. *New Phytologist* **191**: 92–106.
- Feldman MF, Cornelis GR. 2003.** The multitasking type III chaperones: All you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiology Letters* **219**: 151–158.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999.** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* **18**: 265–276.
- Felix G, Regenass M, Boller T. 1993.** Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**: 307–316.
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou JM. 2012.** A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**: 114–118.
- Fenselau S, Bonas U. 1995.** Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 845–854.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R. 2011.** The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715.
- Feys BJB, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG. 1994.** Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751–759.
- Finley D. 2009.** Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 477–513.
- Flick JS, Johnston M. 1990.** Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 4757–4769.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. 2009.** (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**: 344–350.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X. 2012.** NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232.
- Furlan G, Trujillo M. 2017.** In vitro ubiquitination activity assays in plant immune responses. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 109–121.

- Galán JE. 2009.** Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host and Microbe* **5**: 571–579.
- Galán JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, Wagner S. 2014.** Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells. *Annual Review of Microbiology* **68**: 415–438.
- Gao X, Chen X, Lin W, Chen S, Lu D, Niu Y, Li L, Cheng C, McCormack M, Sheen J, Libo S, He P. 2013.** Bifurcation of Arabidopsis NLR Immune Signaling via Ca²⁺-Dependent Protein Kinases (S He, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**: e1003127.
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y. 2008.** MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**: 1190–1198.
- Gao S, Wang F, Niran J, Li N, Yin Y, Yu C, Jiao C, Yao M. 2021.** Transcriptome analysis reveals defenselated genes and pathways against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS ONE* **16**: e0240279.
- Gao QM, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A. 2015.** Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* **6**: 228.
- Gaudriault S, Paulin JP, Barny MA. 2002.** The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Molecular Plant Pathology* **3**: 313–320.
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R. 2011.** Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science Signaling* **4**, ra32.
- Geng X, Cheng J, Gangadharan A, Mackey D. 2012a.** The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defenseW OA. *Plant Cell* **24**: 4763–4774.
- Geng F, Wenzel S, Tansey WP. 2012b.** Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annual Review of Biochemistry* **81**: 177–201.
- Gfeller A, Dubugnon L, Liechti R, Farmer EE. 2010.** Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling* **3**: cm3.
- Ghosh P. 2004.** Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 771–795.
- Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH. 1992.** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**: 1425.
- Gill US, Lee S, Mysore KS. 2015.** Host Versus Nonhost Resistance: Distinct Wars with Similar Arsenals. *Phytopathology* **105**: 580–587.
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R. 2014.** The Bacterial Effector HopX1 Targets JAZ Transcriptional Repressors to Activate Jasmonate Signaling and Promote Infection in Arabidopsis (JL Dangl, Ed.). *PLoS Biology* **12**: e1001792.
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, García-Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V, Solano R. 2017.** JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist* **213**: 1378–1392.
- Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, Petutschnig E, Lipka V, Rathjen JP. 2009.** AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current Biology* **19**: 423–429.
- Glawischnig E. 2007.** Camalexin. *Phytochemistry* **68**: 401–406.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Glöckner N, zur Oven-Krockhaus S, Rohr L, Wackenhut F, Burmeister M, Wanke F, Holzwardt E, Meixner A, Wolf S, Harter K. 2019.** Three-fluorophore FRET enables the analysis of ternary protein association in living plant cells. *bioRxiv*: 722124.
- Göhre V, Robatzek S. 2008.** Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant

immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 189–215.

Göhre V, Spallek T, Häweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield JW, Robatzek S. 2008. Plant Pattern-Recognition Receptor FLS2 Is Directed for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase AvrPtoB. *Current Biology* **18**: 1824–1832.

Goldberg AL. 2005. Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron* **45**: 339–344.

Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 11–15.

Gómez-Gómez L, Boller T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.

Goodman RN, Novacky AJ. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. *American Phytopathological Society*.

Gottig N, Garavaglia BS, Daurelio LD, Valentine A, Gehring C, Orellano EG, Ottado J. 2008. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 18631–18636.

Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler R. 2008. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* **452**: 755–758.

Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA. 2009. *Xanthomonas campestris* overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiology* **149**: 1017–1027.

Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T. 2017. Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **22**: 779–791.

Guzel Deger A, Scherzer S, Nuhkat M, Kedzierska J, Kollist H, Brosché M, Unyayar S, Boudsocq M, Hedrich R, Roelfsema MRG. 2015. Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytologist* **208**: 162–173.

Guzman AR, Kim JG, Taylor KW, Lanver D, Mudgett MB. 2020. Tomato atypical receptor kinase1 is involved in the regulation of preinvasion defense. *Plant Physiology* **183**: 1306–1318.

Hafrén A, Macia JL, Love AJ, Milner JJ, Drucker M, Hofius D. 2017. Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: E2026–E2035.

Hatfield PM, Gosink MM, Carpenter TB, Vierstra RD. 1997. The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **11**: 213–226.

Hauck P, Thilmony R, He SY. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8577–8582.

He SY, Nomura K, Whittam TS. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1694**: 181–206.

Heath MC. 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 117–124.

Hedrich R. 2012. Ion channels in plants. *Physiological Reviews* **92**: 1777–1811.

Herrera F, Gonçalves S, Branco dos Santos J, Fleming Outeiro T. 2013. Studying the Molecular Determinants of Protein Oligomerization in Neurodegenerative Disorders by Bimolecular Fluorescence Complementation. In: *Bio-nanoimaging: Protein Misfolding and Aggregation*. Elsevier Inc.: 133–145.

Hewezi T, Juvale PS, Piya S, Maier TR, Rambani A, Rice JH, Mitchum MG, Davis EL, Hussey RS, Baum TJ. 2015. The cyst nematode effector protein 10A07 targets and recruits host posttranslational machinery to mediate its nuclear trafficking and to promote parasitism in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**: 891–907.

- Hickman R, Mendes MP, Van Verk M, Van Dijken A, Di Sora J, Denby K, Pieterse C, Van Wees S. 2019.** Transcriptional Dynamics of the Salicylic Acid Response and its Interplay with the Jasmonic Acid Pathway. *bioRxiv*: 742742.
- Hink MA, Bisseling T, Visser AJWG. 2002.** Imaging protein-protein interactions in living cells. *Plant Molecular Biology* **50**: 871–883.
- Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J. 2007.** Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology* **17**: 166–187.
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB. 2003.** Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology* **50**: 377–389.
- Huang Y, Minaker S, Roth C, Huang S, Hieter P, Lipka V, Wiermer M, Li X. 2014.** An E4 Ligase Facilitates Polyubiquitination of Plant Immune Receptor Resistance Proteins in Arabidopsis. *The Plant Cell* **26**: 485–496.
- Huh SU, Lee GJ, Jung JH, Kim Y, Kim YJ, Paek KH. 2015.** Capsicum annum transcription factor WRKYa positively regulates defense response upon TMV infection and is a substrate of CaMK1 and CaMK2. *Scientific Reports* **5**: 7981.
- Hunter T. 2007.** The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell* **28**: 730–738.
- Hurley B, Lee D, Mott A, Wilton M, Liu J, Liu YC, Angers S, Coaker G, Guttman DS, Desveaux D. 2014.** The Pseudomonas syringae Type III Effector HopF2 Suppresses Arabidopsis Stomatal Immunity (BA Vinatzer, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e114921.
- Hutchison ML, Tester MA, Gross DC. 1995.** Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: A model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 610–620.
- Ishiga Y, Uppalapati SR, Ishiga T, Bender CL. 2010.** Exogenous coronatine, but not coronafacic acid or methyl jasmonate, restores the disease phenotype of a coronatine-defective mutant of pseudomonas syringae pv. tomato on tomato seedlings. *Journal of General Plant Pathology* **76**: 188–195.
- Ishihama N, Yamada R, Yoshioka M, Katou S, Yoshioka H. 2011.** Phosphorylation of the nicotiana benthamiana WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* **23**: 1153–1170.
- Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, Yoshimura S, Inoue K, Tsuge S, Kojima C, Kawasaki T. 2014.** Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nature Communications* **5**: 1–11.
- Isono E, Nagel MK. 2014.** Deubiquitylating enzymes and their emerging role in plant biology. *Frontiers in Plant Science* **5**: 56.
- Jammes F, Yang X, Xiao S, Kwak JM. 2011.** Two arabidopsis guard cell-preferential MAPK genes, MPK9 and MPK12, function in biotic stress response. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 1875–1877.
- Jeong JS, Jung C, Seo JS, Kim JK, Chua NH. 2017.** The deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 positively regulate MYC2 levels in jasmonate responses. *Plant Cell* **29**: 1406–1424.
- Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. 2011.** Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and Drug Development Technologies* **9**: 342–353.
- Ji H, Liu D, Zhang Z, Sun J, Han B, Li Z. 2020.** A bacterial F-box effector suppresses SAR immunity through mediating the proteasomal degradation of OsTrxh2 in rice. *Plant Journal* **104**: 1054–1072.
- Jia Q, Liu N, Xie K, Dai Y, Han S, Zhao X, Qian L, Wang Y, Zhao J, Gorovits R, Cie D, Hong Y, Liu, Y. 2016.** CLCuMuB β C1 Subverts Ubiquitination by Interacting with NbSKP1s to Enhance Geminivirus Infection in Nicotiana benthamiana. *PLoS Pathogens* **12**: e1005668.
- Jiang S, Yao J, Ma KW, Zhou H, Song J, He SY, Ma W. 2013.** Bacterial Effector Activates Jasmonate Signaling by Directly Targeting JAZ Transcriptional Repressors. *PLoS Pathogens* **9**: e1003715.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004.** Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* **27**:

755–762.

Juillerat A, Bertonati C, Dubois G, Guyot V, Thomas S, Valton J, Beurdeley M, Silva GH, Daboussi F, Duchateau P. 2014. BurrH: A new modular DNA binding protein for genome engineering. *Scientific Reports* **4**: 1–6.

Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C. 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD during Plant Immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1472–1480.

Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193–195.

Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, Sheng YH, Howe GA. 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 7100–7105.

Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.

Ke J, Ma H, Gu X, Thelen A, Brunzelle JS, Li J, Xu HE, Melcher K. 2015. Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors. *Science Advances* **1**: e1500107.

Khan M, Seto D, Subramaniam R, Desveaux D. 2018. Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *Plant Journal* **93**: 651–663.

Kim JG, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G, McLane H, Martin GB, Mudgett MB. 2009. Xanthomonas T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *Plant Cell* **21**: 1305–1323.

Kim JG, Stork W, Mudgett MB. 2013. Xanthomonas type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SIERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host and Microbe* **13**: 143–154.

Kim JG, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MB. 2008. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in Xanthomonas-infected tomato leaves. *Plant Cell* **20**: 1915–1929.

Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF, Kunkel BN. 2001. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal* **26**: 509–522.

Klopotoski T, Wiater A. 1965. Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **112**: 562–566.

Klüsener B, Young JJ, Murata Y, Allen GJ, Mori IC, Hugouvieux V, Schroeder JI. 2002. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology* **130**: 2152–2163.

Kodadek T, Sikder D, Nalley K. 2006. Keeping Transcriptional Activators under Control. *Cell* **127**: 261–264.

Komander D, Clague MJ, Urbé S. 2009. Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 550–563.

Komander D, Rape M. 2012. The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry* **81**: 203–229.

Kombrink E. 2012. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* **236**: 1351–1366.

Kombrink E, Somssich IE. 1997. Pathogenesis-Related Proteins and Plant Defense. In: *Plant Relationships*. Springer Berlin Heidelberg, 107–128.

Kraft E, Stone SL, Ma L, Su N, Gao Y, Lau OS, Deng XW, Callis J. 2005. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 1597–1611.

Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI. 1998. Supramolecular structure of the salmonella typhimurium type III protein secretion system.

Science **280**: 602–605.

Kulathu Y, Komander D. 2012. Atypical ubiquitylation—the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**: 508–523.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.

Lal NK, Nagalakshmi U, Hurlburt NK, Flores R, Bak A, Sone P, Ma X, Song G, Walley J, Shan L, He P, Casteel C, Fisher AJ, Dinesh-Kumar SP. 2018. The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BIK1 Localizes to the Nucleus and Regulates Defense Hormone Expression during Plant Innate Immunity. *Cell Host and Microbe* **23**: 485–497.

de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun KH, Koszinowski J, Heuer H, Strauß A, Lahaye T. 2013. Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist* **199**: 773–786.

Lara-Tejero M, Kato J, Wagner S, Liu X, Galán JE. 2011. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**: 1188–1191.

Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van Den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169–170.

Lee CM, Li MW, Fekete A, Liu W, Saffer AM, Gendron JM. 2019. GIGANTEA recruits the UBP12 and UBP13 deubiquitylases to regulate accumulation of the ZTL photoreceptor complex. *Nature Communications* **10**: 1–10.

Lei L, Stevens DM, Coaker G. 2020. Identification of a plant kinase that phosphorylates the bacterial effector AvrPtoB. *bioRxiv*: 2020.03.21.001826.

Leong JX, Raffener M, Spinti D, Langin G, Franz-Wachtel M, Guzman AR, Kim, JG, Pandey P, Minina AE, Macek B, Hafrèn A, Bozkurt TO, Mudgett MB, Börnke F, Hofius D, Üstün S. 2021. Self-Ubiquitination of a pathogen type-III effector traps and blocks the autophagy machinery to promote disease. *bioRxiv*: 2021.03.17.435853

Lewis JD, Guttman DS, Desveaux D. 2009. The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20**: 1055–1063.

Li L, Atef A, Piatek A, Ali Z, Piatek M, Aouida M, Sharakuu A, Mahjoub A, Wang G, Khan S, Fedoroff NV, Zhu J-K, Mahfouz MM. 2013a. Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. *Molecular Plant* **6**: 1318–1330.

Li J, Besseau S, Törönen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Palva ET. 2013b. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in Arabidopsis. *New Phytologist* **200**: 457–472.

Li J, Brader G, Palva ET. 2004. The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *Plant Cell* **16**: 319–331.

Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, Chen S, Zhou J-M. 2014. The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host and Microbe* **15**: 329–338.

Li G, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S. 2012. Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **8**: 1002767.

Li W, Yadeta KA, Elmore JM, Coaker G. 2013c. The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant Physiology* **161**: 2062–2074.

Li Q, Zheng J, Li S, Huang G, Skilling SJ, Wang L, Li L, Li M, Yuan L, Liu P. 2017. Transporter-Mediated Nuclear Entry of Jasmonoyl-Isoleucine Is Essential for Jasmonate Signaling. *Molecular Plant* **10**: 695–708.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350–382.

- Lim CW, Luan S, Lee SC. 2014.** A prominent role for RCAR3-mediated ABA signaling in response to *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* infection in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1691–1703.
- Lin Y, Hu Q, Zhou J, Yin W, Yao D, Shao Y, Zhao Y, Guo B, Xia Y, Chen Q, Wang Y, Ye W, Xie Q, Tyler BM, Xing W, Wang Y. 2021.** Phytophthora sojae effector Avr1d functions as an E2 competitor and inhibits ubiquitination activity of GmPUB13 to facilitate infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**: e2018312118.
- Lindbäck LN, Artz O, Ackermann A, Pedmale UV. 2021.** Title: UBP12 and UBP13 deubiquitinases destabilize the CRY2 blue-light receptor to regulate growth. *bioRxiv*: 2021.04.29.441934.
- Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A. 2012.** *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: Last words in endless arguments. *Trends in Microbiology* **20**: 199–208.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. 1986.** Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. 'phaseolicola' controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology* **168**: 512–522.
- Lindow SE, Brandl MT. 2003.** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1875–1883.
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G. 2009.** RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biology* **7**: e1000139.
- Liu B, Jiang Y, Tang H, Tong S, Lou S, Shao C, Zhang J, Song Y, Chen N, Bi H, Zhang H, Li J, Liu J, Liu H. 2021a.** The Ubiquitin E3 Ligase SR1 Modulates the Submergence Response by Degrading Phosphorylated WRKY33 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **33**: 1771–1789.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP. 2002.** Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* **30**: 415–429.
- Liu Z, Shi L, Yang S, Qiu S, Ma X, Cai J, Guan D, Wang Z, He S. 2021b.** A conserved double-W box in the promoter of *CaWRKY40* mediates autoregulation during response to pathogen attack and heat stress in pepper. *Molecular Plant Pathology* **22**: 3–18.
- Liu L, Sonbol FM, Huot B, Gu Y, Withers J, Mwimba M, Yao J, He SY, Dong X. 2016.** Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature Communications* **7**: 1–10.
- Liu H, Timko MP. 2021.** Jasmonic acid signaling and molecular crosstalk with other phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–24.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402–408.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987.** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**: 16–20.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.
- López-Solanilla E, Bronstein PA, Schneider AR, Collmer A. 2004.** HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology* **54**: 353–365.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2004.** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938–1950.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003.** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178.
- Lozano-Durán R, Bourdais G, He SY, Robatzek S. 2014.** The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist* **202**: 259–269.

- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P. 2010.** A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 496–501.
- Ma T, Chen S, Liu J, Fu P, Wu W, Song S, Gao Y, Ye W, Lu J. 2021.** Plasmopara viticola effector PvRXLR111 stabilizes VvWRKY40 to promote virulence. *Molecular Plant Pathology* **22**: 231–242.
- Ma KW, Jiang S, Hawara E, Lee D, Pan S, Coaker G, Song J, Ma W. 2015.** Two serine residues in Pseudomonas syringae effector HopZ1a are required for acetyltransferase activity and association with the host co-factor. *New Phytologist* **208**: 1157–1168.
- Macho AP. 2016.** Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: Beyond suppression of immunity. *New Phytologist* **210**: 51–57.
- Macho AP, Boutrot F, Rathjen JP, Zipfel C. 2012.** ASPARTATE OXIDASE plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiology* **159**: 1845–1856.
- Mao K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. 2001.** Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**: 2428–2436.
- Magdalena J, Hachani A, Chamekh M, Jouihri N, Gounon P, Blocker A, Allaoui A. 2002.** Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of Shigella flexneri from needle components to Ipa proteins. *Journal of Bacteriology* **184**: 3433–3441.
- Magori S, Citovsky V. 2011.** Hijacking of the host SCF ubiquitin ligase machinery by plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* **2**: 87.
- Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012.** The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**: 716–719.
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S. 2011.** Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1639–1653.
- Matsushita A, Inoue H, Goto S, Nakayama A, Sugano S, Hayashi N, Takatsuji H. 2013.** Nuclear ubiquitin proteasome degradation affects WRKY45 function in the rice defense program. *Plant Journal* **73**: 302–313.
- Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, De Leonardis A, Guerra D, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo A. 2006.** The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics* **7**: 509–522.
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible WR, Udvardi MK, Kazan K. 2005.** Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology* **139**: 949–959.
- McGuire RG. 1991.** Epiphytic Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on Tomato Cultigens Resistant and Susceptible to Bacterial Spot. *Plant Disease* **75**: 606.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006.** Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Melotto M, Underwood W, Sheng YH. 2008.** Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 101–122.
- Melotto M, Zhang L, Oblessuc PR, He SY. 2017.** Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology* **174**: 561–571.
- Memelink J. 2009.** Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* **70**: 1560–1570.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H. 1996.** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 367–386.
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Müller A, Giraudat J, Leung J. 2007.** Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO Journal* **26**: 3216–3226.

- Mersmann S, Bourdais G, Rietz S, Robatzek S. 2010.** Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* **154**: 391–400.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW. 2003.** Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**: 809–834.
- Miao Y, Zentgraf U. 2010.** A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. *The Plant Journal* **63**: 179–188.
- Miricescu A, Goslin K, Graciet E. 2018.** Ubiquitylation in plants: Signaling hub for the integration of environmental signals. *Journal of Experimental Botany* **69**: 4511–4527.
- Mitchell RE. 1991.** Implications of toxins in the ecology and evolution of plant pathogenic microorganisms: Bacteria. *Experientia* **47**: 791–803.
- Mittal S, Davis KR. 1995.** Role of the phytotoxin coronatine in the infection of Arabidopsis thaliana by Pseudomonas syringae pv. tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 165–171.
- Moore JW, Loake GJ, Spoel SH. 2011.** Transcription dynamics in plant immunity. *Plant Cell* **23**: 2809–2820.
- Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U, Staskawicz BJ. 2000.** Molecular signals required for type III secretion and translocation of the Xanthomonas campestris AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13324–13329.
- Mukhopadhyay D, Riezman H. 2007.** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**: 201–205.
- Mülhardt C. 2009.** *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Munkvold KR, Martin GB. 2009.** Advances in experimental methods for the elucidation of Pseudomonas syringae effector function with a focus on AvrPtoB. *Molecular Plant Pathology* **10**: 777–793.
- Munkvold KR, Martin ME, Bronstein PA, Collmer A. 2008.** A Survey of the Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Type III Secretion System Effector Repertoire Reveals Several Effectors That Are Deleterious When Expressed in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* **21**: 490–502.
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**: 249–262.
- Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T, Sato Y, Ishiguro S. 2010.** Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **74**: 1315–1319.
- Narváez-Vásquez J, Ryan CA. 2004.** The cellular localization of prosystemin: A functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218**: 360–369.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG. 2004.** The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* **135**: 1113–1128.
- Newman MA, Daniels MJ, Dow JM. 1995.** Lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris induces defense-related gene expression in Brassica campestris. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 778–780.
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G. 2013.** MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–14.
- Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG. 2021.** Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110–115.

- Niepold F, Anderson D, Mills D. 1985.** Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 406–410.
- Nietzsche M, Guerra T, Alseekh S, Wiermer M, Sonnewald S, Fernie AR, Börnke F. 2018.** STOREKEEPER RELATED1/G-element binding protein (STKR1) interacts with protein kinase SnRK1. *Plant Physiology* **176**: 1773–1792.
- Nietzsche M, Schiebl I, Börnke F. 2014.** The complex becomes more complex: Protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**: 54.
- Nitta Y, Ding P, Zhang Y. 2014.** Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant Signaling and Behavior* **9**: e976155.
- Niu Y, Figueroa P, Browse J. 2011.** Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2143–2154.
- Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U. 2003.** XopC and XopJ, Two Novel Type III Effector Proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **185**: 7092–7102.
- Nomura K, DebRoy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY. 2006.** A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**: 220–223.
- Nomura K, Melotto M, He SY. 2005.** Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 361–368.
- Nothnagel E, McNeil M, Albersheim P, Dell A. 1983.** Host-Pathogen Interactions: XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiology* **71**: 916–926.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249–266.
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ. 2001.** Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant Journal* **25**: 315–323.
- Oh SK, Baek KH, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, Choi D. 2008.** Capsicum annum WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist* **177**: 977–989.
- Okada M, Ito S, Matsubara A, Iwakura I, Egoshi S, Ueda M. 2009.** Total syntheses of coronatines by exo-selective Diels-Alder reaction and their biological activities on stomatal opening. *Organic and Biomolecular Chemistry* **7**: 3065–3073.
- Özkaynak E, Finley D, Varshavsky A. 1984.** The yeast ubiquitin gene: Head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**: 663–666.
- Panchal S, Chitrakar R, Thompson BK, Obulareddy N, Roy D, Hambright WS, Melotto M. 2016a.** Regulation of stomatal defense by air relative humidity. *Plant Physiology* **172**: 2021–2032.
- Panchal S, Roy D, Chitrakar R, Price L, Breitbach ZS, Armstrong DW, Melotto M. 2016b.** Coronatine Facilitates *Pseudomonas syringae* Infection of *Arabidopsis* Leaves at Night. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–11.
- Pandey SP, Roccaro M, Schön M, Logemann E, Somssich IE. 2010.** Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **64**: 912–923.
- Pandey SP, Somssich IE. 2009.** The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* **150**: 1648–1655.
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche R Vanden, Sewell J, Gil E, García-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A. 2010.** NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788–791.
- Pauwels L, Goossens A. 2011.** The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**: 3089–3100.
- Peeters N, Carrère S, Anisimova M, Plener L, Cazalé AC, Genin S. 2013.** Répertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species

complex. *BMC Genomics* **14**: 859.

Pena-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L. 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**: 123–128.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J. 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111–1120.

Peth A, Nathan JA, Goldberg AL. 2013. The ATP costs and time required to degrade ubiquitinated proteins by the 26 S proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 29215–29222.

Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**: 948–964.

Pickart CM, Fushman D. 2004. Polyubiquitin chains: Polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**: 610–616.

Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **28**: 489–521.

Popov G, Fraiture M, Brunner F, Sessa G. 2016. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* Type III Effectors Inhibit flg22-Triggered Immunity. **29**: 651–660.

Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MT, White FF, Preston JF, Vinatzer BA, Koebnik R, Setubal JC, Norman DJ, Staskawicz BJ, Jones JB. 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* **12**: 1–23.

Price CTD, Abu Kwaik Y. 2010. Exploitation of host polyubiquitination machinery through molecular mimicry by eukaryotic-like bacterial F-box effectors. *Frontiers in Microbiology* **1**: 122.

Raffener M, Üstün S, Guerra T, Spinti D, Fitzner M, Sonnewald S, Baldermann S, Börnke F. 2021. The *Xanthomonas* type-III effector protein XopS stabilizes CaWRKY40a to regulate defense hormone responses and preinvasion immunity in pepper (*Capsicum annuum*). *bioRxiv*: 2021.03.31.437833.

Ramos, LJ, Volin R. 1987. Role of Stomatal Opening and Frequency on Infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **77**: 1311.

Ranf S, Eschen-Lippold L, Frhlich K, Westphal L, Scheel D, Lee J. 2014. Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic kinases, PBL1 and BIK1. *Annals of Botany* **14**: 1–15.

Ranf S, Gischn N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, Sánchez-Carballo PM, Zähringer U, Hückelhoven R, Lee J, Sheel D. 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* **16**: 426–433.

Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404–411.

Rieu I, Powers SJ. 2009. Real-time quantitative RT-PCR: Design, calculations, and statistics. *Plant Cell* **21**: 1031–1033.

Robatzek S, Somssich IE. 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes and Development* **16**: 1139–1149.

Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.

Ross CA, Liu Y, Shen QJ. 2007. The WRKY Gene Family in Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 827–842.

Rossier O, Van Den Ackerveken G, Bonas U. 2000. HrpB2 and hrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology* **38**: 828–838.

Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levaillant M,

- Adachi H, Yoshioka H, Yoshioka H, Raffaele S, Berthomé R, Couté Y, Parker JE, Deslandes J. 2015.** A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* **161**: 1074–1088.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. 2010.** WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247–258.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. 1996.** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO Journal* **15**: 5690–5700.
- Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys MA, Bogdanove AJ, Dow JM. 2011.** Pathogenomics of Xanthomonas: Understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 344–355.
- Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, Derbyshire P, Cevik V, Rallapalli G, Saucet SB, Wirthmueller L, Menke FLH, Sohn KH, Jones JDG. 2015.** A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* **161**: 1089–1100.
- Sawinski K, Mersmann S, Robatzek S, Böhmer M. 2013.** Guarding the green: Pathways to stomatal immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 626–632.
- Scheibner F, Marillonnet S, Büttner D. 2017.** The TAL effector AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria contains multiple export signals and can enter plant cells in the absence of the type III secretion translocon. *Frontiers in Microbiology* **8**: 2180.
- Schellenberg B, Ramel C, Dudler R. 2010.** Pseudomonas syringae virulence factor syringolin a counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1287–1293.
- Schiestl RH, Gietz RD. 1989.** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* **16**: 339–346.
- Schön M, Töller A, Diezel C, Roth C, Westphal L, Wiermer M, Somssich IE. 2013.** Analyses of wrky18 wrky40 plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for Golovinomyces orontii resistance and a loss-of resistance towards Pseudomonas syringae pv. tomato AvrRPS4. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 758–767.
- Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ERE, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP. 2000.** Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* **408**: 381–386.
- Schultink A, Qi T, Lee A, Steinbrenner AD, Staskawicz B. 2017.** Roq1 mediates recognition of the Xanthomonas and Pseudomonas effector proteins XopQ and HopQ1. *Plant Journal* **92**: 787–795.
- Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, Hause G, Krüger A, Lee J, Müller O, Scheel D, Szczesny R, Thieme F, Bonas U. 2012.** Analysis of new type III effectors from Xanthomonas uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* **195**: 894–911.
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. 2010.** Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 9444–9451.
- Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, Wilson M, Patané J, Martins J, Minsavage G V., Dahlbeck D, Akhunova A, Almeida N, Vallad GE, Barak JD, White FF, Miller SA, Ritchie D, Goss E, Bart RS, Setubal JC, Jones JB, Staskawicz BJ. 2015.** Phylogenomics of Xanthomonas field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Frontiers in Microbiology* **6**: 535.
- Schweizer F, Bodenhausen N, Lassueur S, Masclaux FG, Reymond P. 2013.** Differential contribution of transcription factors to Arabidopsis thaliana defense against Spodoptera littoralis. *Frontiers in Plant Science* **4**: 13.
- Schweizer P, Felix G, Buchala A, Muller C, Metraux J-P. 1996.** Perception of free cutin monomers by plant cells. *The Plant Journal* **10**: 331–341.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD. 2001.** Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4788–4793.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N. 2010.** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400–407.
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ülker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P. 2007.** Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**: 1098–1103.
- Shen L, Yang S, Yang T, Liang J, Cheng W, Wen J, Liu Y, Li J, Shi L, Tang Q, Shi W, Hu J, Liu C, Zhang Y, Mou S, Liu Z, Cai H, He L, Guan D, Wu Y, He S. 2016.** CaCDPK15 positively regulates pepper responses to *Ralstonia solanacearum* inoculation and forms a positive-feedback loop with CaWRKY40 to amplify defense signaling. *Scientific Reports* **6**: 1–12.
- Singer AU, Schulze S, Skarina T, Xu X, Cui H, Eschen-Lippold L, Egler M, Srikumar T, Raught B, Lee J, Scheel D, Savchenko A, Bonas U. 2013.** A Pathogen Type III Effector with a Novel E3 Ubiquitin Ligase Architecture (D Mackey, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**: e1003121.
- Skelly MJ, Furniss JJ, Grey H, Wong K-W, Spoel SH. 2019.** Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. *eLife* **8**: e47005.
- Skorpil P, Saad MM, Boukli NM, Kobayashi H, Ares-Orpel F, Broughton WJ, Deakin WJ. 2005.** NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Molecular Microbiology* **57**: 1304–1317.
- Smalle J, Vierstra RD. 2004.** The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 555–590.
- Song Y, Gao J. 2014.** Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Arabidopsis lyrata* and comparison with *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*. *Chinese Science Bulletin* **59**: 754–765.
- Spoel SH, Dong X. 2008.** Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host and Microbe* **3**: 348–351.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ. 2003.** NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760–770.
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X. 2009.** Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* **137**: 860–872.
- Stakman EC. 1915.** Relation Between Puccinia Graminis and Plants Highly Resistant to Its Attack. *Journal of Agricultural Research* **4**: 193–200.
- Stall, RE, Bartz, JA, Cook A. 1974.** Decreased Hypersensitivity to Xanthomonads in Pepper after Inoculations with Virulent Cells of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* **64**: 731.
- Staswick PE, Tiryaki I. 2004.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in *Arabidopsis* W inside box sign. *Plant Cell* **16**: 2117–2127.
- Struhl K, Davis RW. 1977.** Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerolphosphate dehydratase (his3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5255–5259.
- Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U. 2010.** Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist* **187**: 1058–1074.
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U. 2002.** Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* **46**: 13–23.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X. 2008.** Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952–956.

- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. 2003.** Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–330.
- Teper D, Burstein D, Salomon D, Gershovitz M, Pupko T, Sessa G. 2016.** Identification of novel *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector proteins by a machine-learning approach. *Molecular Plant Pathology* **17**: 398–411.
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klöggen U, Patschkowski T, Rückert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter F-J, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O. 2005.** Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* **187**: 7254–7266.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. 2007.** JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- Trujillo M, Shirasu K. 2010.** Ubiquitination in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 402–408.
- Tsuda K, Mine A, Bethke G, Igarashi D, Botanga CJ, Tsuda Y, Glazebrook J, Sato M, Katagiri F. 2013.** Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana* (H Hirt, Ed.). *PLoS Genetics* **9**: e1004015.
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F. 2009.** Network Properties of Robust Immunity in Plants (GP Copenhagen, Ed.). *PLoS Genetics* **5**: e1000772.
- Tsuda K, Somssich IE. 2015.** Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**: 932–947.
- Tucker SC, Galán JE. 2000.** Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* serovar typhimurium type III secretion-associated chaperone. *Journal of Bacteriology* **182**: 2262–2268.
- Ülker B, Somssich IE. 2004.** WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 491–498.
- Underwood W, Zhang S, He SY. 2007.** The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **52**: 658–672.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Urbanczyk-Wochniak E, Ishiga T, Mysore KS, Bender CL. 2008.** Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato seedlings: Phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 383–395.
- Üstün S, Bartetzko V, Börnke F. 2013.** The *Xanthomonas campestris* Type III Effector XopJ Targets the Host Cell Proteasome to Suppress Salicylic-Acid Mediated Plant Defence (S He, Ed.). *PLoS Pathogens* **9**: e1003427.
- Üstün S, Börnke F. 2015.** The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ proteolytically degrades proteasome subunit RPT6. *Plant Physiology* **168**: 107–119.
- Üstün S, Hafrén A, Liu Q, Marshall RS, Minina EA, Bozhkov PV, Vierstra RD, Hofius D. 2018.** Bacteria exploit autophagy for proteasome degradation and enhanced virulence in plants. *Plant Cell* **30**: 668–685.
- Üstün S, König P, Guttman DS, Börnke F. 2014.** HopZ4 from *Pseudomonas syringae*, a member of the HopZ Type III effector family from the YopJ superfamily, inhibits the proteasome in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 611–623.
- Üstün S, Sheikh A, Gimenez-Ibanez S, Jones A, Ntoukakis V, Börnke F. 2016.** The proteasome acts as a hub for plant immunity and is targeted by *pseudomonas* type III effectors. *Plant Physiology* **172**: 1941–1958.

- Vanhaeren H, Chen Y, Vermeersch M, De Milde L, De Vleeschhauwer V, Natran A, Persiau G, Eeckhout D, De Jaeger G, Gevaert K, Inzé D. 2020.** UBP12 and UBP13 negatively regulate the activity of the ubiquitin-dependent peptidases DA1, DAR1 and DAR2. *eLife* **9**: e52276.
- vanLoosdregt J, Fleskens V, Fu J, Brenkman AB, Bekker CPJ, Pals CEGM, Meerding J, Berkers CR, Barbi J, Gröne A, Sijts AJAM, Maurice MM, Kalkhoven E, Prakken BJ, Ovaas H, Pan F, Zaiss DMW, Coffier OJ. 2013.** Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases treg-cell-suppressive capacity. *Immunity* **39**: 259–271.
- Vierstra RD. 2009.** The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 385–397.
- Völksch B, Bublitz F, Fritsche W. 1989.** Coronatine production by *Pseudomonas syringae* pathovars: Screening method and capacity of product formation. *Journal of Basic Microbiology* **29**: 463–468.
- Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993.** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805–816.
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G. 2008.** A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471–481.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. 2006.** A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* **2**: 1042–1050.
- Wang J, Hu M, Wang J, Qi J, Han Z, Wang G, Qi Y, Wang HW, Zhou JM, Chai J. 2019a.** Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**: eaav5870.
- Wang Y, Li J, Hou S, Wang X, Li Y, Ren D, Chen S, Tang X, Zhou JM. 2010.** A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **22**: 2033–2044.
- Wang S, Sun J, Fan F, Tan Z, Zou Y, Lu D. 2016.** A *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* effector, XopR, associates with receptor-like cytoplasmic kinases and suppresses PAMP-triggered stomatal closure. *Science China Life Sciences* **59**: 897–905.
- Wang J, Wang J, Hu M, Wu S, Qi J, Wang G, Han Z, Qi Y, Gao N, Wang HW, et al. 2019b.** Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* **364**: eaav5868.
- Wani SH, Anand S, Balwant S, Bohra A, Joshi R. 2021.** WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports* **40**: 1071–1085.
- Wasternack C. 2007.** Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**: 681–697.
- Van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 1999.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* **41**: 537–549.
- Wen R, Newton L, Li G, Wang H, Xiao W. 2006.** *Arabidopsis thaliana* UBC13: Implication of error-free DNA damage tolerance and Lys63-linked polyubiquitylation in plants. *Plant Molecular Biology* **61**: 241–253.
- Wen R, Torres-Acosta JA, Pastushok L, Lai X, Pelzer L, Wang H, Xiao W. 2008.** *Arabidopsis* UEV1D promotes lysine-63-linked polyubiquitination and is involved in DNA damage response. *Plant Cell* **20**: 213–224.
- Wengelnik K, Bonas U. 1996.** HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **178**: 3462–3469.
- Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. 2010.** Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications* **1**: 1–7.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE. 2005.** Plant immunity: The EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 383–389.

- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman MA, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono JJ, Cullimore JV, Jehle AK, Götz F, Kulik A, Molinaro A, Lipka V, Gust AA, Nürnberger T. 2011.** Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 19824–19829.
- Wu J, Baldwin IT. 2010.** New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics* **44**: 1–24.
- Wu S, Lu D, Kabbage M, Wei HL, Swingle B, Records AR, Dickman M, He P, Shan L. 2011.** Bacterial effector HopF2 suppresses Arabidopsis innate immunity at the plasma membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 585–593.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C. 2012.** The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* **1**: 639–647.
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou J-M. 2008.** Pseudomonas syringae Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology* **18**: 74–80.
- Xiao F, Giavalisco P, Martin GB. 2007.** Pseudomonas syringae type III effector AvrPtoB is phosphorylated in plant cells on serine 258, promoting its virulence activity. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 30737–30744.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. 2005.** Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology* **137**: 176–189.
- Xing T, Ouellet T, Miki BL. 2002.** Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**: 224–230.
- Xing S, Wallmeroth N, Berendzen KW, Grefen C. 2016.** Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiology* **171**: 727–758.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z. 2006.** Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* **18**: 1310–1326.
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J. 2009.** Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* **137**: 133–145.
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. 2006.** The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10104–10109.
- Yamauchi S, Mano S, Oikawa K, Hikino K, Teshima KM, Kimori Y, Nishimura M, Shimazaki K ichiro, Takemiya A. 2019.** Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 19187–19192.
- Yang B, Sugio A, White FF. 2006.** Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10503–10508.
- Ye Y, Rape M. 2009.** Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 755–764.
- Ye Q, Wang H, Su T, Wu WH, Chen YF. 2018.** The ubiquitin E3 ligase PRU1 regulates WRKY6 degradation to modulate phosphate homeostasis in response to low-Pi stress in arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 1062–1076.
- Ye R, Yao QH, Xu ZH, Xue HW. 2004.** Development of an efficient method for the isolation of factors involved in gene transcription during rice embryo development. *Plant Journal* **38**: 348–357.
- Yeam I, Nguyen HP, Martin GB. 2010.** Phosphorylation of the Pseudomonas syringae effector AvrPto is required for FLS2/BAK1-independent virulence activity and recognition by tobacco. *Plant Journal* **61**: 16–24.

- Yu ZH, Wang JF, Stall RE, Vallejos CE. 1995.** Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye. *Genetics* **141**: 675–682.
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou JM, He SY, Xin XF. 2021.** Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* **592**: 105–109.
- Zhang Y, Callaway EM, Jones JB, Wilson M. 2009.** Visualisation of hrp gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 379–390.
- Zhang L, Chen XJ, Lu H Bin, Xie ZP, Staehelin C. 2011.** Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234: Symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 32178–32187.
- Zhang W, He SY, Assmann SM. 2008.** The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant Journal* **56**: 984–996.
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, Mengiste T, Zhang Y, Zhou J-M. 2010.** Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host and Microbe* **7**: 290–301.
- Zhang L, Zhang F, Melotto M, Yao J, He SY. 2017.** Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *Journal of Experimental Botany* **68**: 1371–1385.
- Zhang J, Zhang P, Wei Y, Piao HL, Wang W, Maddika S, Wang M, Chen D, Sun Y, Hung MC, Chen J, Ma L. 2013.** Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13. *Nature Cell Biology* **15**: 1486–1494.
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA. 2003.** Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant Journal* **36**: 485–499.
- Zheng XY, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X. 2012.** Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host and Microbe* **11**: 587–596.
- Zheng XY, Zhou M, Yoo H, Pruneda-Paz JL, Spivey NW, Kay SA, Dong X. 2015.** Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 9166–9173.
- Zhou J, Wu S, Chen X, Liu C, Sheen J, Shan L, He P. 2014.** The *Pseudomonas syringae* effector HopF2 suppresses Arabidopsis immunity by targeting BAK1. *The Plant Journal* **77**: 235–245.
- Zhou Z, Wu Y, Yang Y, Du M, Zhang X, Guo Y, Li C, Zhou JM. 2015.** An arabidopsis plasma membrane proton ATPase modulates JA signaling and is exploited by the *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB for stomatal invasion. *Plant Cell* **27**: 2032–2041.
- Zhou B, Zeng L. 2017.** Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity. *Molecular Plant Pathology* **18**: 1313–1330.
- Zipfel C. 2008.** Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **20**: 10–16.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. 2006.** Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* **125**: 749–760.
- Zuin A, Isasa M, Crosas B. 2014.** Ubiquitin Signaling: Extreme Conservation as a Source of Diversity. *Cells* **3**: 690–701.

6. Anhang

Tabelle 6.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten Klonierungs-Primer.

Primer		Sequenz	Verwendung
oMR9	Fw	5'-caccatggcttcgaaacggattc-3'	<i>AtUBC8</i> in pENTR™/D-TOPO®
oMR10	Rv	5'-ttagcccatggcatacttctg-3'	
oMR25	Fw	5'-cacccttcacaagcgagctagt-3'	<i>AtUBA1</i> in pENTR™/D-TOPO®
oMR26	Rv	5'-tcacctgaagtagatagagacgag-3'	
oMR114	Fw	5'-caccgctaacagcaatcttcctc-3'	<i>NbUBC35</i> in pENTR™/D-TOPO®
oMR115	Rv	5'-tcatgcaccactagcatatag-3'	
oMR122	Fw	5'-gatcgagggaaggatttcagtggctcttctcatcacc-3'	<i>NbBRG2</i> in pMALc2
oMR123	Rv	5'-ggtcgactctagaggatccgctatatgtaaactccatgcctatatac-3'	
oMR130	Fw	5'-gatcgagggaaggatttcagtgactctcatgactcctc-3'	<i>NtUBP12</i> in pMALc2
oMR131	Rv	5'-ggtcgactctagaggatccgtagttgtagatccgaacag-3'	
oMR136	Fw	5'- ttctgtgagtaaggttaccgtactctcatatagttgtcc-3'	<i>NbUBP12</i> in pYL156 (pTRV2)
oMR137	Rv	5'- cccatggaggcctctagagcgcaaaaaccacactatc-3'	
oMR138	Fw	5'- ttctgtgagtaaggttaccgcttaaggccaacaaaacc-3'	<i>CaUBP12</i> in pYL156 (pTRV2)
oMR139	Rv	5'- cccatggaggcctctagagatgactgtgtcactcctc-3'	
oMR146	Fw	5'-tggagaggacaggactagtgtgactctcatgactcctc-3'	<i>NtUBP12</i> in pRB-35S-HA-Strep
oMR147	Rv	5'-aaaggatccccgggtaccgtttagatccgaacaggc-3'	
oMR160	Fw	5'-ttcattggagaggacaggaatggaattacaagtttagttg-3'	<i>NbWRKY40</i> in pRB-35S-HA-Strep
oMR161	Rv	5'-atccccgggtaccgaattcattatccgtgtgattattgg-3'	
oMR164	Fw	5'-ttcattggagaggacaggaatggcagcttctcaacaac-3'	<i>NbWRKY8</i> in pRB-35S-HA-Strep
oMR165	Rv	5'-atccccgggtaccgaattcacagagcaatgtctccataaac-3'	
FB916	Fw	5'-ataattcgagctcactagtgtattgtgactaatattgtgacc-3'	<i>pWbox</i> in pRB-bar-GUS
FB917	Rv	5'-tgttgatccccgggtaccgggtcctctccaaatgaaatg-3'	
pPR4_fwd	Fw	5'-cgtcttgatcgactagtgaagggtgactggcacagc-3'	<i>pPR4</i> in pRB-bar-GUS
pPR4_rev	Rv	5'-tgttgatccccgggtaccgtacacacaactgttaacactc-3'	

Tabelle 6.2 Nukleotidsequenzen der Primer für qRT-PCR, RT-PCR und EMSA Analysen.

Zielgen		Primer Sequenzen für qRT-PCR Analysen
<i>AtUBC9</i>	Fw	5'-tggatcgtggattttgaaatggc-3'
	Rv	5'-gcaacgggtcctcgctacat-3'
<i>AtJAZ10</i>	Fw	5'-gagaagcgcaaggagagattag-3'
	Rv	5'-cttagtagtaacgtaactcc-3'
<i>AtMYC2</i>	Fw	5'-gatgaggaggtgacggatacggaa-3'
	Rv	5'-cgctttaccagctaataccgca-3'
<i>NbACTIN</i>	Fw	5'-gccaacagagagaagatgaccaga-3'
	Rv	5'-acaccatcaccagagtccaacacaat-3'
<i>NbWRKY40</i>	Fw	5'-gtggcaacatatgaaggagaaca-3'
	Rv	5'-ccccaagattactcttcccg-3'
<i>CaACTIN</i>	Fw	5'-gccaacagagagaagatgaccaga-3'
	Rv	5'-acaccatcaccagagtccaacacaat-3'
<i>CaUBI-3</i>	Fw	5'-tgtccatctgctctctgtg-3'
	Rv	5'-cacccaagcacaataagac-3'
<i>CaTUB</i>	Fw	5'-gagggtgagtgagcagttc-3'
	Rv	5'-cttcacgtcatctgctgtc-3'
<i>CaWRKY40a</i>	Fw	5'-gccgattaaccggaaaaat-3'
	Rv	5'-atgtcctcctggtgattgc-3'

<i>CaPR1</i>	Fw	5'-gccgtgaagatgtgggtcaatga-3'
	Rv	5'-tgagttacgccagactacctgagta-3'
<i>CaPR4</i>	Fw	5'-gaacacaagcaacgggtgaga-3'
	Rv	5'-ggcactgttttagcagagc-3'
<i>CaJAZ8</i>	Fw	5'-gccttatgcctcctcctt-3'
	Rv	5'-aggctctgatattggcagatg-3'
<i>CaCDPK15</i>	Fw	5'-ttttctttcggccttta-3'
	Rv	5'-aatgaactccatccagca-3'
<i>CaUBP12</i>	Fw	5'-agaaagagcaagatgagaagga-3'
	Rv	5'-tggatacggaaactacggac-3'
<i>NbUBP12</i>	Fw	5'-caagtaggtttaggtggcagaa-3'
	Rv	5'-aaggcaataggaggaaatagga-3'
		Primer Sequenzen für RT-PCR Analysen
<i>AtACTIN</i>	Fw	5'-gtgaacgattcctggacctgcctc-3'
	Rv	5'-gagaggttacatgttcaccacaac-3'
<i>XopS</i>	Fw	5'-atcttgaatgaactgacgagga-3'
	Rv	5'-gcgggtcgcatatagtcaaa-3'
Zielgen		Primer Sequenzen für EMSA Analysen
<i>CaPR4</i>	Fw	5'-agagatccaattagataaatgtccc-3'
	Rv	5'-ctgttgcttaattgaccattatg-3'
<i>CaJAZ8</i>	Fw	5'-cgtaattgcccttgacaatggtc-3'
	Rv	5'-gtagtctgtgatattgacatttc-3'

Tabelle 6.3 Vektoren für Klonierungszwecke.

Vektor	Resistenz	Verwendung	Hersteller/Referenz
pENTR™/D-TOPO®	Kan ^R	'Entry'-Vektor für Gateway®-Klonierung	Invitrogen™, Karlsruhe
pCRBlunt	Kan ^R	Klonierungsvektor	Invitrogen™, Karlsruhe
pMALc2	Amp ^R	N-terminaler MBP- <i>tag</i> ; Proteinaufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pDEST15	Amp ^R	N-terminaler GST- <i>tag</i> ; Proteinaufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pDEST17	Amp ^R	N-terminaler 6-fach-His- <i>tag</i> ; Proteinaufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pGAD424	Amp ^R	N-terminale GAL4-Aktivierungsdomäne; Beute-Plasmid, Hefe-Zwei-Hybrid System	Clontech, Mountain View, USA
pGBT9	Amp ^R	N-terminale GAL4-Bindedomäne; Köder- Plasmid, Hefe-Zwei-Hybrid System	Clontech, Mountain View, USA
pTRV1	Kan ^R	Binärer Vektor, VIGS Helfer-Plasmid	Liu <i>et al.</i> , 2002
pTRV2a	Kan ^R	Binärer Vektor, VIGS Konstrukt	Thomas Lahaye (ZMBP Tübingen); Liu <i>et al.</i> , 2002; Szczesny <i>et al.</i> , 2010

pYL279	Kan ^R	Binärer Vektor, VIGS Konstrukt	Liu <i>et al.</i> , 2002
pYL156	Kan ^R	Binärer Vektor, VIGS Konstrukt (in dieser Studie als pTRV2 bezeichnet)	Liu <i>et al.</i> , 2002
pK7FWG2	Spec ^R /Strep ^R	Binärer Vektor, C-terminaler GFP- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanze, 35S Promotor	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pGWB614	Spec ^R /Strep ^R	Binärer Vektor, C-terminaler 3-fach HA- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanze, 35S Promotor	Nakamura <i>et al.</i> , 2010
pRB-35S-HA-Strep	Spec ^R /Strep ^R / Kan ^R	Binärer Vektor, C-terminaler 3-fach HA- <i>tag</i> und Strep- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanze, 35S Promotor	Prof. Frederik Börnke
pRB-35S-GW-3xmyc	Spec ^R /Strep ^R	Binärer Vektor, C-terminaler 3-fach myc- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanze, 35S Promotor	Bartetzko <i>et al.</i> , 2009
pRB-bar-GUS	Spec ^R /Strep ^R / Basta	1800 bp <i>GUS</i> , 200 bp <i>OCS</i> in Vektor pRB-bar, minimaler 35S Promotor, Expression in Pflanze	Prof. Frederik Börnke
pAB117	Spec ^R /HygB	C-terminaler GFP- <i>tag</i> ; β -Estradiol induzierbare Expression in Pflanze, 35S Promotor, Gateway kompatibel	Dr. Andrea Bleckmann, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Tabelle 6.4 Hergestellte oder verwendete Plasmide.

Plasmid	Vektor	Resistenz	Verwendung/Hersteller
pENTR- <i>AtUBC8</i>	pENTR TM /D-TOPO®	Kan ^R	'Entry'-Vektor für Gateway®-Klonierung, ohne ATG, mit stop codon; diese Arbeit
pENTR- <i>AtUBA1</i>	pENTR TM /D-TOPO®	Kan ^R	'Entry'-Vektor für Gateway®-Klonierung, ohne ATG, mit stop codon; diese Arbeit
pENTR- <i>NbUBC35</i>	pENTR TM /D-TOPO®	Kan ^R	'Entry'-Vektor für Gateway®-Klonierung, ohne ATG, mit stop codon; diese Arbeit
His _{6x} - <i>AtUBC8</i>	pDEST17	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, diese Arbeit
His _{6x} - <i>AtUBA1</i>	pDEST17	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, diese Arbeit
His _{6x} - <i>AtUBC35</i>	pDEST17	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, diese Arbeit
MBP-XopS	pMALc2	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, Dr. Suayb Üstün
GST-XopS	pDEST15	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, Dr. Suayb Üstün

GST-XopL	pDEST15	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, Dr. Suayb Üstün
MBP-NbBRG2	pMALc2	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit
MBP-NtUBP12	pMALc2	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit
MBP-CaWRKY40a	pMALc2	Amp ^R	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i> , IPTG induzierbar, diese Arbeit; aus pCRblunt-CaWRKY40a (Dr. Tiziana Guerra)
pAD-A α WRKY40	pGAD424	Amp ^R	Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, Dr. Tiziana Guerra
pAD-CaWRKY40a	pGAD424	Amp ^R	Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, Dr. Tiziana Guerra
pBD-XopS	pGBT9	Amp ^R	Hefe-Zwei-Hybrid Analyse, Dr. Suayb Üstün
pBD-NbWRKY40	pGBT9	Amp ^R	Hefe Transaktivierungs-Assay, Dr. Suayb Üstün
pBD-CaWRKY40a	pGBT9	Amp ^R	Hefe Transaktivierungs-Assay, Dr. Suayb Üstün
pBD-NbWRKY8	pGBT9	Amp ^R	Hefe Transaktivierungs-Assay, diese Arbeit; aus pENTR-NbWRKY8 ohne ATG, mit stop codon (Dr. Suayb Üstün)
pGAL4	pRS415	Amp ^R	Hefe Transaktivierungs-Assay, Positivkontrolle
pWbox::GUS	pRB-bar-GUS	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , GUS Aktivitäts-Assay, diese Arbeit
pCaPR4::GUS	pRB-bar-GUS	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , GUS Aktivitäts-Assay, diese Arbeit
XopS-GFP	pK7FWG2	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , Dr. Suayb Üstün
XopS-HA	pGWB614	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , Dr. Suayb Üstün
XopS-myc _{3x}	pRB-35S-GW-3xmyc	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , Dr. Suayb Üstün
A α DUF851-18-myc _{3x}	pRB-35S-GW-3xmyc	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> Nietzsche <i>et al.</i> , 2014
NbWRKY40-GFP	pK7FWG2	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , Dr. Suayb Üstün
NbWRKY40-HA	pRB-35S-HA-Strep	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit
NbWRKY8-HA	pRB-35S-HA-Strep	Spec ^R / Strep ^R	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> , über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit

pTRV2-NbWRKY40	pTRV2a	Kan ^R	VIGS WRKY40 in <i>N. benthamiana</i> , Kerstin Bieler für diese Arbeit
pTRV2-CaWRKY40a	pTRV2a	Kan ^R	VIGS WRKY40a in <i>C. annuum</i> , Dr. Tiziana Guerra
pTRV2-NbUBP12	pYL156	Kan ^R	VIGS UB12 in <i>N. benthamiana</i> , über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit
pTRV2-CaUBP12	pYL156	Kan ^R	VIGS UB12 in <i>C. annuum</i> , über NEBuilder® Klonierung, diese Arbeit
pAB117-XopS-GFP	pAB117	Spec ^R / HygB	Herstellung β -Estradiol induzierbarer transgenen XopS-GFP Arabidopsis Linien, diese Arbeit; aus pENTR-XopS mit ATG, ohne stop codon (Dr. Suayb Üstün)

Tabelle 6.5 Potentielle in planta XopS-GFP Interaktionspartner

Protein	NCBI Referenzsequenz
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12 (UBP12)	XP_016507900.1
Ubc13-type ubiquitin-conjugating enzyme 2	AHA42251.1
E3 ubiquitin-protein ligase KEG	XP_019257005.1
Proteasome activator subunit 4	XP_009762109.1
Putative Cullin-1	XP_016445418.1
Cullin-associated/NEDD8-dissociated protein 1	XP_019264514.1
Importin subunit alpha-2-like	XP_009631847.1
Importin subunit beta-1	XP_019251972.1
Serine/threonine-protein kinase PBS1-like	XP_016514114.1
PBL27-like	XP_019235940.1
EDS1-like	AAL85347.1
UBP12 aus <i>C. annuum</i> (CaUBP12)	XP_016550671.1

Tabelle 6.6 Potentielle in planta NbWRKY40-GFP Interaktionspartner

Protein	NCBI Referenzsequenz
Probable WRKY transcription factor 40	XP_016479751.1
Probable WRKY transcription factor 42	XP_016445607.1
Topless-related protein 3-like isoform X1	XP_019252621.1
Proteasome subunit alpha type-6	XP_016496808.1

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der basalen pflanzlichen Immunreaktionen.	7
Abbildung 1.2: Der Aufbau des T3SS Gram-negativer Bakterien.	10
Abbildung 1.3: Die fünf Hauptsäulen der PTI als Angriffsziel phytopathogener T3Es.	11
Abbildung 1.4: Die Signalwege der Phytohormone SA und JA in der pflanzlichen Immunantwort... ..	21
Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der Ubiquitinierungskaskade.....	25
Abbildung 1.6: XopS interagiert mit <i>NbWRKY40</i> <i>in vitro</i> und <i>in planta</i>	28
Abbildung 1.7: XopS beeinflusst den proteasomalen Abbau von <i>NbWRKY40</i>	30
Abbildung 3.1: Verifizierung der XopS-GFP Expression in transgenen Arabidopsis Pflanzen.	57
Abbildung 3.2: Die ektopische Expression von XopS-GFP fördert das Bakterienwachstum des T3SS-defizienten <i>Pst</i> DC3000 $\Delta hrcC$ Stammes in Arabidopsis.	58
Abbildung 3.3: Phänotypische Merkmale der ektopischen Expression von XopS-GFP in transgenen Arabidopsis Pflanzen.....	59
Abbildung 3.4: Die ektopische Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg der Genexpression von JA-Markergenen.....	60
Abbildung 3.5: Die Expression von XopS-GFP führt zu einem Anstieg des JA-Gehalts in Arabidopsis.	61
Abbildung 3.6: XopS trägt zur Ausprägung <i>Xcv</i> -abhängiger Krankheitssymptome auf suszeptiblen Paprika Pflanzen bei.....	62
Abbildung 3.7: XopS trägt zur Virulenz von <i>Xcv</i> auf suszeptiblen Paprika Pflanzen bei.....	63
Abbildung 3.8: Ausprägung von Krankheitssymptomen während einer <i>Dip</i> -Inokulation von <i>Xcv</i> auf suszeptiblen Paprika Pflanzen.	64
Abbildung 3.9: Die transiente Expression von XopS in <i>N. benthamiana</i> hemmt den flg22-induzierten Stomataschluss.	66
Abbildung 3.10: Die ektopische Expression von XopS in transgenen Arabidopsis Pflanzen hemmt den flg22-induzierten Stomataschluss.....	67
Abbildung 3.11: XopS verhindert die Schließung von Stomata während einer kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion.	68
Abbildung 3.12: XopS unterdrückt die Genexpression Phytohormon-abhängiger Abwehrgene.....	69
Abbildung 3.13: XopS beeinflusst die Akkumulation von Phytohormonen während einer kompatiblen <i>Xcv</i> -Paprika Interaktion.....	70
Abbildung 3.14: Multipler Sequenzvergleich orthologer WRKY40 Proteine.	72
Abbildung 3.15: XopS interagiert in Hefe mit orthologen WRKY40 Proteinen aus Arabidopsis und Paprika.....	73
Abbildung 3.16: Die transiente Expression von XopS in <i>N. benthamiana</i> führt zur Akkumulation des transient exprimierenden <i>NbWRKY40</i> Proteins.	75

Abbildung 3.17: Proteinaufreinigung der notwendigen Komponenten für der *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay..... 77

Abbildung 3.18: Der etablierte *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay ist funktional..... 78

Abbildung 3.19: XopS hat unter den getesteten Bedingungen keine *in vitro* E3 Ligaseaktivität. 79

Abbildung 3.20: Die Genexpression von *CaWRKY40a* wird in Antwort auf Abwehrsignale induziert. 81

Abbildung 3.21: Verifizierung der Herunterregulierung der *CaWRKY40a* Genexpression in pTRV2-*CaWRKY40a* Paprika Pflanzen. 82

Abbildung 3.22: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika steigert die Abwehr gegenüber einer Infektion mit *Xcv*. 83

Abbildung 3.23: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika führt bei einer Infektion mit *Xcv* zu einer reduzierten Symptomausprägung. 84

Abbildung 3.24: Quantifizierung der Symptomausprägung in Paprika VIGS Pflanzen nach Infektion mit *Xcv*..... 85

Abbildung 3.25: Die Virus-induzierte Genstilllegung von *CaWRKY40a* in Paprika unterstützt die Akkumulation von SA bei einer Infektion mit *Xcv*. 86

Abbildung 3.26: Der mit XopS interagierende WRKY40 TF besitzt keine Transaktivierungs-Aktivität in Hefe. 88

Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der für den transienten *in planta* GUS-Assay verwendeten Effektor-und Reporterkonstrukte zur Untersuchung der *W-Box*-Promotor gesteuerten Reporter-genaktivität. 89

Abbildung 3.28: Die transiente Expression von *NbWRKY40* in *N.benthamiana* reprimiert die *W-Box*-Promotor gesteuerte GUS Aktivität. 90

Abbildung 3.29: WRKY40 ist ein Negativregulator der Abwehr-assoziierten Genexpression. 92

Abbildung 3.30: Schematische Darstellung der 2 kb Promotorregionen stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle angezeigter putativer *CaWRKY40a* Zielgene..... 93

Abbildung 3.31: *CaWRKY40a* bindet an *W-Boxen* in den Promotorregionen von *CaJAZ8* und *CaPR4*. 94

Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der für den transienten *in planta* GUS-Assay verwendeten Effektor-und Reporterkonstrukte zur Untersuchung der *PR4*-Promotor gesteuerten Reporter-genaktivität. 95

Abbildung 3.33: XopS und WRKY40 reprimieren die *CaPR4*-Promotor gesteuerte Reporter-genexpression. 96

Abbildung 3.34: Die XopS-abhängige Verhinderung der Schließung von Stomata in Antwort auf einen PAMP Stimulus ist abhängig von WRKY40. 98

Abbildung 3.35: Immunodetektion zur Analyse der koimmunopräzipitierten Proteine für die IP-MS Analyse..... 100

Abbildung 3.36: XopS interagiert <i>in planta</i> mit <i>NtUBP12</i>	102
Abbildung 3.37: <i>NbWRKY40</i> interagiert <i>in planta</i> mit <i>NtUBP12</i>	103
Abbildung 3.38: XopS und <i>NbWRKY40</i> führen zu einer Proteinakkumulation von <i>NtUBP12</i>	103
Abbildung 3.39: Transient in <i>N. benthamiana</i> exprimierendes <i>NbWRKY40</i> akkumuliert bei einer Virus-induzierten Genstilllegung von <i>NbUBP12</i>	105
Abbildung 3.40: Die Virus-induzierte Genstilllegung von <i>NbUBP12</i> hat keinen Einfluss auf das <i>NbWRKY40</i> Transkriptlevel.	106
Abbildung 3.41: Die Virus-induzierte Genstilllegung von <i>UBP12</i> in Paprika beeinflusst Abwehrantworten gegen <i>Xcv</i>	107
Abbildung 3.42: Die Virus-induzierte Genstilllegung von <i>UBP12</i> in <i>N. benthamiana roq1</i> beeinflusst Abwehrantworten gegen <i>Xcv</i>	108
Abbildung 3.43: Bestätigung der DUB Aktivität von <i>NtUBP12 in vitro</i>	110
Abbildung 3.44: <i>In silico</i> Analyse der XopS Aminosäuresequenz zur Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen.	111
Abbildung 3.45: Identifizierung einer <i>in planta</i> Phosphorylierungsstelle in der Aminosäuresequenz von XopS mittels LC-MS/MS.	112
Abbildung 3.46: Aminosäuresequenz von <i>NbWRKY40</i>	113
Abbildung 3.47: Identifizierung einer <i>in planta</i> Phosphorylierungsstelle in der Aminosäuresequenz von <i>NbWRKY40</i> mittels LC-MS/MS.	114
Abbildung 4.1: Arbeitsmodell zur Darstellung der XopS-vermittelten Virulenz von <i>Xcv</i>	152

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Antikörper.	32
Tabelle 2.2 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.	32
Tabelle 2.3 Mengen der Aminosäuren zur Herstellung von SCAD Selektionsmedium.	33
Tabelle 2.4 Antibiotika.	33
Tabelle 2.5 Bakterienstämme.	34
Tabelle 2.6 Hefestämme.	34
Tabelle 2.7 Reaktionsansatz zur cDNA Synthese.	43
Tabelle 2.8 Reaktionsansatz und PCR Programm für die RT-PCR Analyse.	43
Tabelle 2.9 Reaktionsansatz und PCR Programm für die zweistufige qRT-PCR Analyse.	44
Tabelle 2.10 Puffer zur Lyse der Zellpellets.	46
Tabelle 2.11 Waschpuffer für die Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine.	46
Tabelle 2.12 Elutionspuffer für die Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine.	47
Tabelle 2.13 Komposition der hergestellten SDS-PAGE Gele (Mengenangabe für 1 Gel).	49
Tabelle 3.1 Potentielle <i>in planta</i> Interaktionspartner des T3Es XopS.	100
Tabelle 3.2 Potentielle <i>in planta</i> Interaktionspartner des <i>NbWRKY40</i> TFs.	101
Tabelle 6.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten Klonierungs-Primer.	174
Tabelle 6.2 Nukleotidsequenzen der Primer für qRT-PCR, RT-PCR und EMSA Analysen.	174
Tabelle 6.3 Vektoren für Klonierungszwecke.	175
Tabelle 6.4 Hergestellte oder verwendete Plasmide.	176
Tabelle 6.5 Potentielle <i>in planta</i> XopS-GFP Interaktionspartner.	178
Tabelle 6.6 Potentielle <i>in planta</i> <i>NbWRKY40</i> -GFP Interaktionspartner.	178

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
4-MU	4-Methylumbelliferon
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. annuum</i>	<i>Capsicum annuum</i>
ca.	circa
CaMV 35S	<i>Cauliflower mosaic virus 35S promoter</i> ; [dt.] Blumenkohlmosaikvirus 35S Promotor
CFU	<i>colony forming units</i> ; [dt.] koloniebildende Einheiten
cm	Zentimeter
Col-0	Columbia-0
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>Days post inoculation/induction</i> ; [dt.] Tage nach Inokulation/Induktion
DW	<i>Dry weight</i> ; [dt.] Trockengewicht
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
evtl.	eventuell
flg22	22-Aminosäurelanges Epitop von Flagellin
FW	<i>Fresh weight</i> ; [dt.] Frischgewicht
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; [dt.] grün-fluoreszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hpi	<i>Hours post inoculation/induction</i> ; [dt.] Stunden nach Inokulation/Induktion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	<i>hypersensitive response</i> ; [dt.] hypersensitive Reaktion
IP-MS	Immunopräzipitation-Massenspektrometrie
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter

<i>M</i>	Molar
<i>mA</i>	Milliampere
<i>MBP</i>	Maltose-Bindeprotein
<i>mg</i>	Milligramm
<i>min</i>	Minute
<i>mL</i>	Milliliter
<i>mm</i>	Millimeter
<i>mM</i>	Millimolar
<i>MUG</i>	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Hydrat
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>ng</i>	Nanogramm
<i>nm</i>	Nanometer
<i>OCS</i>	Terminator der Octopinsynthase
<i>OD₆₀₀</i>	optische Dichte bei 600 nm
<i>p</i>	Promotor
<i>PAGE</i>	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; [dt.] Polyacrylamid Gelelektrophorese
<i>PCR</i>	Polymerase-Kettenreaktion
<i>pmol</i>	Picomol
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>PTI</i>	<i>Pattern-triggered immunity</i>
<i>PTM</i>	<i>Post-translational Modifikation</i>
<i>pv.</i>	Pathovar
<i>PVPP</i>	Polyvinylpyrrolidon
<i>qRT-PCR</i>	<i>quantitative real-time PCR</i>
<i>rcf</i>	<i>Relative centrifugal force</i> ; [dt.] relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>ROS</i>	<i>reactive oxygen species</i> ; [dt.] Reaktive Sauerstoffspezies
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i> ; [dt.] Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SA</i>	Salicylsäure
<i>SAR</i>	<i>systemic acquired resistance</i> ; [dt.] systemisch-erworbene Resistenz
<i>SDS</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; [dt.] Natriumdodecylsulfat
<i>sec</i>	Sekunde
<i>T3E</i>	Typ-III Effektorprotein
<i>T3SS</i>	Typ-III Sekretionssystem
<i>u.a.</i>	und andere, unter anderem
<i>Ub</i>	Ubiquitin
<i>UPS</i>	<i>Ubiquitin-proteasome-system</i>
<i>V</i>	Volt
<i>VIGS</i>	<i>virus-induced gene silencing</i> ; Virus-induzierte Genstilllegung
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>z.B.</i>	zum Beispiel

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule als der Universität Potsdam eingereicht wurde.

Potsdam, Juni 2021

Margot Raffener

9. Danksagung

Mein allergrößter Dank geht an Herrn Prof. Dr. Frederik Börnke. Danke Ricky, dass du mir vor vier Jahren dieses Projekt überlassen hast, was sehr schnell zu meinem Herzensprojekt wurde. Danke, dass du dir immer die Zeit genommen hast, um mit mir über Experimente, Ergebnisse und Wissenschaft zu diskutieren, dass du mir alle Freiheiten gelassen hast und dass du mich jederzeit in Allem unterstützt hast.

Vielen Dank an PD Dr. Marcel Wiermer und an apl. Prof. Dr. Jörg Fettke für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Börnke bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, die sich mit mir gefreut haben, wenn Experimente erfolgreich zum Abschluss gebracht wurden und die mich in Momenten der Verzweiflung versucht haben, aufzumuntern. Tausend Dank auch an Kerstin, Mandy und Susanne, die tollsten TAs der Welt, die Vieles so viel einfacher gemacht haben.

Ebenso möchte ich mich bei Suayb bedanken. Danke für deine Unterstützung, für die ganze gemeinsame Zeit auf Konferenzen und bei dir im Labor und vor allem danke, dass du während dieser Zeit immer an mich geglaubt hast, mehr als ich es oftmals tat.

Danke auch an Thomas und Katrin aus der Laimburg, die mich kennen, seit ich das allererste Mal eine Pipette in der Hand hielt. Ihr habt dazu beigetragen, dass ich das was ich heute tue so sehr liebe.

Ein weiterer großer Dank geht an meine Eltern, die mich immer darin unterstützen, meine Ziele zu verfolgen und mir all das hier ermöglicht haben.

Ich möchte mich auch bei dem Rest meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken. Danke, dass ihr, auch wenn ihr oft nicht versteht warum ich das alles so mache, wie ich es mache, es trotzdem stillschweigend akzeptiert. Danke, dass ihr es hinnehmt, wenn ich nie Zeit habe und euch trotzdem freut, wenn ich dann doch mal dabei bin. Ich weiß es sehr zu schätzen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken, die zur Fertigung dieser Arbeit beigetragen haben.