

**Funktionelle Charakterisierung der konservierten Komponenten
HrcN und HrcU des Typ III-Sekretionssystems
von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I – BIOWISSENSCHAFTEN
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von Christian Lorenz

geboren am 31.03.1981 in Wolfen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bonas
2. Prof. Dr. G. Sawers
3. Prof. Dr. R. Eichenlaub

Halle/Saale, 22.05.2009

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:

Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. and Büttner, D. (2008a) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol*, **69**, 344-360.

Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. and Büttner, D. (2008b) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog*, **4**, e1000094.

Lorenz, C. and Büttner, D. (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol.* in press

Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. Für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist ein Typ III-Sekretionssystem (T3S-System) essentiell, das sowohl die Proteinsekretion in das extrazelluläre Milieu als auch die Translokation von Effektorproteinen in die pflanzliche Wirtszelle ermöglicht. Das T3S-System wird vom *hrp*-Gencluster kodiert, welches 25 Gene umfasst, die in acht Transkriptionseinheiten organisiert sind. Elf Gene sind in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konserviert (*hrc* - „*hrp*-conserved“) und kodieren vermutlich die Kernkomponenten des Sekretionsapparates. In dieser Arbeit wurden die Hrc-Proteine HrcN und HrcU aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* funktionell charakterisiert. HrcN ist eine funktionale ATPase, die für die bakterielle Pathogenität essentiell ist. Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcN mit dem generellen T3S-Chaperon HpaB interagiert, welches die Sekretion von mehreren Effektorproteinen fördert. Da HrcN einen Komplex bestehend aus HpaB und dem Effektorprotein XopF1 unter ATP-Verbrauch dissoziiert, wurde eine Funktion von HrcN bei der Freisetzung von HpaB-gebundenen Effektorproteinen postuliert. Die Stabilität von HrcN ist abhängig von HrcL, welches mit HrcN *in vitro* und *in vivo* interagiert. HrcN und HrcL sind cytoplasmatische Proteine, die an das integrale Membranprotein HrcU binden und unter T3S-induzierenden Bedingungen an den bakteriellen Membranen lokalisieren. Das konservierte HrcU-Protein besitzt vier Transmembranhelices und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, welche proteolytisch gespalten wird. Da eine Punktmutation im Spaltstellenmotiv zu einem Funktionsverlust von HrcU führt, ist die proteolytische Spaltung vermutlich essentiell. Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit dem Kontrollprotein HpaC, welches die Sekretion von verschiedenen T3S-Substratklassen differentiell reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HrcU den Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante supprimiert. HrcU ist daher vermutlich an der HpaC-vermittelten Regulation der Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* beteiligt.

Summary

The Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato. Pathogenicity of *X. campestris* pv. *vesicatoria* depends on a type III secretion system (T3S system) that mediates protein secretion into the extracellular medium as well as translocation of effector proteins into the plant host cell. The T3S system is encoded by the *hrp* gene cluster, which comprises 25 genes that are organized into eight operons. Eleven genes are conserved among animal and plant pathogenic bacteria (*hrc*; *hrp*-conserved) and presumably encode core components of the secretion apparatus.

In this study, the Hrc proteins HrcN and HrcU from *X. campestris* pv. *vesicatoria* were functionally characterized. HrcN is a functional ATPase that is essential for bacterial pathogenicity. Protein-protein interaction studies revealed that HrcN interacts with the general T3S chaperone HpaB, which promotes the secretion of several effector proteins. HrcN dissociates a complex consisting of HpaB and the effector protein XopF1 in an ATP-dependent manner, suggesting that HrcN is required for the release of HpaB-bound effector proteins. HrcN stability is dependent on HrcL, which interacts with HrcN both *in vitro* and *in vivo*. HrcN and HrcL are cytoplasmic proteins that bind to the integral membrane protein HrcU and localize to the bacterial membranes under T3S inducing conditions.

The conserved HrcU protein consists of four membrane helices and a C-terminal cytoplasmic domain, which is proteolytically cleaved. A point mutation in the cleavage site of HrcU leads to a loss of function, suggesting that proteolytic cleavage is essential. The C-terminal domain of HrcU interacts with the control protein HpaC, which differentially regulates the secretion of different T3S substrates. It was shown that a point mutation in the C-terminal domain of HrcU suppresses the phenotype of the *hpaC* deletion mutant, suggesting that HrcU is involved in the HpaC-mediated regulation of the substrate specificity of the T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das Typ III-Sekretionssystem.....	2
1.2 Substrate des T3S-Systems pflanzenpathogener Bakterien.....	3
1.2.1 Extrazelluläre Komponenten des T3S-Systems.....	4
1.2.2 Harpine.....	4
1.2.3 Effektorproteine.....	4
1.3 T3S-Signale.....	6
1.4 T3S-Chaperone.....	7
1.5 Das Modellsystem <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	8
1.6 Das T3S-System von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	12
1.7 Funktion der im <i>hrp</i> -Gencluster kodierten Proteine.....	15
1.7.1 Konservierte Komponenten des T3S-Systems.....	15
1.7.2 Nicht-konservierte Komponenten des T3S-Systems.....	18
1.8 Zielstellung dieser Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen.....	21
2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzeninokulation.....	23
2.3 Generierung von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -Mutanten.....	24
2.3.1 Generierung von <i>hrcN</i> - und <i>hrcL</i> -Deletionsmutanten.....	24
2.3.2 Generierung von <i>hrcU</i> -Punktmutationen.....	24
2.4 Generierung von Expressionskonstrukten.....	26
2.4.1 Generierung von <i>hrcU</i> -Expressionskonstrukten.....	26
2.4.2 Generierung von <i>hrcL</i> - und <i>hrcN</i> -Expressionskonstrukten.....	27
2.4.3 Generierung von <i>hpaA</i> -Expressionskonstrukten.....	28

2.4.4 Generierung eines <i>xopF1</i> -Expressionskonstruktes.....	28
2.5 Sekretionsexperimente und Proteinanalysen.....	29
2.6 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.....	30
2.6.1 GST-„pull-down“-Analysen.....	30
2.6.2 Strep-„pull-down“-Analysen.....	31
2.6.3 Koimmunpräzipitation.....	31
2.7 Bestimmung der ATPase-Aktivität.....	32
2.8 Effektorprotein-Freisetzungsstudien.....	32
2.9 RNA-Analysen.....	33
2.10 Subzelluläre Lokalisierungsstudien.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Das T3S-Chaperon HpaB interagiert mit dem Kontrollprotein HpaA und der mutmaßlichen ATPase HrcN.....	34
3.1.1 HpaB interagiert mit dem Kontrollprotein HpaA <i>in vivo</i>	34
3.1.2 HpaB interagiert mit der mutmaßlichen ATPase HrcN.....	38
3.2 Funktionelle Charakterisierung der ATPase HrcN und des möglichen regulatorischen Proteins HrcL.....	39
3.2.1 <i>hrcN</i> ist essentiell für die Pathogenität von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	39
3.2.2 HrcN hydrolysiert ATP <i>in vitro</i>	43
3.2.3 HrcN dissoziiert einen HpaB/XopF1-Komplex.....	45
3.2.4 HrcN interagiert mit HrcL.....	48
3.2.5 HrcL trägt zur Proteinstabilität von HrcN bei.....	50
3.2.6 Die Überexpression von HrcL beeinträchtigt die bakterielle Pathogenität.....	52
3.2.7 Eine <i>hrcLhrcN</i> -Doppelmutante ist nicht pathogen.....	54
3.2.8 Die Bedeutung der protonenmotorischen Kraft für die Typ III-abhängige Sekretion.....	56
3.2.9 HrcN, HrcL und HpaB ändern unter T3S-induzierenden Bedingungen ihre subzelluläre Lokalisierung.....	57
3.2.10 HrcN und HrcL interagieren mit dem konservierten HrcU-Protein.....	58
3.3 Einfluss des HrcU-Proteins auf die Substratspezifität des T3S-Systems.....	60

3.3.1 HrcU ist für die Typ III-abhängige Sekretion von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> essentiell.....	60
3.3.2 HrcU wird proteolytisch gespalten.....	61
3.3.3 HrcU interagiert mit dem Pathogenitätsfaktor HrpB2.....	65
3.3.4 Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit dem Kontrollprotein HpaC.....	66
3.3.5 Eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HrcU supprimiert den Phänotyp der <i>hpaC</i> -Mutante.....	68
4. Diskussion.....	72
4.1 Die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA enthalten eine Bindestelle für das T3S-Chaperon HpaB.....	72
4.2 Neue Erkenntnisse zur Funktion des konservierten HrcN-Proteins.....	74
4.2.1 HrcN ist eine funktionale ATPase.....	74
4.2.2 HrcN interagiert mit dem T3S-Chaperon HpaB.....	75
4.2.3 HrcN dissoziiert einen HpaB-Effektorprotein-Komplex.....	76
4.2.4 HrcL - ein Regulator von HrcN?.....	79
4.2.5 Membranassoziiierung von HrcL und HrcN.....	80
4.2.6 Typ III-abhängige Sekretion in Abwesenheit von HrcN?.....	81
4.3 Neue Erkenntnisse zur Funktion des konservierten HrcU-Proteins.....	84
4.3.1 Die Bedeutung der proteolytischen Spaltung von HrcU.....	84
4.3.2 HrcU interagiert mit HrpB2.....	86
4.3.3 HrcU und HpaC regulieren die Substratspezifität des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	87
4.3.4 Eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HrcU supprimiert den Phänotyp der <i>hpaC</i> -Mutante.....	89
5. Literaturverzeichnis.....	92
6. Anhang.....	108
6.1 Verwendete Oligonukleotide.....	108
6.2 Aminosäuresequenzvergleich von HrcU, YscU und FlhB.....	110
6.3 Aminosäuresequenzvergleich von HpaC und HpaP.....	111

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung 1-1</u> : Struktureller Vergleich von Flagellum- und Translokations-assoziierten T3S-Systemen.....	3
<u>Abbildung 1-2</u> : <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate.....	9
<u>Abbildung 1-3</u> : Schematische Darstellung des <i>hrp</i> -Genclusters von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	12
<u>Abbildung 1-4</u> : Modell der Regulation des <i>hrp</i> -Genclusters von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	13
<u>Abbildung 1-5</u> : Modell des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	15
<u>Abbildung 3-1</u> : Die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA enthalten eine HpaB-Bindestelle.....	35
<u>Abbildung 3-2</u> : Die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA sind für die Proteinfunktion essentiell.....	37
<u>Abbildung 3-3</u> : HpaB interagiert mit HrcN.....	39
<u>Abbildung 3-4</u> : HrcN ist für die Typ III-abhängige Sekretion und die bakterielle Pathogenität essentiell.....	42
<u>Abbildung 3-5</u> : HrcN hydrolysiert ATP <i>in vitro</i>	44
<u>Abbildung 3-6</u> : HrcN dissoziiert einen HpaB/XopF1-Komplex.....	47
<u>Abbildung 3-7</u> : HrcN interagiert mit dem konservierten HrcL-Protein.....	49
<u>Abbildung 3-8</u> : HrcL trägt zur Proteinstabilität von HrcN bei.....	51
<u>Abbildung 3-9</u> : Die ektopische Expression von HrcL beeinträchtigt die bakterielle Pathogenität.....	53
<u>Abbildung 3-10</u> : Eine <i>hrcLhrcN</i> -Doppeldelensionsmutante ist nicht pathogen.....	55
<u>Abbildung 3-11</u> : Einfluss des Protonophors CCCP auf die Typ III-abhängige Sekretion und das Wachstum von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	56
<u>Abbildung 3-12</u> : HrcN, HrcL und HpaB lokalisieren unter T3S-induzierenden Bedingungen in der bakteriellen Membranfraktion.....	58
<u>Abbildung 3-13</u> : HrcN und HrcL interagieren mit dem konservierten HrcU-Protein.....	59
<u>Abbildung 3-14</u> : HrcU ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor.....	61
<u>Abbildung 3-15</u> : Die proteolytische Spaltung von HrcU ist für die Typ III-abhängige Sekretion essentiell.....	63

<u>Abbildung 3-16:</u> Ein GST-HrcU-Fusionsprotein wird proteolytisch gespalten.....	65
<u>Abbildung 3-17:</u> HrcU interagiert mit HrpB2.....	66
<u>Abbildung 3-18:</u> Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit HpaC.....	67
<u>Abbildung 3-19:</u> Die HrcU-Punktmutation Y318D supprimiert den Phänotyp der <i>hpaC</i> -Deletionsmutante.....	69
<u>Abbildung 3-20:</u> Einfluss der HrcU-Punktmutation Y318D auf die proteolytische Spaltung von HrcU und die Interaktion von HrcU ₂₅₅₋₃₅₇ mit HpaC und HrpB2.....	71
<u>Abbildung 4-1:</u> Modell der Effektorproteintranslokation in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	78
<u>Abbildung 4-2:</u> Modell des Substratspezifitätswechsels des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	89
<u>Tabelle 1-1:</u> Interaktionen von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -Stämmen mit fast-isogenen Parikakultivaren.....	10
<u>Tabelle 1-2:</u> Bekannte Effektorproteine aus <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -Stamm 85-10.....	11
<u>Tabelle 1-3:</u> Konservierte Komponenten des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	17
<u>Tabelle 1-4:</u> Nicht-konservierte Komponenten des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	20
<u>Tabelle 2-1:</u> Verwendete Bakterienstämme.....	21
<u>Tabelle 2-2:</u> Verwendete Plasmide.....	22
<u>Tabelle 2-3:</u> Generierte Expressionskonstrukte.....	26
<u>Tabelle 2-4:</u> Verwendete Primärantikörper.....	29
<u>Tabelle 4-1:</u> Charakterisierte ATPasen des T3S-Systems.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avr-</i> , Avr-	Avirulenz-
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
ECW	Early Californian Wonder; <i>Capsicum annuum</i> -Kultivar
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>hpa</i> , Hpa	<i>hrp-associated</i>
HR	hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i> , Hrc	<i>hrp-conserved</i>
<i>hrp</i> , Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PMK	protonenmotorische Kraft
pv.	Pathovar
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spp.	Spezies
TMH	Transmembranhelix
tRNA	Transfer-RNA
T3S-	Typ III-Sekretions-
WL	wässrige Läsionen
<i>xop</i> , Xop	<i>Xanthomonas outer protein</i>
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1. Einleitung

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl pathogener Organismen wie Pilzen, Insekten, Nematoden, Bakterien und Viren ausgesetzt, welche sich auf Kosten ihres Wirtes vermehren und Krankheiten auslösen. Da sich viele Pflanzen durch eine dauerhafte Nicht-Wirt-Resistenz gegenüber der Mehrzahl möglicher Pathogene auszeichnen, stellt eine erfolgreiche Infektion der Pflanze allerdings eher eine Ausnahme als die Regel dar. Eine Besiedlung der Pflanze gelingt deshalb nur spezialisierten Pathogenen, welche Infektionsstrategien entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen, die Abwehrmechanismen der Pflanze zu unterlaufen. Der Befall von Nutzpflanzen durch Pathogene führt weltweit zu erheblichen Ernteverlusten. Dabei spielen auch pflanzenpathogene Bakterien eine wichtige Rolle, welche Krankheiten wie Welke, Fäule und Nekrosen auslösen. Zu den pflanzenpathogenen Bakterien zählen sowohl Vertreter Gram-positiver Gattungen wie beispielsweise *Clavibacter* als auch Gram-negativer Gattungen wie *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xylella*, *Ralstonia* und *Xanthomonas*.

Essentiell für die erfolgreiche Infektion eines Pathogens sind meist Sekretionssysteme, die Virulenzfaktoren in das extrazelluläre Milieu sekretieren oder direkt in die Wirtszelle translozieren. Unter den sekretierten Virulenzfaktoren wurden Toxine und Zellwand-abbauende Enzyme wie Zellulasen, Xylanasen und Polygalacturonasen identifiziert (Alfano und Collmer, 1997; Thanassi und Hultgren, 2000). Auch Exopolysaccharide (EPS), welche die Bakterien umhüllen und zum Schutz vor Austrocknung und pflanzlichen Giftstoffen, zur Anreicherung von Nährstoffen und zur Adhäsion an der Wirtszelloberfläche beitragen, stellen bei einigen pflanzenpathogenen Bakterien einen bedeutenden Virulenzfaktor dar (Coplin und Cook, 1990; Dharmapuri und Sonti, 1999; Kao et al., 1992). Agrobakterien sekretieren auch DNA, welche direkt in die Wirtszelle transferiert und in das pflanzliche Genom integriert wird. Die transferierte DNA kodiert für Enzyme zur Synthese pflanzlicher Hormone und spezieller Aminosäuren (Opine), welche allein von *Agrobacterium* metabolisiert werden können.

In Gram-negativen Bakterien wurden bisher sechs verschiedene Sekretionssysteme charakterisiert, die Proteine über die innere und äußere bakterielle Membran sekretieren (Kostakioti et al., 2005). Vier Sekretionssysteme sind abhängig vom Sec-System, welches Proteine nach Abspaltung eines N-terminalen Sekretionssignals über die innere bakterielle

Membran in das Periplasma transportiert (Veenendaal *et al.*, 2004). Von besonderer Bedeutung für die Virulenz vieler pathogener Bakterien ist ein Typ III-Sekretionssystem (T3S-System), welches bakterielle Effektorproteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle transportiert. T3S-Systeme wurden erstmals in dem tierpathogenen Bakterium *Yersinia* spp. identifiziert (Michiels *et al.*, 1991) und sind seither in vielen Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien als essentielle Pathogenitätsfaktoren charakterisiert worden (Cornelis und Van Gijsegem, 2000).

1.1 Das Typ III-Sekretionssystem

Der Begriff „T3S-System“ bezieht sich sowohl auf die Translokations-assoziierten T3S-Systeme als auch auf die Flagellum-T3S-Systeme, welche sich vermutlich von einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben (Desvaux *et al.*, 2006; Gophna *et al.*, 2003). Beide T3S-Systeme bestehen aus einem strukturell konservierten membran-durchspannenden Basalkörper, der vermutlich aus zwei Paaren miteinander verbundener zylindrischer Ringe in der inneren und äußeren Membran aufgebaut ist (Abb. 1-1) (Cornelis, 2006; Yip und Strynadka, 2006). Neun Komponenten der Basalkörper von Translokations-assoziierten und Flagellum-T3S-Systemen sind homolog zueinander (Blocker *et al.*, 2003).

Die Basalkörper von Translokations-assoziierten T3S-Systemen sind mit einer extrazellulären Pilus- bzw. Nadelstruktur assoziiert (Abb. 1-1) (Ghosh, 2004; He *et al.*, 2004; Hueck, 1998). Im Vergleich zu den relativ kurzen Nadeln tierpathogener Bakterien (ca. 45-80 nm) kann der Pilus des T3S-Systems pflanzenpathogener Bakterien eine Länge von bis zu 2 µm erreichen und so vermutlich die pflanzliche Zellwand durchspannen (Cornelis, 2006). Eine besondere extrazelluläre Struktur stellt das EspA-Filament von enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) dar, das eine Verlängerung der Nadel bildet und eine Länge von bis zu 600 nm erreichen kann (Abb. 1-1) (Daniell *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2001). T3S-Systeme ermöglichen sowohl die Proteinsekretion in das extrazelluläre Milieu als auch die Proteintranslokation in die eukaryotische Wirtszelle (Hueck, 1998). Die Translokation erfolgt über das T3S-Translokon, einem postulierten kanalförmigen Proteinkomplex, der in die Wirtszellmembran inseriert (Büttner *et al.*, 2002; Coombes und Finlay, 2005; Ghosh, 2004).

Im Gegensatz zu Translokations-assoziierten T3S-Systemen, sind die Basalkörper von Flagellum-T3S-Systemen nicht mit einer Nadel- oder Pilusstruktur assoziiert, sondern über einen extrazellulären Hakenkomplex mit dem Flagellumfilament verbunden, welches der bakteriellen Motilität dient (Abb. 1-1) (Macnab, 2004).

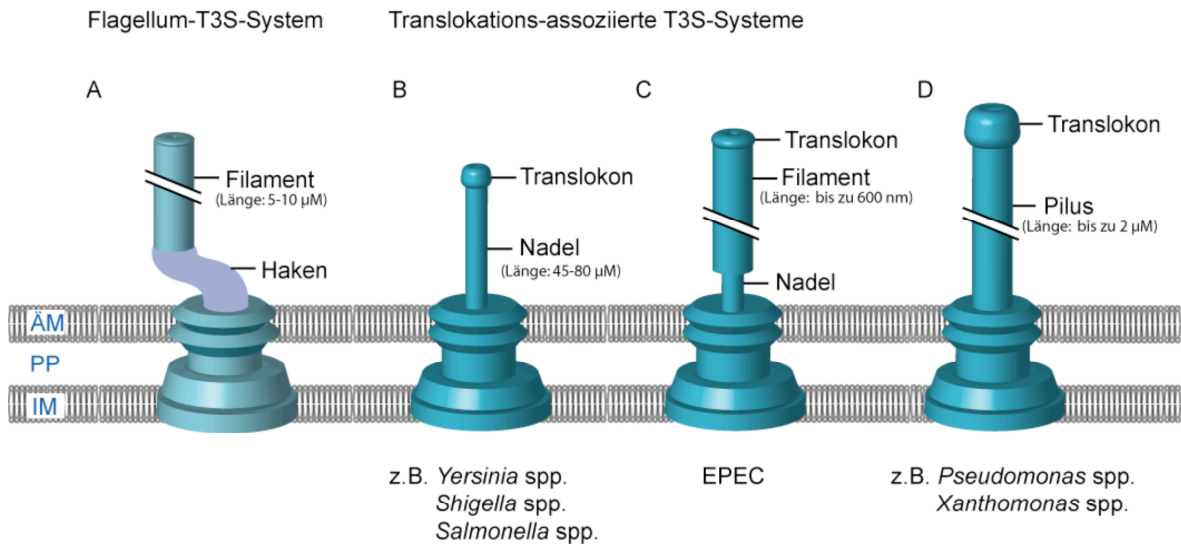


Abb. 1-1: Struktureller Vergleich von Flagellum- und Translokations-assoziierten T3S-Systemen. Schematische Darstellung des Flagellum-T3S-Systems mit extrazellulärem Haken und Filament (A) sowie der Translokations-assoziierten T3S-Systeme, welche in tierpathogenen Bakterien mit einer extrazellulären Nadelstruktur (B) bzw. in enteropathogenen *E. coli* (EPEC) zusätzlich mit einem Filament (C), und in pflanzenpathogenen Bakterien mit einer extrazellulären Pilusstruktur (D) assoziiert sind. ÄM= äußere bakterielle Membran, PP = Periplasma, IM = innere bakterielle Membran. Abb. modifiziert nach Cornelis, 2006.

1.2 Substrate des T3S-Systems pflanzenpathogener Bakterien

Substrate des T3S-Systems besitzen kein abspaltbares Signalpeptid und werden ohne das Auftreten periplasmatischer Intermediate Sec-unabhängig sekretiert (Hueck, 1998). In pflanzenpathogenen Bakterien werden die T3S-Substrate nach ihrem Bestimmungsort in drei Klassen unterteilt: Harpine, Effektorproteine und extrazelluläre Komponenten des T3S-Systems.

1.2.1 Extrazelluläre Komponenten des T3S-Systems

Die Typ III-abhängige Sekretion der extrazellulären Komponenten des T3S-Apparates, also z.B. Bestandteile des Pilus oder des Translokons, ist vermutlich die Voraussetzung für die Sekretion aller weiteren Substrate. Pilus- und Translokonproteine werden nicht in die Pflanzenzelle transloziert.

1.2.2 Harpine

Harpine waren die ersten Proteine, welche als Substrate des T3S-Systems identifiziert wurden (Wei *et al.*, 1992). Sie zeichnen sich durch einen hohen Glycinanteil, das Fehlen von Cysteinresten sowie Hitzestabilität aus und induzieren in Nicht-Wirtspflanzen eine unspezifische Zelltodreaktion (Alfano und Collmer, 1997; Galán und Collmer, 1999). Sie wurden u.a. in *Pseudomonas syringae* (HrpZ1, HrpW1, HopAK1 und HopP1), *Erwinia amylovora* (HrpN und HrpW), *Ralstonia solanacearum* (PopA) und *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (HpaG) beschrieben (Arlat *et al.*, 1994; Charkowski *et al.*, 1998; He *et al.*, 1993; Kim und Beer, 1998; Kim *et al.*, 2004; Kvitko *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 1992). Die biologische Funktion der Harpinproteine ist weitgehend unbekannt. HrpW1 und HopAK1 besitzen eine C-terminale Pektatlyase-Domäne, deren enzymatische Aktivität jedoch noch nicht nachgewiesen wurde (Charkowski *et al.*, 1998; Kvitko *et al.*, 2007). HrpZ1 lokalisiert an der pflanzlichen Zellwand und kann *in vitro* Poren in Lipiddoppelmembranen bilden. Es wurde daher eine Beteiligung von HrpZ1 an der Translokation von Virulenzfaktoren in die Wirtszelle bzw. an der Freisetzung von Nährstoffen aus der Wirtszelle postuliert (Engelhardt *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001).

1.2.3 Effektorproteine

Effektorproteine werden im Gegensatz zu den Harpinen direkt in die Pflanzenzelle transloziert und interferieren in suszeptiblen (d.h. anfälligen) Pflanzen mit zellulären Prozessen des Wirtes zugunsten des Pathogens. Dies ermöglicht vermutlich die erfolgreiche Vermehrung des Pathogens in den pflanzlichen Interzellularräumen und führt zur Auslösung von Krankheitssymptomen (Cornelis, 2002; Kjemtrup *et al.*, 2000; Van't Slot und Knogge, 2002). Mögliche Virulenzfunktionen von Effektoren sind die Unterdrückung der pflanzlichen Basalabwehr und spezifischer Abwehrreaktionen, die Manipulation der pflanzlichen Genexpression, von Hormon- und anderen Signalwegen

sowie die Modifikation von Zielproteinen der Pflanze (Grant *et al.*, 2006). Für einige Effektorproteine wurde eine enzymatische Funktion, z.B. als ADP-Ribosyltransferase (HopU1), Tyrosinphosphatase (HopAO1), E3-Ubiquitin-Ligase (AvrPtoB) oder Cysteinprotease (AvrPphB), nachgewiesen (Espinosa *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2007; Rosebrock *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2002). Die Deletion einzelner Effektorgene im korrespondierenden Bakterienstamm hat jedoch aufgrund von funktioneller Redundanz nur in wenigen Fällen einen nachweisbaren Einfluss auf die bakterielle Virulenz (Alfano und Collmer, 2004).

In resistenten Pflanzen können bestimmte Effektorproteine, welche dann als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet werden, erkannt werden, wodurch eine Resistenzreaktion der Pflanze ausgelöst wird. Entsprechend der Gen-für-Gen-Hypothese wird die spezifische Wirtsresistenz häufig durch ein einzelnes Gen in der Pflanze (*R*-Gen, Resistenzgen) und ein korrespondierendes Gen im Pathogen (*avr*-Gen, Avirulenzgen) definiert (Flor, 1971). Das Fehlen oder die Mutation des *R*- oder des *avr*-Gens führt zum Ausfall dieses Resistenzmechanismus und ermöglicht dem Pathogen, sich in der Pflanze zu vermehren. Die molekulare Isolierung von korrespondierenden *avr*- und *R*-Genen (z.B. *avrPto* und *Pto*; Martin *et al.*, 1993; Ronald *et al.*, 1992) bestätigte die Gen-für-Gen-Hypothese. *R*-Proteine binden entweder direkt oder indirekt an Avr-Proteine oder sie erkennen durch das Avr-Protein verursachte Modifikationen von pflanzlichen Zielproteinen (Jones und Dangl, 2006). So interagiert das *R*-Protein RRS1 direkt mit dem Avr-Protein PopP2 aus *R. solanacearum*, während das *R*-Protein RPM1 die durch die Avr-Proteine AvrRpm1 und AvrB aus *P. syringae* induzierten Phosphorylierungen des Zielproteins RIN4 erkennt (Deslandes *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2002). Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Avr-Protein-induzierte Expression des *R*-Gens. So lösen die Avr-Proteine AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und AvrXa27 aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* eine Resistenzreaktion aus, indem sie die Expression der korrespondierenden *R*-Gene *Bs3* bzw. *Xa27* aktivieren (Gu *et al.*, 2005; Römer *et al.*, 2007). Im Fall von AvrBs3 wurde eine direkte Bindung an den *Bs3*-Promotor gezeigt (Römer *et al.*, 2007). Während die meisten isolierten *R*-Gene Proteine mit einer konservierten Nukleotidbindestelle (NBS) und Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (LRR, „leucine rich repeats“) im C-terminalen Bereich kodieren (DeYoung und Innes, 2006), besitzt *Bs3* Homologie zu Flavin-Monooxygenasen (Römer *et al.*, 2007).

1.3 T3S-Signale

Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Signalsequenzen Sec-abhängig sekretierter Proteine konnte die Natur des T3S-Signals trotz intensiver Forschung bisher nicht vollständig geklärt werden (Nielsen *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass einige Effektorproteine von Translokations-assoziierten T3S-Systemen und Flagellum-T3S-Systemen heterolog sekretiert werden können, sprechen aber für das Vorhandensein eines generellen Sekretionssignals (Anderson *et al.*, 1999; Lee und Galan, 2004; Rossier *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 2001; Young und Young, 2002; Young *et al.*, 1999). Die Art des Signals wird noch immer kontrovers diskutiert: ein Signal im N-terminalen Bereich des Proteins oder im 5'-Bereich der mRNA, welches einen kotranslationalen Transport bedingen würde. Diese Kontroverse liegt in der großen Variabilität und geringen Konservierung des T3S-Signals begründet.

Für die Hypothese eines Sekretionssignals im 5'-Bereich der mRNA spricht, dass Leserastermutationen in den ersten Codons der Effektorgene *yopE*, *yopN* und *yopQ* aus *Yersinia* spp., welche die mRNA-Struktur kaum, aber die Aminosäuresequenz stark veränderten, zu funktionalen Sekretionssignalen führten (Anderson *et al.*, 1999; Anderson und Schneewind, 1997; Anderson und Schneewind, 1999; Ramamurthi und Schneewind, 2002; Ramamurthi und Schneewind, 2003). Ein mRNA-Signal wurde auch für Effektoren aus pflanzenpathogenen Bakterien postuliert, u.a. für AvrB und AvrPto aus *P. syringae* sowie für AvrBs2 aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Anderson *et al.*, 1999; Mudgett *et al.*, 2000).

Gegen ein mRNA-Signal und für ein Sekretionssignal auf Proteinebene sprechen Studien, bei denen die Funktion des Signals durch Mutationen, welche die mRNA-Struktur, aber nicht die Aminosäuresequenz veränderten, nicht beeinträchtigt wurde (Lloyd *et al.*, 2001b; Lloyd *et al.*, 2002; Schesser *et al.*, 1996; Sory *et al.*, 1995). So hatten Mutationen des YopE-Sekretionssignals, welche 17 von 27 Codons veränderten, aber die Aminosäureabfolge intakt ließen, keinen Einfluss auf die YopE-Sekretion (Lloyd *et al.*, 2001b). Außerdem lässt sich die schnelle Translokation, welche für die Effektoren YopH aus *Yersinia pseudotuberculosis* und SipA aus *Salmonella typhimurium* bereits zehn Sekunden nach der Aktivierung des T3S-Systems nachweisbar ist, zeitlich nicht durch einen kotranslationalen Transport erklären (Andersson *et al.*, 1999; Schlumberger *et al.*, 2005; Wilharm *et al.*, 2007). Studien zahlreicher Effektorproteine aus *P. syringae* und *Yersinia*

spp. weisen darauf hin, dass ein amphipathischer Charakter der N-terminalen 50 Aminosäuren von Bedeutung ist (Guttman *et al.*, 2002; Lloyd *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Schechter *et al.*, 2004). Für Effektoren aus *P. syringae* sind weiterhin ein hoher Gehalt an Serinresten und das Fehlen saurer Aminosäurereste an den Positionen 1 bis 12 charakteristisch (Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Diese Merkmale sind jedoch nicht allgemein gültig für Effektoren verschiedener Bakterienarten (Alfano und Collmer, 2004; Roden *et al.*, 2004).

Effektorproteine besitzen vermutlich zusätzlich zum Sekretionssignal ein Translokationssignal innerhalb der ersten 50 bis 100 Aminosäuren, welches den Transport über die Wirtszellmembran vermittelt (Ghosh, 2004; Guttman *et al.*, 2002; Lloyd *et al.*, 2001b; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Häufig ist dies auch die Bindestelle von T3S-Chaperonen (Parsot *et al.*, 2003).

1.4 T3S-Chaperone

Die Stabilität und/oder effiziente Sekretion zahlreicher T3S-Substrate ist von cytoplasmatischen T3S-Chaperonen abhängig, welche sowohl in tier- als auch in pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert wurden (He *et al.*, 2004). T3S-Chaperone binden häufig an N-terminale, direkt hinter dem Sekretionssignal liegende Bereiche ihrer Substrate, halten dadurch das Signal exponiert und erleichtern somit die Sekretion ihrer Substrate (Boyd *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001a; Parsot *et al.*, 2003). T3S-Chaperone zeichnen sich durch ein geringes Molekulargewicht (ca. 14 bis 19 kDa) und einen niedrigen isoelektrischen Punkt ($pI \approx 4$ bis 5) aus, weisen untereinander aber nur wenig Sequenzhomologie auf (Feldman und Cornelis, 2003; Wattiau *et al.*, 1996). Hinsichtlich ihrer Funktion und Struktur lassen sich T3S-Chaperone in mindestens fünf Klassen unterteilen (Wilharm *et al.*, 2007). Die Mehrzahl der T3S-Chaperone bindet an ein einzelnes, spezifisches Effektorprotein und zählt zur Klasse IA. In der Regel ist das Chaperon dabei in unmittelbarer Nähe des entsprechenden Effektorgens kodiert. Kristallstrukturen von Klasse IA-Chaperonen, u.a. für SicP und SigE (*Salmonella* spp.), SycE, SycH, SycN/YscB und SycT (*Yersinia* spp.) sowie AvrPphF ORF1 (*P. syringae*) zeigen, dass Klasse IA-Chaperone als Dimere agieren und trotz geringer Sequenzidentität untereinander (ca. 20%) ähnlich gefaltet sind (Birtalan und Ghosh, 2001; Buttner *et al.*,

2005; Evdokimov *et al.*, 2002; Locher *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2001; Phan *et al.*, 2004; Schubot *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2004; Stebbins und Galan, 2001a; Trame und McKay, 2003). Klasse IB-Chaperone interagieren mit mehreren, zueinander nicht homologen Effektorproteinen. Vertreter dieser Klasse sind u.a. Spa15 (*Shigella flexneri*), InvB (*Salmonella* spp.) und CesT (EPEC) (Ehrbar *et al.*, 2003; Lilic *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2002; Parsot *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005). Translokonproteine des T3S-Systems besitzen häufig ihre eigenen Chaperone, welche zur Klasse II gezählt werden. Hierzu zählt z.B. IpgC aus *S. flexneri*, welches an die beiden Translokonkomponenten IpaB und IpaC bindet und somit deren vorzeitige Interaktion verhindert (Ménard *et al.*, 1994). Chaperone des Flagellum-T3S-System repräsentieren die Klasse III (Evdokimov *et al.*, 2003). CesA, das Chaperon des Filamentproteins EspA aus enteropathogenen *E. coli* und YscE, das Chaperon des Nadelproteins YscF aus *Yersinia* spp. unterscheiden sich strukturell von Vertretern anderer Klassen und werden daher als Klasse IV- bzw. Klasse V-Chaperone bezeichnet (Phan *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2005).

T3S-Chaperone stabilisieren nicht nur ihre jeweiligen Substrate, sondern verhindern vorzeitige Interaktionen ihrer Substrate untereinander, bewahren Effektorproteine durch teilweise Entfaltung in einem sekretionskompetenten Zustand und vermitteln die Substraterkennung durch das T3S-System (Cheng und Schneewind, 2000; Cornelis und Van Gijsegem, 2000; Luo *et al.*, 2001; Page und Parsot, 2002; Stebbins und Galan, 2001b). In *Yersinia* spp. wurden Hinweise darauf gefunden, dass T3S-Chaperone auch an der Etablierung einer hierarchischen Ordnung der Effektorproteinsekretion beteiligt sein könnten (Boyd *et al.*, 2000; Wulff-Strobel *et al.*, 2002).

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

Gram-negative pflanzenpathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas* verursachen Krankheiten an mehr als 120 monokotyledonen und 260 dikotyledonen Pflanzenarten, welche mit chlorotischen und nekrotischen Läsionen, Welke und Fäule einhergehen (Young *et al.*, 1992). Der Befall von wirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen wie Tomate, Reis, Kohl, Soja und Paprika führt zu teilweise erheblichen Ernteaussfällen und ist beispielsweise auf Infektionen durch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, der Erreger der Adernschwärze („black rot“) in zahlreichen *Brassica*-Arten, *Xanthomonas axonopodis*

pv. *citri*, der Erreger des Citruskrebs („citrus canker“) in einer Vielzahl von *Citrus*-Arten und *X. oryzae* pv. *oryzae*, der Erreger der bakteriellen Fäule („bacterial blight“) in Reis, zurückzuführen (Baker *et al.*, 1997).

Eines der Modellsysteme zum Studium der molekularen Interaktion zwischen bakteriellen Pflanzenpathogenen und ihren Wirtspflanzen ist *X. campestris* pv. *vesicatoria*, das auch als *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004) oder *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* bezeichnet wird (Vauterin *et al.*, 2000). Es verursacht die bakterielle Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“) bei Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Paprika (*Capsicum* spp.) (Abb. 1-2 A-D) und richtet besonders in Anbaugebieten mit feucht-warmem Klima erheblichen Schaden an (Agrios, 2005). Die Bakterien dringen über natürliche Öffnungen wie Stomata oder Verwundungen in das pflanzliche Gewebe ein und vermehren sich lokal im Apoplasten (Abb. 1-2 E). Eine systemische Ausbreitung der Bakterien findet nicht statt.

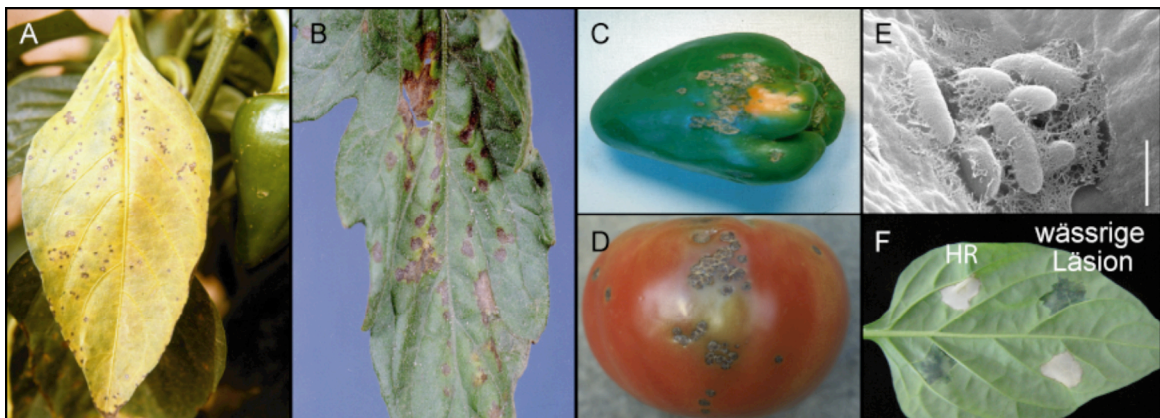


Abb. 1-2: *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Blättern und Früchten von Paprika (A und C) und Tomate (B und D). (E) Rasterelektronische Aufnahme von *X. campestris* pv. *vesicatoria* im Interzellularraum eines Paprikablattes. Die Bakterien sind eingebettet in das Exopolysaccharid Xanthan. Der Balken entspricht 1 μm . (F) Laborphänotypen, die durch die Infiltration mit hohen Bakterientitern (10^7 - 10^8 Zellen/ml) hervorgerufen werden. Die HR (hypersensitive Reaktion) wurde durch einen avirulenten, die wässrigen Läsionen durch einen virulenten Stamm ausgelöst. Bildquellen: (A-D) Clemson University, USDA Cooperative Extension Slide series images, www.forestryimages.org; (E) G. Hause und D. Gürlebeck, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

In suszeptiblen Pflanzen kann sich *X. campestris* pv. *vesicatoria* in den Interzellularräumen der Pflanze vermehren und Krankheitssymptome auslösen, makroskopisch in Form von wässrigen Läsionen (WL) sichtbar, welche durch ein feucht erscheinendes Blattgewebe im infizierten Bereich gekennzeichnet sind und später nekrotisch werden (Abb. 1-2 F). In diesem Fall spricht man von einer kompatiblen Interaktion zwischen virulenten Bakterien und suszeptiblem Wirt. In resistenten Pflanzen kann jedoch eine Vermehrung von *X.*

campestris pv. *vesicatoria* durch eine Abwehrreaktion verhindert werden, welche durch eine R-Gen-vermittelte Erkennung von Avr-Proteinen ausgelöst wird und mit der Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR - „hypersensitive response“) verbunden ist. Dabei handelt es sich um einen schnellen, lokal begrenzten, programmierten Zelltod des pflanzlichen Gewebes an der Infektionsstelle, der die weitere Vermehrung der Bakterien verhindert (Klement, 1982). Dieser Zelltod betrifft bei einer natürlichen Infektion meist nur wenige Zellen und ist makroskopisch nicht sichtbar. Durch Inokulation größerer Blattbereiche mit hohen Bakterientitern (10^7 - 10^8 Zellen/ml) lässt sich die HR als eine räumlich scharf begrenzte Nekrose verdeutlichen (Abb. 1-2 F). Man spricht von einer inkompatiblen Interaktion zwischen avirulenten Bakterien und resistentem Wirt. Bekannte Gen-für-Gen-Interaktionen zwischen *avr*-Genen aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* und R-Genen aus Paprikakultivaren sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst. Die R-Gene *Bs2* und *Bs3* aus Paprika sowie *Bs4* aus Tomate vermitteln eine Resistenz gegen *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme, welche *avrBs2*, *avrBs3* bzw. *avrBs4* translozieren, und wurden bereits kloniert (Römer *et al.*, 2007; Schornack *et al.*, 2004; Tai *et al.*, 1999).

Tabelle 1-1: Interaktionen von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämmen mit fast-isogenen Parikakultivaren.

<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> - Stamm	bekannte <i>avr</i> -Gene ^a	ECW	Parikakultivare ^b		
			ECW-10R (<i>Bs1</i>)	ECW-20R (<i>Bs2</i>)	ECW-30R (<i>Bs3</i>)
85-10	<i>avrBs1</i>	WL	HR	HR	WL
82-8	<i>avrBs3</i> , <i>avrBs4</i> , <i>avrRxv</i>	WL	WL	HR	HR
75-3	<i>avrBs1</i> , <i>avrBsT</i> , <i>avrRxv</i>	HR	HR	HR	HR

^a *avrBs2* ist in allen *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämmen enthalten.

^b ECW= „Early Californian Wonder“; HR = hypersensitive Reaktion; WL = wässrige Läsionen; AvrBsT wird von allen angegebenen Paprikakultivaren erkannt.

Die ersten Effektorproteine von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurden durch ihre Avirulenzaktivität in resistenten Pflanzen identifiziert. Die transiente Expression von Avr-Proteinen, wie z.B. AvrBs3, in resistenten Pflanzen, löste eine Resistenzreaktion aus und brachte so erste Hinweise auf einen direkten Transport dieser Proteine in die Pflanzenzelle (Van den Ackerveken *et al.*, 1996). Später konnte die Typ III-abhängige Translokation auch immunocytochemisch und über Reporterproteine, wie z.B. die Calmodulin-abhängige Adenylat-Cyclase-Domäne (Cya) und das im Sekretions- und Translokationssignal

deletierte AvrBs3-Derivat AvrBs3 Δ 2 nachgewiesen werden (Casper-Lindley *et al.*, 2002; Szurek *et al.*, 2002).

Bislang wurden durch genomische Sequenzanalysen und Reporterprotein-basierte Translokationstests im *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mehr als 15 Effektorproteine identifiziert (Tabelle 1-2) (Thieme *et al.*, 2005).

Tabelle 1-2: Bekannte Effektorproteine aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10.

Effektorprotein	Vorhergesagte Funktion/ Motive^a	Referenz
AvrBs1	unbekannt	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; O'Garro <i>et al.</i> , 1997)
AvrBs2	Phosphodiesterase	(Kearney und Staskawicz, 1990; Mudgett <i>et al.</i> , 2000)
AvrRxv	Protease, AvrRxv/YopJ-Familie	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; Whalen <i>et al.</i> , 1993)
HpaA	unbekannte Funktion in der Pflanze; fördert Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen	(Huguet <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
XopB	homolog zu HopD1 (AvrPphD)	(Noël <i>et al.</i> , 2001)
XopC	Phosphoribosyltransferase, Phosphatase-Motiv	(Noël <i>et al.</i> , 2003; Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopD	SUMO-Protease	(Hotson <i>et al.</i> , 2003; Noël <i>et al.</i> , 2002)
XopE1	Transglutaminase, Myristoylierungsmotiv, HopX-Familie	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopE2	Transglutaminase, Myristoylierungsmotiv, HopX-Familie	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopF1	unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopF2	unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopJ	Protease, AvrRxv/YopJ-Familie	(Noël <i>et al.</i> , 2003)
XopN	unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopO	unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopP	unbekannt	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopQ	Nukleosid-Hydrolase, homolog zu HopQ1	(Roden <i>et al.</i> , 2004)
XopX	unbekannt	(Metz <i>et al.</i> , 2005)

^a Vorhergesagte Funktion und Homologie zu bekannten Effektorproteinen von *P. syringae*. Die Nomenklatur der Effektorproteine folgt Lindeberg *et al.*, 2005. Xop = „Xanthomonas outer protein“.

Es ist bemerkenswert, dass der Stamm 85-10 kein homologes Protein der AvrBs3-Effektorfamilie kodiert, welche typisch für Xanthomonaden ist (Thieme *et al.*, 2005). AvrBs3 ist das am besten charakterisierte Effektorprotein von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und verursacht in suszeptiblen Pflanzen eine Hypertrophie, d.h. eine Vergrößerung von Mesophyllzellen (Bonas *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 2007; Marois *et al.*, 2002). Im Zellkern der Wirtszelle induziert AvrBs3, welches typische Motive eines eukaryotischen Transkriptionsfaktors wie eine saure Aktivierungsdomäne und

Kernlokalisierungssequenzen aufweist, die Expression von *UPA*-Genen (*UPA* – „upregulated by AvrBs3“). Einige *UPA*-Gene kodieren mögliche α -Expansine und Auxin-induzierte Proteine, die eine Rolle bei der Zellvergrößerung spielen könnten (Marois *et al.*, 2002).

Der Virulenzfaktor HpaA besitzt ebenso funktionale Kernlokalisierungssequenzen (Huguet *et al.*, 1998). Die Virulenzfunktion von HpaA ist jedoch vermutlich nicht von der Kernlokalisierung abhängig, sondern vielmehr auf die Beteiligung von HpaA an der Typ III-abhängigen Sekretion zurückzuführen (Lorenz *et al.*, 2008a). So ist HpaA für die effiziente *in vitro*-Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen essentiell (Lorenz *et al.*, 2008a). HpaA hat daher vermutlich eine duale Funktion als Effektorprotein und T3S-Kontrollprotein.

1.6 Das T3S-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Die Translokation aller bekannten Effektorproteine von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird durch das T3S-System vermittelt. Das T3S-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird von einer 23 kb großen chromosomalen Region, dem *hrp*-Gencluster (*hrp* - „hypersensitive response and pathogenicity“), kodiert (Abb. 1-3) (Bonas *et al.*, 1991; Büttner *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007). Das *hrp*-Gencluster wird von einem mobilen genetischen Element und einem tRNA-Gen flankiert und besitzt damit typische Merkmale einer Pathogenitätsinsel (Noël *et al.*, 2002).

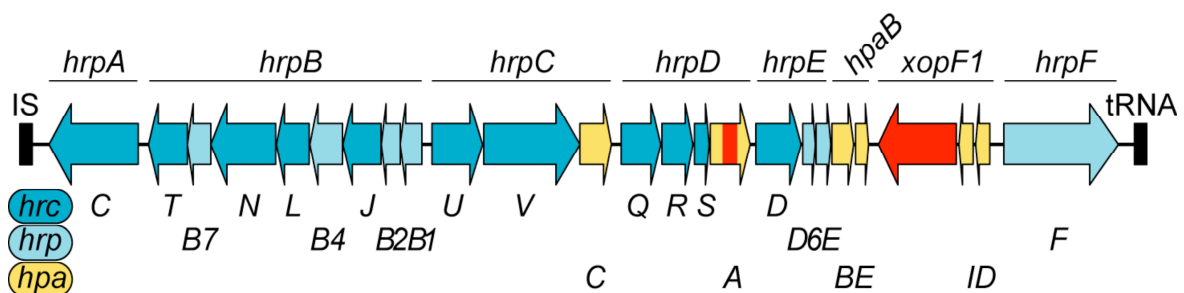


Abb. 1-3: Schematische Darstellung des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Das *hrp*-Gencluster besteht aus acht Transkriptionseinheiten und wird von einem Insertionselement (IS) und einem tRNA-Gen begrenzt. *hrc*-, *hrp*- und *hpa*-Gene sind blau, hellblau bzw. gelb unterlegt. Gene, welche Effektorproteine kodieren, sind rot unterlegt. Angegeben sind auch die jeweiligen Genbezeichnungen. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. HpaA erfüllt möglicherweise eine duale Funktion als Effektor- und T3S-Kontrollprotein (Lorenz *et al.*, 2008a).

Regulation der *hrp*-Genexpression

Die Expression der Komponenten des T3S-Apparates erfolgt nicht konstitutiv, sondern wird in der Pflanze oder in einem speziellen Minimalmedium nach Perzeption eines noch unbekanntes extrazellulären Signals induziert (Schulte und Bonas, 1992; Wengelnik *et al.*, 1996b). An der Regulation der *hrp*-Gene sind HrpG und HrpX beteiligt, welche außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert sind. HrpG, der übergeordnete Transkriptionsaktivator, ist homolog zu Response-Regulatoren von Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystemen der OmpR-Familie (Wengelnik *et al.*, 1996b). Eine postulierte Sensorkinase, die HrpG durch Phosphorylierung aktiviert, konnte bislang nicht identifiziert werden. Die Isolierung einer Punktmutante in *hrpG* (E44K), die zu einem konstitutiv aktiven HrpG-Protein (HrpG*) führte, ermöglicht die Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion *in vitro* (Rossier *et al.*, 1999; Wengelnik *et al.*, 1999). HrpG induziert die Expression von *hrpA* und *hrpX*, welches einen Transkriptionsaktivator der AraC-Familie kodiert und die Expression der Gene der Operone in der Region von *hrpB* bis *hrpF* positiv reguliert (Abb. 1-4) (Wengelnik und Bonas, 1996).

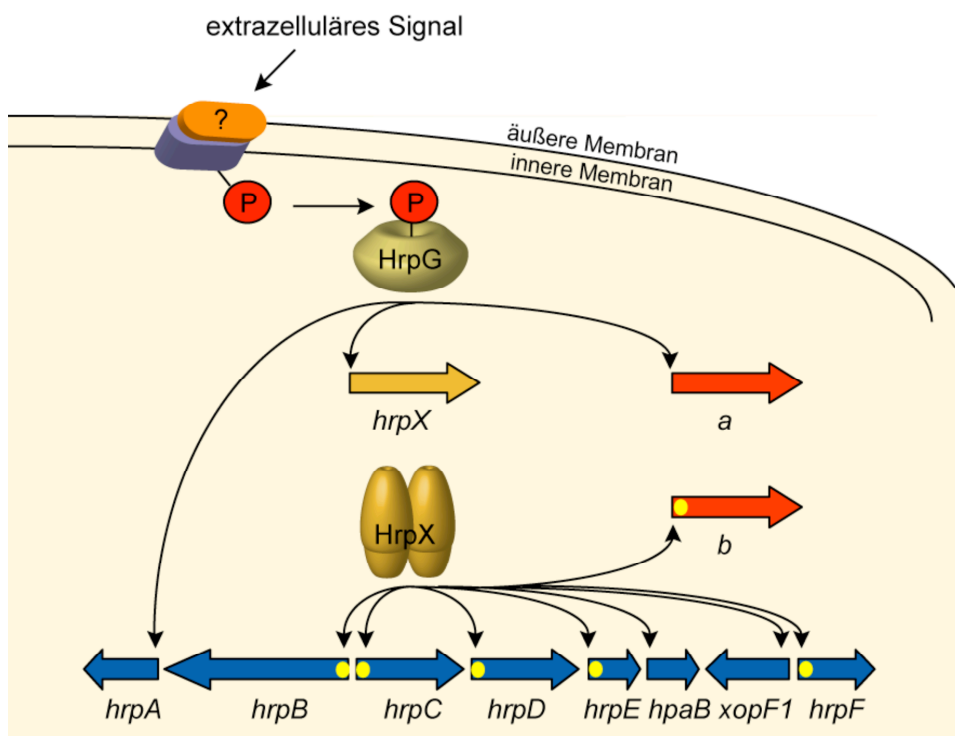


Abb. 1-4: Modell der Regulation des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Ein unbekannter Sensor erkennt ein extrazelluläres Signal und aktiviert den Transkriptionsaktivator HrpG, vermutlich durch Phosphorylierung (P). Aktiviertes HrpG induziert die Expression von *hrpA*, *hrpX* und weiterer nicht charakterisierter Gene (a). HrpX aktiviert die Operone in der Region von *hrpB* bis *hrpF* sowie weitere Gene (b), die u.a. Effektorproteine kodieren. PIP („plant inducible promotor“-)Boxen sind als gelbe Kreise dargestellt.

Durch Transkriptionsanalysen konnte ein genomweites HrpG/HrpX-Regulon identifiziert werden, zu dem u.a. einige Effektorproteine und weitere Virulenzfaktoren gehören (Noël *et al.*, 2001). Viele HrpX-regulierte Gene weisen ein konserviertes Promotorelement mit der Konsensussequenz TTCG-N₁₆-TTCG auf, die sogenannte PIP-Box (PIP - „plant inducible promotor“), an die HrpX bindet (Koebnik *et al.*, 2006). PIP-Box-ähnliche Sequenzen wurden nicht nur in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sondern auch in anderen Xanthomonaden sowie in *R. solanacearum* gefunden (Da Silva *et al.*, 2002; Fenselau und Bonas, 1995; Lee *et al.*, 2005; Salanoubat *et al.*, 2002).

Organisation des *hrp*-Genclusters

Das *hrp*-Gencluster umfasst 25 Gene, welche in acht Transkriptionseinheiten organisiert sind und neben den Strukturkomponenten des T3S-Apparates auch T3S-Kontrollproteine sowie zwei Effektorproteine kodieren (Bonas *et al.*, 1991; Büttner *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007). Durch DNA-Sequenzanalysen und die Charakterisierung nicht-polarer Mutanten wurden drei Genklassen identifiziert, welche als *hrp*, *hrc* („*hrp* conserved“) und *hpa* („*hrp* associated“) bezeichnet werden. *hrp*-Gene sind essentiell für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und kodieren vermutlich Komponenten des T3S-Systems, welche nicht in allen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konserviert sind. *hrc*-Gene kodieren die in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konservierten und daher wahrscheinlich grundlegenden Komponenten des Sekretionsapparates und sind für die Auslösung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen Pflanzen und für die Induktion der HR in resistenten Pflanzen essentiell. Die Buchstabenkennzeichnung entspricht der Bezeichnung für die homologen *ysc*-Gene (*ysc* - „*Y*ersinia *s*ecretion“) aus *Yersinia* spp. (Bogdanove *et al.*, 1996). *hpa*-Gene üben einen mehr oder weniger starken modulierenden Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Interaktion aus, sind jedoch mit Ausnahme von *hpaB* für die bakterielle Pathogenität nicht essentiell (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006; Huguet *et al.*, 1998).

1.7 Funktion der im *hrp*-Gencluster kodierten Proteine

1.7.1 Konservierte Komponenten des T3S-Systems

Die 11 Hrc-Proteine bilden wahrscheinlich die Kernkomponenten des Sekretionsapparates und zeigen (mit Ausnahme von HrcC und HrcD) auch Homologie zu Komponenten des Flagellum-T3S-Systems (Abb. 1-5; Tabelle 1-3) (Aizawa, 2001; Desvaux *et al.*, 2006; Gophna *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2000; Tampakaki *et al.*, 2004).

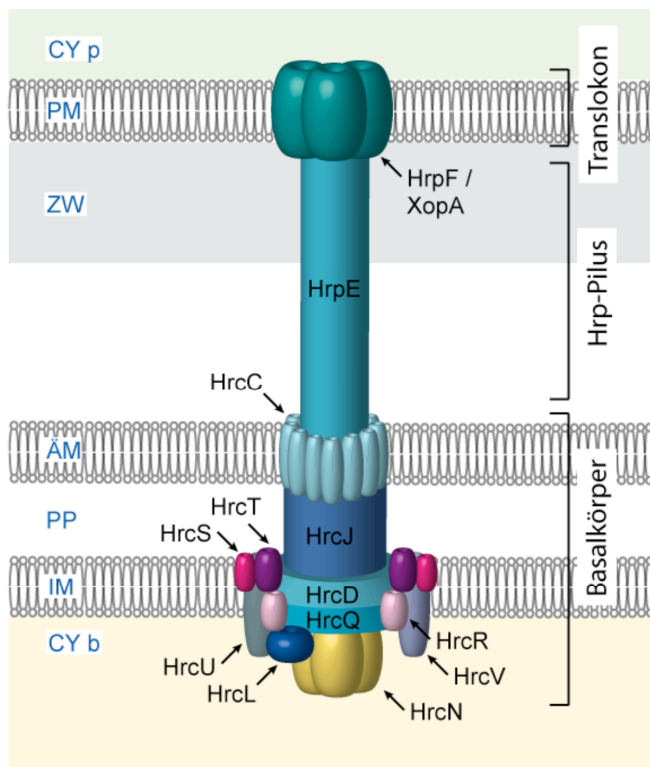


Abb. 1-5: Modell des T3S-Systems von *X. campestris pv. vesicatoria*.

Der Basalkörper des T3S-Systems von *X. campestris pv. vesicatoria* wird von den konservierten Proteinen HrcC, D, J, L, N, Q, R, S, T, U und V gebildet. Der Hrp-Pilus ist aus Untereinheiten von HrpE aufgebaut. Das Translokon besteht vermutlich aus HrpF und dem in der flankierenden Region des *hrp*-Genclusters kodierten XopA.

CY b = bakterielles Cytoplasma, CY p = pflanzliches Cytoplasma, IM = innere bakterielle Membran, ÄM = äußere bakterielle Membran, PP = Periplasma, PM = Plasmamembran, ZW = pflanzliche Zellwand.

HrcC gehört zur Familie der Sekretine und ist die einzige Komponente des T3S-Systems von *X. campestris pv. vesicatoria*, die in der äußeren Membran lokalisiert ist (Wengelnik *et al.*, 1996a). Sekretine Gram-negativer Bakterien formen homoooligomere, ringförmige Strukturen aus 12-14 Untereinheiten, die Poren in der äußeren Membran bilden (Burghout *et al.*, 2004; Koster *et al.*, 1997).

HrcJ gehört zur YscJ-Familie von Lipoproteinen, deren Mitglieder durch eine N-terminal gebundene Fettsäure und über eine C-terminale Transmembranhelix (TMH) mit der periplasmatischen Seite der inneren Membran verankert sind (Blocker *et al.*, 2001; Silva-Herzog *et al.*, 2008). Für die HrcJ-homologen Proteine MxiJ aus *S. flexneri* und PrgK aus *S. typhimurium* wurde gezeigt, dass sie am Aufbau der inneren Ringe des T3S-Apparates

beteiligt sind (Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000). Mitglieder der YscJ-Familie bilden supramolekulare Strukturen aus 24 - 26 Monomeren und verbinden vermutlich die ringförmigen Proteinkomplexe der inneren und äußeren Membran (Suzuki *et al.*, 2004; Yip *et al.*, 2005). Eine Interaktion von MxiJ mit dem Sekretin MxiD konnte bereits gezeigt werden (Schuch und Maurelli, 2001). Neben HrcJ sind auch HrcD, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU und HrcV in der inneren Membran lokalisiert (Berger, 2005; Cornelis, 2006; Yip und Strynadka, 2006). HrcD gehört zur am schwächsten konservierten Proteinfamilie, deren Funktion noch ungeklärt ist, und besitzt eine TMH, eine cytoplasmatische und eine periplasmatische Domäne (Berger, 2005). HrcR, HrcS und HrcT sind homolog zu FliP, FliQ und FliR, welche vermutlich den zentralen Exportkanal des Flagellum-T3S-Systems in der inneren Membran bilden (Aizawa, 2001). Membrantopologiestudien zeigten, dass HrcR vier, HrcS und HrcT dagegen jeweils eine TMH aufweisen. Die drei Proteine besitzen je eine periplasmatische, sowie HrcS zusätzlich eine cytoplasmatische Domäne (Berger, 2005).

HrcU und HrcV gehören zu den am stärksten konservierten Komponenten des T3S-Apparates. HrcU ist ein Mitglied der FlhB/YscU-Familie und besitzt vier TMHs und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne (Berger, 2005). Für FlhB des Flagellum-T3S-Systems konnte gezeigt werden, dass es am Wechsel der Sekretion von Hakenkomponenten zu Filamentproteinen beteiligt ist (Hirano *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996). YscU aus *Yersinia* spp. ist in die zeitliche Regulation der Sekretion von Nadel- und Effektorproteinen involviert (Edqvist *et al.*, 2003). Mitglieder der FlhB/YscU-Familie könnten demnach die Substratspezifität des Sekretionsapparates kontrollieren. HrcV besitzt 10 TMHs und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne (Berger, 2005). Das HrcV-Homolog FlhA des Flagellum-T3S-Systems interagiert mit mehreren cytoplasmatischen und membranständigen Komponenten des Sekretionsapparates (McMurry *et al.*, 2004). Die genaue Funktion HrcV-homologer Proteine ist nicht bekannt.

Bei HrcQ, HrcL und HrcN handelt es sich laut Strukturvorhersagen um cytoplasmatische Proteine. HrcQ gehört zur YscQ-Familie, deren Mitglieder vermutlich eine multimere Plattform an der cytosolischen Seite der inneren Membran bilden, die der Rekrutierung anderer Komponenten des T3S-Systems dient (Cornelis, 2006; Morita-Ishihara *et al.*, 2006). HrcN besitzt Homologie zur β -Untereinheit von F_0F_1 -ATPasen und ist daher vermutlich an der Energetisierung des Sekretionsprozesses beteiligt. T3S-assoziierte ATPasen bilden einen hexameren bzw. dodecameren Ring, der vermutlich durch

Interaktionen mit konservierten Komponenten des T3S-System mit der inneren Membran assoziiert ist (Claret *et al.*, 2003; Minamino und MacNab, 2000b; Pozidis *et al.*, 2003; Savvides *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002). Die ATPasen FliI aus *Salmonella enterica* und YscN aus *Yersinia* spp. interagieren mit den HrcL-homologen Proteinen FliH bzw. YscL, welche *in vitro* die ATPase-Aktivität negativ regulieren. HrcL könnte daher als Regulator einer möglichen ATPase-Funktion von HrcN fungieren.

Tabelle 1-3: Konservierte Komponenten des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

<i>Xcv</i> ^a	Homologie ^b		mögliche Funktion	Lok. ^c	Referenz
	Translokations-assoziiertes T3S-System	Flagellum-T3S-System			
HrcC	YscC MxiD InvG	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Shigella</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.)		Sekretin	ÄM (Burghout <i>et al.</i> , 2004; Wengelnik <i>et al.</i> , 1996a)
HrcJ	YscJ MxiJ PrgK EscJ	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Shigella</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.) (EPEC)	FliF	Lipoprotein	IM (Rossier <i>et al.</i> , 2000; Silva-Herzog <i>et al.</i> , 2008)
HrcD	YscD PrgH	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.)		unbekannt	IM (Marlovits <i>et al.</i> , 2004)
HrcR	YscR EscR	(<i>Yersinia</i> spp.) (EPEC)	FliP	unbekannt	IM (Fan <i>et al.</i> , 1997; Ohnishi <i>et al.</i> , 1997)
HrcS	YscS EscS	(<i>Yersinia</i> spp.) (EPEC)	FliQ	unbekannt	IM (Minamino und Macnab, 1999; Ohnishi <i>et al.</i> , 1997)
HrcT	YscT EscT	(<i>Yersinia</i> spp.) (EPEC)	FliR	unbekannt	IM (Fan <i>et al.</i> , 1997; Ohnishi <i>et al.</i> , 1997)
HrcU	YscU Spa40 SpaS EscU	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Shigella</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.) (EPEC)	FliB	Substrat-erkennung	IM (Allaoui <i>et al.</i> , 1994; Minamino und MacNab, 2000b; Zenk <i>et al.</i> , 2007)
HrcV	YscV InvA	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.)	FliA	unbekannt	IM (Saijo-Hamano <i>et al.</i> , 2004)
HrcQ	YscQ HrcQ	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Pseudomonas</i> spp.)	FliM/FliN	unbekannt	CY (Fadouloglou <i>et al.</i> , 2004; Gonzalez-Pedrajo <i>et al.</i> , 2006)
HrcL	YscL MxiN	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Shigella</i> spp.)	FliH	ATPase-Regulator	CY (Blaylock <i>et al.</i> , 2006; McMurry <i>et al.</i> , 2006)
HrcN	YscN InvC HrcN	(<i>Yersinia</i> spp.) (<i>Salmonella</i> spp.) (<i>Pseudomonas</i> spp.)	FliI	ATPase	CY (Pozidis <i>et al.</i> , 2003; Rossier <i>et al.</i> , 2000)

^a *Xcv* = *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

^b Homologie zu Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems bzw. des Flagellum-T3S-Systems von *S. typhimurium*.

^c Lok. = subzelluläre Lokalisierung. Angaben zur Lokalisierung nach Yip und Strynadka (2006) und den angegebenen Referenzen. ÄM = äußere Membran; IM = innere Membran; CY = Cytoplasma.

1.7.2 Nicht-konservierte Komponenten des T3S-Systems

Die Funktion einiger nicht-konservierter Komponenten des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* (HrpB1, HrpB2, HrpB4, HrpB7, HrpD6, HrpE und HrpF) wurde geklärt (Tabelle 1-4). HrpE, HrpB2 und HrpF sind essentielle Pathogenitätsfaktoren, welche selbst Typ III-abhängig sekretiert, jedoch vom Wildtyp-Stamm nicht transloziert werden. Sie stellen daher vermutlich extrazelluläre Bestandteile des T3S-Systems dar. HrpE wurde durch die Proteinanalyse von gereinigten Hrp-Pili und Immun-elektronenmikroskopie als Hauptkomponente des Hrp-Pilus identifiziert (Weber *et al.*, 2005). Ob HrpB2, welches für die Bildung des Hrp-Pilus essentiell ist (Weber *et al.*, 2005), eine weitere Piluskomponente darstellt, ist noch ungeklärt. HrpF besitzt keinen Einfluss auf die *in vitro*-Sekretion von T3S-Substraten, ist jedoch für die Translokation von Effektorproteinen essentiell (Rossier *et al.*, 2000). HrpF führt zur Porenbildung in Lipiddoppelschichten und stellt vermutlich die Hauptkomponente des Translokons dar (Büttner *et al.*, 2002). Eine weitere Komponente des Translokons bildet möglicherweise XopA, welches in der flankierenden Region des *hrp*-Genclusters kodiert wird und Typ III-abhängig sekretiert, jedoch nicht transloziert wird (Noël *et al.*, 2002). Die Deletion von *xopA* führt zu einer Beeinträchtigung der Effektorproteintranslokation in die Pflanzenzelle, hat aber keinen Einfluss auf die *in vitro*-Sekretion von T3S-Substraten (Noël *et al.*, 2002). XopA ist homolog zu Hpa1 aus *X. oryzae* pv. *oryzae* und zum Harpin HpaG aus *X. axonopodis* pv. *glycines*, löst im Unterschied zu Harpinproteinen jedoch keine unspezifische HR in Nicht-Wirtspflanzen aus (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2000).

T3S-Kontrollproteine

Da die Ausbildung der extrazellulären Komponenten des T3S-Apparates die Voraussetzung für die Translokation von Effektoren in die pflanzliche Wirtszelle ist, erfolgt die Typ III-abhängige Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen vermutlich in einem zeitlich regulierten Prozess. Daran sind die T3S-Kontrollproteine HpaB und HpaC, welche nicht vom T3S-System sekretiert werden, entscheidend beteiligt. Die Deletion von *hpaB* und *hpaC* führt zu einem kompletten Ausfall bzw. einer signifikanten Reduktion der bakteriellen Pathogenität (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). HpaB, welches mit einem Molekulargewicht von 18,4 kDa, einem isoelektrischen Punkt von 4,3 sowie einem Leucingehalt von 13,6% typische Eigenschaften eines T3S-

Chaperons aufweist, ist für die *in vitro*-Sekretion von verschiedenen Effektorproteinen essentiell, hat jedoch keinen Einfluss auf die *in vitro*-Sekretion von Pilus- und Translokonproteinen. HpaB interagiert zudem mit allen getesteten Effektorproteinen *in vitro*, welche untereinander keine Sequenzhomologie aufweisen (Büttner *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass HpaB als generelles T3S-Chaperon an der Sekretion von Effektorproteinen beteiligt ist. Durch *in vivo*-Translokationsanalysen wurde gezeigt, dass HpaB in unterschiedlichem Maße zur Translokation von Effektorproteinen beiträgt. Diese wurden daher basierend auf ihrer HpaB-Abhängigkeit in der Translokation in zwei Klassen unterteilt: während Klasse A-Effektoren (z.B. XopJ, XopF1) in Abwesenheit von HpaB nicht mehr nachweisbar transloziert werden, erfolgt die Translokation von Klasse B-Effektoren (z.B. XopC, AvrBs3) auch in *hpaB*-Deletionsmutanten, jedoch stark reduziert (Büttner *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu HpaB trägt HpaC nicht nur zur effizienten *in vitro*-Sekretion von verschiedenen Effektorproteinen bei, sondern fördert zudem die *in vitro*-Sekretion der möglichen Translokonproteine XopA und HrpF. *In vitro*-Interaktionsstudien zeigten, dass HpaC mit verschiedenen, zueinander nicht homologen Effektorproteinen interagiert sowie, im Unterschied zu HpaB, auch an XopA bindet (Büttner *et al.*, 2006). HpaC unterscheidet sich damit von bekannten T3S-Chaperonen, welche spezifisch für Effektor- oder Translokonproteine sind. Es weist mit einem Molekulargewicht von 23,4 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,8 auch nicht die typischen Eigenschaften eines T3S-Chaperons auf. Ähnlich wie HpaB, hat HpaC einen differentiellen Einfluss auf die Translokation von Effektorproteinen: während die Translokationseffizienz von Klasse A-Effektoren in Abwesenheit von HpaC reduziert ist, ist HpaC für die Translokation von Klasse B-Effektoren entbehrlich (Büttner *et al.*, 2006). Da HpaB und HpaC auch an HrcV, eine Komponente des T3S-Systems in der inneren bakteriellen Membran, binden, stellen sie vermutlich eine Verbindung zwischen T3S-Substraten und dem T3S-Apparat her (Büttner *et al.*, 2006).

Tabelle 1-4: Nicht-konservierte Komponenten des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Protein	mögliche Funktion	T3S ^a	Referenz
HrpE	Hauptkomponente des Hrp-Pilus	+	(Weber <i>et al.</i> , 2005)
HrpB2	extrazelluläre Komponente des T3S-Systems	+	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
HrpF	Translokonprotein	+	(Büttner <i>et al.</i> , 2002; Rossier <i>et al.</i> , 2000)
XopA	Translokonprotein	+	(Noël <i>et al.</i> , 2002)
HpaA	Kontrollprotein; fördert Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen	+	(Huguet <i>et al.</i> , 1998; Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
HpaB	globales T3S-Chaperon; fördert Sekretion von Effektorproteinen	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
HpaC	Kontrollprotein; fördert Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
HpaD	unbekannt	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
HpaE	trägt zur Translokation von Effektorproteinen bei	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
HpaI	unbekannt	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
HpaH	potentielle Transglykosylase; fördert Sekretion und Translokation der Effektorproteine XopF1 und XopJ	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2007; Noël <i>et al.</i> , 2002)

^aAngaben zur Typ III-abhängige Sekretion (T3S) der nicht-konservierten Komponenten des T3S-Systems basieren auf *in vitro*-Sekretionsanalysen.

1.8 Zielstellung dieser Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurde gefunden, dass die Kontrollproteine HpaB und HpaC zur effizienten Sekretion von verschiedenen T3S-Substraten beitragen. Die verschiedenen T3S-Substratklassen von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen werden vermutlich nicht gleichzeitig, sondern in einem zeitlich regulierten Prozess sekretiert. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Proteine an der Regulation der Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* beteiligt sind. Zudem sollte untersucht werden, welche Prozesse der HpaB/HpaC-vermittelten Regulation der Typ III-abhängigen Sekretion zugrunde liegen. Vermutlich beeinflussen die Kontrollproteine HpaB und HpaC die Substraterkennung durch Komponenten des T3S-Systems, welche in der inneren bakteriellen Membran lokalisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher konservierte Komponenten des Sekretionsapparates funktionell charakterisiert werden. Im Fokus der experimentellen Arbeiten waren die mutmaßliche ATPase HrcN sowie das integrale Membranprotein HrcU, welches vermutlich an der Substraterkennung beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2-1 bzw. 2-2 aufgeführt. *E. coli*-Zellen wurden bei 37°C in Lysogeny-Broth (LB)-Medium (Miller, 1972) oder Super-Medium (Quiagen, Hilden, Deutschland), *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme bei 30°C in Nutrient-Yeast-Glycerol (NYG)-Medium oder Minimalmedium A (Ausubel *et al.*, 1996; ergänzt mit 10 mM Saccharose und 0,3% [w/v] Casaminoäuren) angezogen. Plasmide wurden in *E. coli* durch Elektroporation und in *X. campestris* pv. *vesicatoria* durch triparentale Konjugation unter Verwendung von pRK2013 als Helferplasmid eingeführt (Figurski und Helinski, 1979). Antibiotika wurden, wenn nicht anders beschrieben, in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Rifampicin 100 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml.

Tabelle 2-1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DH5α (λpir)	<i>recA hsdR17</i> (r ^K m ^{K+}) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> [λpir]	(Ménard <i>et al.</i> , 1993)
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für die Konjugation; enthält Plasmid mit <i>tra</i> -Funktion	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Paprika-Tomatenrasse 2, Gruppe A; Wildtyp; trägt <i>avrBs1</i> ; Rif ^r	(Canteros, 1990)
85*	85-10-Derivat mit <i>hrpG</i> *-Mutation, woraus konstitutive Expression der <i>hrp</i> -Gene resultiert	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999; Wengelnik <i>et al.</i> , 1996b)
85E*	85*-Derivat; <i>gumG</i> ::Tn3 <i>gusA</i> -Insertionsmutante; EPS ⁻	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
82-8	Paprika-Tomatenrasse 1; Wildtyp; trägt <i>avrBs3</i> und <i>avrBs4</i> ; Rif ^r	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
82*	82-8 Derivat; trägt <i>hrpG</i> *	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
85-10Δ <i>hpaC</i>	<i>hpaC</i> -Deletionsmutante von 85-10; 207 bp kodierend für die Aminosäuren 14-83 von HpaC wurden deletiert	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)

Stamm	Eigenschaften	Referenz
85* Δ <i>hpaC</i>	<i>hpaC</i> -Deletionsmutante von 85*	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
85* Δ <i>hpaA</i>	<i>hpaA</i> -Deletionsmutante von 85*; Deletion von 532 bp führt zu einem Leserasterwechsel nach 70 Codons und zu einem Stoppcodon nach weiteren 15 artifiziellen Codons	(Huguet <i>et al.</i> , 1998)
85-10 Δ <i>hrpG</i>	<i>hrpG</i> -Deletionsmutante von 85-10; 567 bp kodierend für die Aminosäuren 46-234 von HrpG wurden deletiert	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
85-10 Δ <i>hrcL</i>	<i>hrcL</i> -Deletionsmutante von 85-10; 195 bp kodierend für die Aminosäuren 108-172 von HrcL wurden deletiert	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
85* Δ <i>hrcL</i>	<i>hrcL</i> -Deletionsmutante von 85*	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
85*E Δ <i>hrcU</i>	<i>hrcU</i> -Deletionsmutante von 85*	(Weber <i>et al.</i> , 2005)

Rf - Rifampicin; ^r - resistent.

Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pRK2013	TraRK2 ⁺ ; Mob ⁺ ; ColE1-Replicon; Km ^r	(Figurski und Helinski, 1979)
pDSK602	„broad-host-range“-Plasmid; 3 × lacUV5-Promotor; Sm ^r	(Murillo <i>et al.</i> , 1994)
pDSK604	pDSK602-Derivat mit modifiziertem Polylinker	(Escolar <i>et al.</i> , 2001)
pDGW4M	GATEWAY®-kompatibles pDSK602-Derivat mit vierfacher c-Myc-Epitop-kodierender Sequenz; enthält <i>attR</i> -Rekombinationssequenzen; Sm ^r	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
pUC119	ColE1-Replicon; Ap ^r	(Vieira und Messing, 1987)
pC3003	pUC19-Derivat mit dreifacher c-Myc-Epitop-kodierender Sequenz; Ap ^r	J. Kämper
pGEX-2TKM	GST-Expressionsvektor; pGEX-2TK-Derivat mit pDSK602-Polylinker; Ap ^r	(Escolar <i>et al.</i> , 2001)
pGEX-6P-1	GST-Expressionsvektor; Ap ^r	Amersham, Freiburg, Deutschland
pLAFR3	<i>rlxRK2</i> ⁺ ; <i>repRK</i> ⁺ ; <i>lacZa</i> ; <i>incP-I</i> ; Tra ⁻ ; Mob ⁺ ; Tc ^r	(Staskawicz <i>et al.</i> , 1987)
pLAFR6	pLAFR3-Derivat mit Transkriptions-terminatoren, die den Polylinker flankieren; enthält keinen Promotor	(Bonas <i>et al.</i> , 1989)
pENTR/D-TOPO	"ENTRY"-Vektor für GATEWAY®-Klonierungen; enthält <i>attL</i> -Rekombinationssequenzen; Km ^r	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pOK1	<i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i> ; Sm ^r	(Huguet <i>et al.</i> , 1998)
pDMhpaA	pDSK604-Derivat zur Expression von HpaA-c-Myc	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
pDMhpaB	pDSK604-Derivat zur Expression von HpaB-c-Myc	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
pDMhpaC	pDSK604-Derivat zur Expression von HpaC-c-Myc	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
pDMhpaC ₁₋₁₁₈	pDSK604-Derivat zur Expression von HpaC ₁₋₁₁₈ -c-Myc	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008b)
pDMhrpB2	pDSK602-Derivat zur Expression von HrpB2-c-Myc	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008b)

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDMxopC	pDSK604-Derivat zur Expression von XopC-c-Myc	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
pDGW4MxopG	pDGW4M-Derivat zur Expression von XopG-c-Myc	A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlicht
pDGW4MxopH	pDGW4M-Derivat zur Expression von XopH-c-Myc	A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlicht
pGhpaB	pGEX-2TKM-Derivat zur Expression eines N-terminalen GST-Fusionsproteins von HpaB	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
pDSF300	pDSK602-Derivat zur Expression von AvrBs3 mit C-terminalen Flag-Epitop	(Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996)
pL6xopC356	pLAFR6-Derivat zur Expression eines Fusionsproteins zwischen den N-terminalen 200 Aminosäuren von XopC und AvrBs3Δ2 unter Kontrolle des <i>xopC</i> -Promotors	(Noël <i>et al.</i> , 2003)
pL6xopJ356	pLAFR6-Derivat zur Expression eines Fusionsproteins zwischen den N-terminalen 155 Aminosäuren von XopJ und AvrBs3Δ2 unter Kontrolle des <i>xopJ</i> -Promotors	(Noël <i>et al.</i> , 2003)

Km - Kanamycin; Sm - Spectinomycin; Ap - Ampicillin; Tc - Tetracyclin; ^r - resistent.

2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzeninokulation

Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) der nahezu isogenen Linien „Early Californian Wonder“ (ECW), ECW-10R und ECW-30R (Kousik und Ritchie, 1998; Minsavage *et al.*, 1990) wurden wie zuvor beschrieben bei 26°C, einer relativen Luftfeuchte von 60 bis 70% und einer Lichtperiode von 16 h angezogen (Bonas *et al.*, 1991). ECW-10R-Pflanzen tragen das Resistenzgen *Bs1*, ECW-30R-Pflanzen das Resistenzgen *Bs3*.

X. campestris pv. *vesicatoria*-Stämme wurden nach Anzucht auf NYG-Agar-Medium in 1 mM MgCl₂ resuspendiert und in Konzentrationen von 2×10^7 Zellen/ml (OD₆₀₀ = 0,02) bis 4×10^8 Zellen/ml (OD₆₀₀ = 0,4) mit einer nadellosen Spritze in die Unterseite der Paprikablätter inokuliert (Bonas *et al.*, 1991). Nach der Inokulation wurden die Pflanzen in eine Phytokammer (Series 101, Percival Scientific) überführt. Die Bedingungen dort entsprachen einer relativen Luftfeuchte von 80%, einer Temperatur von 28°C bei Tag und 26°C bei Nacht, sowie einer 16-stündigen Lichtperiode. Zur Ausbildung der HR kam es nach ein bis drei Tagen, Krankheitssymptome wurden nach vier bis sieben Tagen dokumentiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter in 70%-igen Ethanol bei 60°C gebleicht. Für *in planta*-Wachstumskurven wurden Bakterien mit einer Konzentration von 10^4 Zellen/ml in Blätter von ECW-Paprikapflanzen inokuliert. Die

Bestimmung des bakteriellen Wachstums erfolgte wie zuvor beschrieben (Bonas *et al.*, 1991). Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

2.3 Generierung von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Mutanten

2.3.1 Generierung von *hrcN*- und *hrcL*-Deletionsmutanten

Zur Generierung einer 1260 bp-Deletion von *hrcN*, welche in der Deletion der Aminosäuren 13 bis 432 von HrcN resultiert, wurden flankierenden Bereiche (jeweils 1 kb) inklusive der ersten 36 und der letzten 33 bp des Gens aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *ApaI/BamHI*-Stellen des Suizidvektors pOK1 kloniert. Das resultierende Konstrukt pOK Δ *hrcN* wurde mittels Konjugation in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85*, 82* und 85* Δ *hpaC* eingeführt. Doppelrekombinationsereignisse resultierten in *hrcN*-Deletionsmutanten, die wie zuvor beschrieben selektiert wurden (Huguet *et al.*, 1998).

Um eine *hrcLhrcN*-Doppeldeletionsmutante zu generieren, wurden flankierende Bereiche (jeweils 1 kb) der benachbarten Gene *hrcL* und *hrcN* inklusive der ersten 45 bp von *hrcL* und der letzten 36 bp von *hrcN* aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *ApaI/BamHI*-Stellen des Suizidvektors pOK1 kloniert. Das resultierende Konstrukt pOK Δ *hrcLN* wurde mittels Konjugation in die Stämme 85-10 und 85* eingeführt und Doppelrekombinationsereignisse resultierten in den Stämmen 85-10 Δ *hrcLN* bzw. 85* Δ *hrcLN*.

2.3.2 Generierung von *hrcU*-Punktmutationen

Zur Einführung der Punktmutation P24T in *hrcU* wurden 1 kb beiderseits des Codons 24 von *hrcU* mittels PCR amplifiziert. Beide PCR-Produkte besitzen 9 bp komplementäre Sequenz, welche die Codons 22 bis 24 umfasst. Die Mutationen des Codons 22 (GAA verändert zu GAG; stille Mutation, die zur Entstehung einer diagnostischen *Eco91I*-Schnittstelle führt) und des Codons 24 (CCG verändert zu ACC; führt zu einem Austausch von Prolin gegen Threonin) wurden durch die Primersequenzen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden *XbaI/Eco91I* bzw. *Eco91I/SalI* verdaut und in die *XbaI/SalI*-Schnittstellen des Suizidvektors pOK1 kloniert. Das resultierende Konstrukt pOK*hrcU*_{P24T} wurde durch Konjugation in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und

85* Δ *hrcLN* eingeführt und Doppelrekombinationsereignisse resultierten in den Stämmen 85**hrcU*_{P24T} und 85**hrcU*_{P24T} Δ *hrcLN*.

Zur Einführung der Punktmutation Y318D in *hrcU* wurden 800 bp beiderseits des Codons 318 von *hrcU* mittels PCR amplifiziert. Beide PCR-Produkte besitzen 9 bp komplementäre Sequenz, welche die Codons 317 bis 319 umfasst. Die Mutationen des Codons 317 (CTG verändert zu CTT; stille Mutation, die zur Entstehung einer diagnostischen *BclI*-Schnittstelle führt) und des Codons 318 (TAT verändert zu GAT; führt zu einem Austausch von Tyrosin gegen Aspartat) wurden durch die Primersequenzen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden *XbaI/BclI* bzw. *BclI/SalI* verdaut und in die *XbaI/SalI*-Schnittstellen des Suizidvektors pOK1 kloniert. Das resultierende Konstrukt pOK*hrcU*_{Y318D} wurde durch Konjugation in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *hpaC*, 85* sowie 85* Δ *hpaC* eingeführt und Doppelrekombinationsereignisse resultierten in den Stämmen 85-10*hrcU*_{Y318D}, 85-10 *hrcU*_{Y318} Δ *hpaC*, 85**hrcU*_{Y318} bzw. 85* *hrcU*_{Y318} Δ *hpaC*.

Zur Einführung der Punktmutation P265G in *hrcU* wurden 750 bp beiderseits des Codons 265 von *hrcU* aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert. Beide PCR-Produkte besitzen 9 bp komplementäre Sequenz, welche die Codons 265 bis 267 umfasst. Die Mutation des Codons 265 (CCG verändert zu GGT; führt zu einem Austausch von Prolin gegen Glycin und zur Entstehung einer diagnostischen *KpnI*-Schnittstelle) wurde durch die Primersequenzen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden *XbaI/KpnI* bzw. *KpnI/BamHI* verdaut und in die *XbaI/BamHI*-Schnittstellen des Suizidvektors pOK1 kloniert. Das resultierende Konstrukt pOK*hrcU*_{P265G} wurde durch Konjugation in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 und 85* eingeführt. Doppelrekombinationsereignisse resultierten in den Stämmen 85-10*hrcU*_{P265G} und 85**hrcU*_{P265G}.

2.4 Generierung von Expressionskonstrukten

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Expressionskonstrukte sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3: Generierte Expressionskonstrukte.

Plasmid	Vektor	kodiertes Protein
pDStrephrcN	pDSK604	Strep-HrcN
pDStrephrcN _{G175C}	pDSK604	Strep-HrcN _{G175C}
pDhrcN	pDSK604	HrcN
pDhrcLN	pDSK602	HrcL und HrcN
pDMhrcL	pDSK602	HrcL-c-Myc
pDMhrcN _{G175C}	pDSK602	HrcN _{G175C} -c-Myc
pDMhpaA ₁₋₂₂₅	pDSK602	HpaA ₁₋₂₂₅ -c-Myc
pDMxopF1	pDSK602	XopF1-c-Myc
pDGW4MhrcU	pDGW4M	HrcU-c-Myc
pDGW4MhrcU _{Y318D}	pDGW4M	HrcU _{Y318D} -c-Myc
pDGW4MhrcU _{P265G}	pDGW4M	HrcU _{P265G} -c-Myc
pGhrcU	pGEX-2TKM	GST-HrcU
pGhrcU ₂₅₅₋₃₅₇	pGEX-2TKM	GST-HrcU ₂₅₅₋₃₅₇
pGhrcU _{255-357/Y318D}	pGEX-2TKM	GST-HrcU _{255-357/Y318D}
pGhrcN	pGEX-2TKM	GST-HrcN
pGhpaA	pGEX-2TKM	GST-HpaA
pGhpaA ₁₋₂₀₀	pGEX-2TKM	GST-HpaA ₁₋₂₀₀
pGhpaA ₂₂₅₋₂₇₅	pGEX-2TKM	GST-HpaA ₂₂₅₋₂₇₅
pGMhrcU	pGEX-6P-1	GST-HrcU-c-Myc

2.4.1 Generierung von *hrcU*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung eines C-terminal c-Myc-Epitop-markierten HrcU-Derivates wurde *hrcU* ohne Stoppcodon aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und entsprechend den Herstellerangaben in pENTR/D-TOPO eingefügt und mittels GATEWAY[®]-Technologie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in den Vektor pDGW4M vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz rekombiniert. Auf ähnliche Weise wurden HrcU_{P265G}-c-Myc und HrcU_{Y318D}-c-Myc generiert, wobei die PCR-Amplifizierung der korrespondierenden *hrcU*-Derivate aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 *hrcU*_{P265G} bzw. 85-10 *hrcU*_{Y318D} erfolgte.

Zur Generierung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionen von HrcU bzw. HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurde *hrcU* bzw. ein entsprechendes *hrcU*-Genfragment aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstellen von pGEX-2TKM kloniert, woraus pGhrcU und pGhrcU₂₅₅₋₃₅₇ resultierten. Auf ähnliche Weise wurde eine GST-Fusion von HrcU_{255-357/Y318D} erstellt, wobei die PCR-Amplifizierung des entsprechenden *hrcU*-Genfragmentes aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 *hrcU*_{Y318D} erfolgte.

Um GST-HrcU-c-Myc zu generieren, wurde *hrcU* ohne Stoppcodon aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SalI*-Schnittstellen vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz des Vektors pC3003 kloniert. *hrcU-c-myc* wurde in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen des GST-Expressionsvektors pGEX-6P-1 ligiert, wodurch pGMhrcU generiert wurde.

2.4.2 Generierung von *hrcL*- und *hrcN*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung eines Konstruktes zur Expression von *hrcL* und *hrcN* wurde ein genomisches Fragment, welches beide Gene umfasst, aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen von pDSK604 ligiert, wodurch pDhrcLN generiert wurde.

Zur Generierung eines Konstruktes zur Expression von HrcN wurde *hrcN* aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen von pDSK604 kloniert, wodurch pDhrcN generiert wurde.

Zur Generierung eines C-terminal c-Myc-Epitop-markierten HrcL-Derivates wurde *hrcL* ohne Stoppcodon aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz von pC3003 kloniert. *hrcL-c-myc* wurde in die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen von pDSK602 ligiert, wodurch pDMhrcL generiert wurde.

Zur Generierung eines N-terminal Strep-Epitop-markierten HrcN-Derivates wurde *hrcN* aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen von pDSK604 kloniert, woraus pDStrepHrcN resultierte. Die Strep-Epitop-kodierende Sequenz wurde durch den Vorwärtsprimer hinzugefügt. Zur Generierung eines *Strep-hrcN*_{G175C}-exprimierenden Konstruktes wurde eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 175 von HrcN von Glycin nach Cystein führt, durch eine gerichtete Mutagenese eingeführt. Dazu wurde ein

entsprechendes *hrcN*-Fragment, welches die Codons 170 bis 443 umfasst, per PCR amplifiziert und gegen das PstI/SacI-Fragment von pDStrephrcN ausgetauscht, wodurch pDStrephrcN_{G175C} generiert wurde.

Zur Generierung eines C-terminal c-Myc-Epitop-markierten HrcN_{G175C}-Derivates wurde *hrcN_{G175C}* vom Konstrukt pDStrephrcN_{G175C} mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz von pC3003 kloniert. *hrcN_{G175C}-c-myc* wurde in die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen von pDSK602 ligiert, wodurch pDMhrcN_{G175C} generiert wurde.

Zur Generierung eines GST-Fusionsproteins von HrcN wurde *hrcN* aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstellen von pGEX-2TKM kloniert, woraus pGhrcN resultierte.

2.4.3 Generierung von *hpaA*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung von GST-Fusionsproteinen von HpaA bzw. den Deletionsderivaten HpaA₁₋₂₀₀ und HpaA₂₂₅₋₂₇₅ wurde *hpaA* bzw. entsprechende Genfragmente aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstellen von pGEX-2TKM kloniert, woraus pGhpaA, pGhpaA₁₋₂₀₀ und pGhpaA₂₂₅₋₂₇₅ resultierten.

Zur Generierung eines C-terminal c-Myc-Epitop-markierten HpaA-Deletionsderivates HpaA₁₋₂₂₅ wurde ein entsprechendes *hpaA*-Genfragment aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz von pC3003 kloniert. *hpaA₁₋₂₂₅-c-myc* wurde in die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen von pDSK602 ligiert, wodurch pDMhpaA₁₋₂₂₅ generiert wurde.

2.4.4 Generierung eines *xopF1*-Expressionskonstruktes

Zur Generierung eines *xopF1-c-myc*-Expressionskonstruktes wurde *xopF1* ohne Stoppcodon aus dem *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/SacI*-Schnittstellen vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz von pC3003 kloniert. *xopF1-c-myc* wurde in die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen von pDSK602 ligiert, wodurch pDMxopF1 generiert wurde.

2.5 Sekretionsexperimente und Proteinanalysen

Für *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde *X. campestris* pv. *vesicatoria* wie zuvor beschrieben (Büttner *et al.*, 2002) in Sekretionsmedium (Minimalmedium A, ergänzt mit 50 µg/ml BSA [New England Biolabs, Beverly, USA] und 10 µg/ml Thiamin, pH 5,3) inkubiert. Die Trennung der Zellen vom Kulturüberstand erfolgte mittels Filtration durch einen proteindurchlässigen Filter (0,45 µm HT Tuffryn[®]-Membran; Acrodisc[®] 25 mm Syringe Filter, Pall GmbH, Dreieich). Gesamtzellextrakte wurden zehnfach konzentriert. Kulturüberstände wurden mittels Trichloressigsäurefällung einhundertfach konzentriert. In Sekretionsexperimenten mit dem Protonophor CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon; Sigma, Steinheim, Deutschland) wurde CCCP frisch in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in den angegebenen Konzentrationen den Kulturen zugesetzt. Um Nebeneffekte von DMSO auszuschließen, wurden den nicht mit CCCP behandelten Kontrollkulturen ebenfalls DMSO zugegeben.

Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot (Sambrook *et al.*, 1989) mit spezifischen Antikörpern analysiert (Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	eingesetzte Verdünnung	Antikörper-Spezifität	Referenz bzw. Hersteller
<i>polyklonale Antikörper</i>			
Anti-HrpF	1:3000	Kaninchen-IgG	(Büttner <i>et al.</i> , 2002)
Anti-XopA	1:1000	Kaninchen-IgG	(Noël <i>et al.</i> , 2001)
Anti-AvrBs3	1:3000	Kaninchen-IgG	(Knoop <i>et al.</i> , 1991)
Anti-HrpB2	1:3000	Kaninchen-IgG	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
Anti-HrpE	1:500	Kaninchen-IgG	(Weber <i>et al.</i> , 2005)
Anti-HrcN	1:500	Kaninchen-IgG	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
Anti-HpaA	1:1000	Kaninchen-IgG	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
<i>monoklonale Antikörper</i>			
Anti-c-Myc	1:10000	Maus-IgG	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-Strep	1:800	Maus-IgG	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Anti-GST	1:10000	Ziegen-IgG	Amersham, Freiburg, Deutschland

IgG - Immunglobulin G

Als Sekundärantikörper wurden Meerrettich-Peroxidase-Konjugate von Anti-Kaninchen-, Anti-Maus- (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bzw. Anti-Ziegen-

(Sigma, Steinheim, Deutschland) Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Antikörperreaktionen wurden durch Chemilumineszenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) visualisiert.

2.6 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

2.6.1 GST-„pull-down“-Analysen

Die GST (Glutathion-S-Transferase)-„pull-down“-Analyse ist eine *in vitro*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen und wurde wie in Büttner *et al.* beschrieben, durchgeführt (Büttner *et al.*, 2006). Bakterielle Pellets von 50 ml *E. coli*-Kulturen wurden in 3 ml PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels der „French Pressure Cell Press“ (SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 800 psi in einer kleinen Zelle (20K, Thermo Electro Corporation). Zur Erhöhung der Effizienz wurde das Aufschlussverfahren zwei- bis dreimal wiederholt. Zellbruchstücke und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt. In der Regel wurden jeweils 600 µl Lysat eingesetzt. Dieses Volumen wurde in Abhängigkeit von der Proteinstabilität und der Expressionsstärke angepasst. GST oder GST-Fusionsproteine enthaltende *E. coli*-Lysate wurden für 30-60 min bei Raumtemperatur mit 40 µl Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) unter Schütteln inkubiert. Dabei erfolgte eine Bindung der Fusionsproteine über die GST-Domäne an Glutathion, das an die Sepharose-Matrix gebunden ist. Ungebundene Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurde ein zweites *E. coli*-Lysat, welches den möglichen Interaktor mit einer c-Myc- oder Strep-Epitopmarkierung enthielt, hinzugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler wurden ungebundene Proteine durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit 40 µl Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln eluiert. 5 µl Lysat und 20 µl Eluat wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung von GST- und c-Myc- bzw. Strep-spezifischen Antikörpern analysiert.

2.6.2. Strep-„pull-down“-Analysen

Für Strep-„pull-down“-Analyse wurden bakterielle Pellets von 50 ml Kulturen in 3 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte wie beschrieben (siehe Kapitel 2.6.1.) mit der „French Pressure Cell Press“. In der Regel wurden jeweils 600 µl Lysat eingesetzt. Dieses Volumen wurde in Abhängigkeit von der Proteinstabilität und der Expressionsstärke angepasst. Ein *E. coli*-Lysat, welches ein mit einem Strep-Epitop versehenes Protein enthielt, wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur mit 40 µl Strep-Tactin[®]-Sephrose (IBA GmbH, Göttingen) unter Schütteln inkubiert. Durch die starke Affinität des Strep-Epitops zu Strep-Tactin[®], einem technisch modifizierten Streptavidin, erfolgt eine Bindung an die Sepharose-Matrix. Ungebundene Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit Puffer W entfernt. Die Matrix wurde anschließend mit einem zweiten *E. coli*-Lysat, welches den möglichen Interaktor mit einer c-Myc-Epitopmarkierung enthielt, für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit Puffer W entfernt. Die Elution erfolgte durch Inkubation mit 40 µl Puffer E (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM Desthiobiotin) bei 4 °C über Nacht. 5 µl Lysat und 20 µl Eluat wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung von Strep- und c-Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

2.6.3. Koimmunpräzipitation

Für Koimmunpräzipitationsexperimente wurde *X. campestris* pv. *vesicatoria* in NYG-Medium bzw. Minimalmedium A (pH 7,0) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 bis 0,9 angezogen. Zellen von 50 ml Kulturen wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 3 ml IP-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin; 5 mM DTT; 0,15% [v/v] Nonidet-P40) resuspendiert und mittels „French Pressure Cell Press“ (siehe Kapitel 2.6.1) aufgeschlossen. Zur Immunpräzipitation wurde 1ml Lysat über Nacht bei 4°C über Kopf rotierend mit 2 µl von c-Myc- bzw. HrcN-spezifischen Antikörpern und 25 µl Protein G-Agarose (Roche, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Die Protein G-Agarose-Matrix wurde viermal mit 1 ml IP-Puffer gewaschen und in 40 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. 5 µl Lysat und 20 µl Immunpräzipitat wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung von c-Myc-, HrcN- bzw. HpaA-spezifischen Antikörpern analysiert. Um die Detektion der leichten und schweren Kette des immunpräzipitierenden

Antikörpers zu vermeiden, wurde „TrueBlot“-ImmunglobulinG (eBioscience, San Diego, USA) als Sekundärantikörper benutzt.

2.7 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mittels Strep-Tactin®-Sephrose gereinigt (siehe Kapitel 2.6.2). Immobilisierte Proteine wurden durch Inkubation mit 40 µl Puffer E für 2 h eluiert. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte durch Malachitgrün-Phosphatase-Analysen (BioAssay Systems, Hayward, USA). Ein 900 µl-Reaktionsansatz, bestehend aus 9 µg gereinigtem Strep-HrcN bzw. Strep-HrcN_{G175C} und 25 µl 100 mM ATP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in Puffer W wurde bei 37°C für 30 min entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Nach 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min wurden dem Reaktionsansatz 100 µl entnommen, zu 700 µl Puffer W und 200 µl Malachitgrün-Reagenz gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung wurde mit 34%-iger Zitronensäure gestoppt und die Absorption bei 650 nm gemessen. Es wurden jeweils Werte von 3 parallelen Ansätzen bestimmt. Die Menge an freigesetztem Phosphat wurde durch Vergleich zu einer nach Herstellerangaben angefertigten Phosphat-Standardkurve berechnet.

2.8 Effektorprotein-Freisetzungstudien

Versuche zur Freisetzung des Effektorproteins XopF1 vom T3S-Chaperon HpaB durch HrcN wurden nach einem modifizierten Protokoll von Akeda *et al.* durchgeführt (Akeda und Galan, 2005). GST-HpaB wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, an Glutathion-Sephrose immobilisiert (siehe Kapitel 2.6.1) und für 1 h mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches XopF1-c-Myc enthielt. Die Sepharose-Matrix wurde viermal mit PBS gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen, und mit 1 µg gereinigten, in Puffer W gelösten Strep-HrcN oder Strep-HrcN_{G175C} sowie 150 µM ATP (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bzw. ATP γ S (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die im Überstand befindlichen, freigesetzten Proteine mit Trichloressigsäure gefällt und in 20 µl Laemmli-Puffer resuspendiert. 20 µl gebundene und

20 µl gefällte, freigesetzte Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Dieselbe Membran wurde jeweils zuerst mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper und anschließend mit einem GST-spezifischen Antikörper inkubiert.

2.9 RNA-Analysen

Für Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)-Analysen wurden die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und 85* Δ *hrcL* in NYG-Medium angezogen. Die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese erfolgte wie zuvor beschrieben (Noël *et al.*, 2001). *hrcN*- und *hrpB2*-Transkripte wurden mit Gen-spezifischen Primern (siehe Anhang 1) amplifiziert. Die Zyklusanzahl der PCR wurde jeweils so gewählt, dass die Reaktion im linearen Amplifizierungsbereich endete.

2.10 Subzelluläre Lokalisierungsstudien

Zur subzellulären Lokalisierung von Proteinen wurden *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme in Minimalmedium A bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 bis 0,9 angezogen. Zellen von 50 ml Kulturen wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 3 ml 10 mM HEPES (4-(2-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) resuspendiert und mittels „French Pressure Cell Press“ (siehe Kapitel 2.6.1) aufgeschlossen. 1 ml Lysat wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckman OptimaTM TL) bei 200.000 g für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Die Angleichung der Proteinmengen erfolgte entsprechend der gemessenen optischen Dichte des Lysates. Das Pellet, welches die Membranfraktion darstellt, wurde in 1 ml 10 mM HEPES resuspendiert. Der Überstand entspricht der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion. 20 µl Lysat, Membranfraktion und lösliche Fraktion wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Das T3S-Chaperon HpaB interagiert mit dem Kontrollprotein HpaA und der mutmaßlichen ATPase HrcN

3.1.1 HpaB interagiert mit dem Kontrollprotein HpaA *in vivo*

Durch die Analyse nicht-polarer Mutationen im *hrpD*-Operon des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurde HpaA als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor identifiziert, der zur Ausbildung von Krankheitssymptomen und der HR in suszeptiblen bzw. resistenten Paprikapflanzen beiträgt (Huguet *et al.*, 1998). HpaA wird Typ III-abhängig sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert und fördert die Typ III-abhängige Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). In vorangegangenen Arbeiten wurde durch *in vitro*-Interaktionsstudien gezeigt, dass HpaA mit dem T3S-Chaperon HpaB interagiert (Lorenz, 2005).

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen HpaA und HpaB *in vivo*, und zwar mittels Koimmunpräzipitationsanalysen im *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85*, analysiert werden. Der Stamm 85* ist ein Derivat des Wildtyp-Stammes 85-10, in dem eine mutierte Version des regulatorischen Gens *hrpG* vorliegt (*hrpG**), die zu einer konstitutiven Expression des T3S-Systems führt und somit die Analyse von Hrp-Proteinen in normalerweise nicht-induzierenden Medien ermöglicht. Der *hrpG**-Stamm ist damit auch eine Voraussetzung für die *in vitro*-Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion (Rossier *et al.*, 1999). Das *in planta*-Wachstum von *hrpG**-Stämmen ist jedoch wie beim Wildtyp (Wengelnik *et al.*, 1999). *In vivo*-Interaktionen zwischen T3S-assoziierten Proteinen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurden bisher noch nicht untersucht.

Für Koimmunpräzipitationsanalysen wurde HpaB mangels HpaB-spezifischer Antikörper mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop vom Plasmid pDMhpaB (Büttner *et al.*, 2004) im *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85* exprimiert und die Bakterien in NYG-Vollmedium angezogen. Das T3S-System ist unter diesen experimentellen Bedingungen aber nicht aktiv. Nach Lyse der Bakterien wurde HpaB-c-Myc mit Hilfe eines an Protein G-Agarose

gekoppelten c-Myc-spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. Western-Blot-Analysen mit c-Myc- und HpaA-spezifischen Antikörpern zeigten die Anwesenheit von HpaA im Präzipitat von HpaB-c-Myc (Abb. 3-1 A). In Abwesenheit des c-Myc-Antikörpers konnte weder HpaB-c-Myc noch HpaA detektiert werden (Abb. 3-1 A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HpaA und HpaB im bakteriellen Cytoplasma in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorliegen, unabhängig von der Aktivität des T3S-Systems.

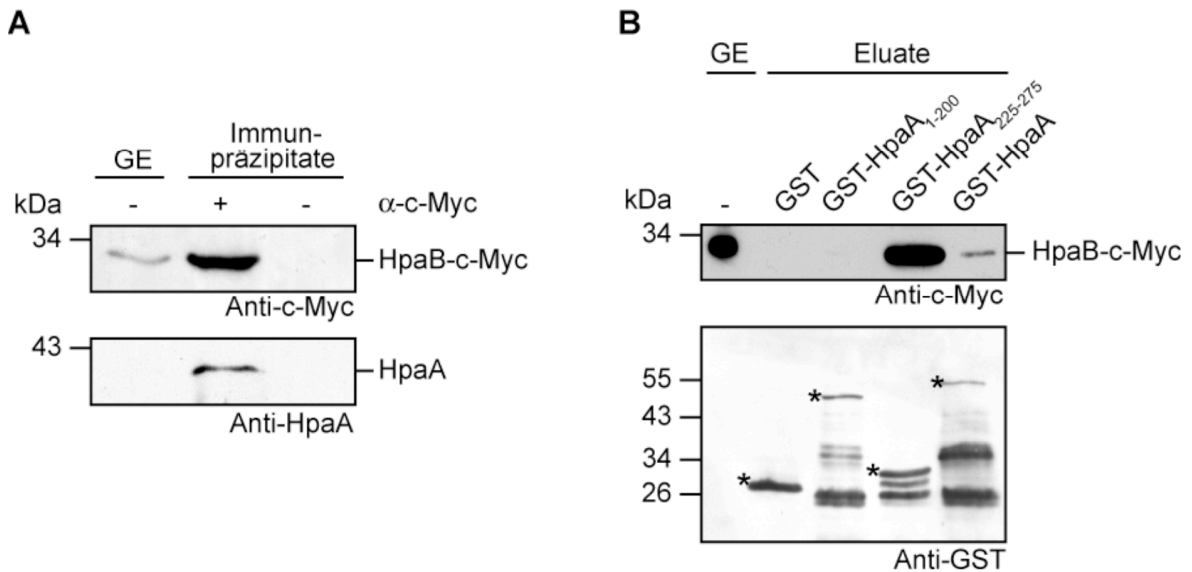


Abb. 3-1: Die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA enthalten eine HpaB-Bindestelle. (A) HpaA interagiert mit dem T3S-Chaperon HpaB *in vivo*. Stamm 85*, welcher HpaB-c-Myc ektopisch exprimierte, wurde in NYG-Medium angezogen. Bakterielle Lysate wurden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) eines c-Myc-spezifischen Antikörpers (α -c-Myc) mit Protein G-Agarose inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Immunpräzipitate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und HpaA-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Aufgrund der geringen Sensitivität der HpaA-spezifischen Antikörper ist HpaA im Gesamtzellextrakt nicht detektierbar. (B) Die HpaB-Bindestelle ist in den C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA lokalisiert. GST, GST-HpaA, GST-HpaA₁₋₂₀₀ und GST-HpaA₂₂₅₋₂₇₅ wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaB-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und vollständige GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar.

In weiteren Experimenten sollte die HpaB-Bindestelle in HpaA lokalisiert werden. Hierzu wurden Konstrukte zur Expression von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen des vollständigen HpaA, und von N- und C-terminalen Deletionsderivaten von HpaA generiert (pGhpaA, pGhpaA₂₂₅₋₂₇₅ und pGhpaA₁₋₂₀₀; siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.3). Die korrespondierenden Proteine wurden in GST-„pull-down“-Analysen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.1) auf die Interaktion mit HpaB getestet. GST-HpaA

(vollständiges HpaA-Protein, 275 Aminosäuren), GST-HpaA₂₂₅₋₂₇₅ bzw. GST-HpaA₁₋₂₀₀ wurden in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welche HpaB-c-Myc enthielt. Die Analyse der eluierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern zeigte, dass HpaB-c-Myc im Eluat von GST-HpaA und GST-HpaA₂₂₅₋₂₇₅, nicht aber von GST-HpaA₁₋₂₀₀ detektiert wurde (Abb. 3-1 B). Dies deutet darauf hin, dass die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA eine Bindestelle für HpaB enthalten. Im Eluat von GST-HpaA₂₂₅₋₂₇₅ war deutlich mehr HpaB-c-Myc enthalten als im Eluat von GST-HpaA (Abb. 3-1 B). Dies könnte auf Unterschiede in der Proteinkonformation zurückzuführen sein, welche die Interaktion zwischen HpaB-c-Myc und GST-HpaA₂₂₅₋₂₇₅ begünstigen.

Um die Bedeutung der C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA für die Proteinfunktion zu untersuchen, wurde das Konstrukt pDMhpaA₁₋₂₂₅ (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.3) zur Expression von HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc (HpaA-Deletionsderivat ohne die 50 C-terminalen Aminosäuren) generiert und auf die Fähigkeit untersucht, den Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante 85* Δ *hpaA* zu komplementieren. Für phänotypische Analysen wurden die Stämme 85* und 85* Δ *hpaA* in suszeptible „Early Californian Wonder“ (ECW)- und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen inokuliert. ECW-10R-Pflanzen tragen das Resistenzgen *Bs1* und erkennen das Effektorprotein AvrBs1, welches vom Stamm 85-10 transloziert wird (Minsavage *et al.*, 1990). Während der Stamm 85* erwartungsgemäß Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen und die HR in resistenten Pflanzen induzierte, löste der Stamm 85* Δ *hpaA* keine makroskopischen Reaktionen aus (Abb. 3-2 A). Der Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante konnte durch die ektopische Expression von HpaA-c-Myc vom Plasmid pDMhpaA (Lorenz *et al.*, 2008a), nicht aber von HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc komplementiert werden (Abb. 3-2 A). Für *in vitro*-Sekretionsanalysen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5) wurden die Stämme 85* und 85* Δ *hpaA* in T3S-induzierendem Medium (Minimalmedium A; pH 5,3) inkubiert und Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das Translokonprotein HrpF analysiert. HrpF war erwartungsgemäß im Kulturüberstand des Stammes 85*, nicht aber des Stammes 85* Δ *hpaA* nachweisbar (Abb. 3-2 B). HpaA-c-Myc, nicht aber HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc, konnte die HrpF-Sekretionsdefizienz des Stammes 85* Δ *hpaA* aufheben (Abb. 3-2 B). Die fehlende Komplementation durch HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc ist nicht auf Proteininstabilität zurückzuführen, wie die Abb. 3-2 C zeigt. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die C-terminalen 50

Aminosäuren von HpaA eine HpaB-Bindestelle enthalten und essentiell für den Beitrag von HpaA zur Typ III-abhängigen Sekretion und Pathogenität sind. Die Lokalisierung der HpaB-Bindestelle im C-terminalen Bereich von HpaA ist ungewöhnlich, da sich die bisher publizierten Chaperon-Bindedomänen im N-terminalen bzw. zentralen Bereich von T3S-Substraten befanden (Boyd *et al.*, 2000; Büttner *et al.*, 2004; Lloyd *et al.*, 2001a; Parsot *et al.*, 2003).

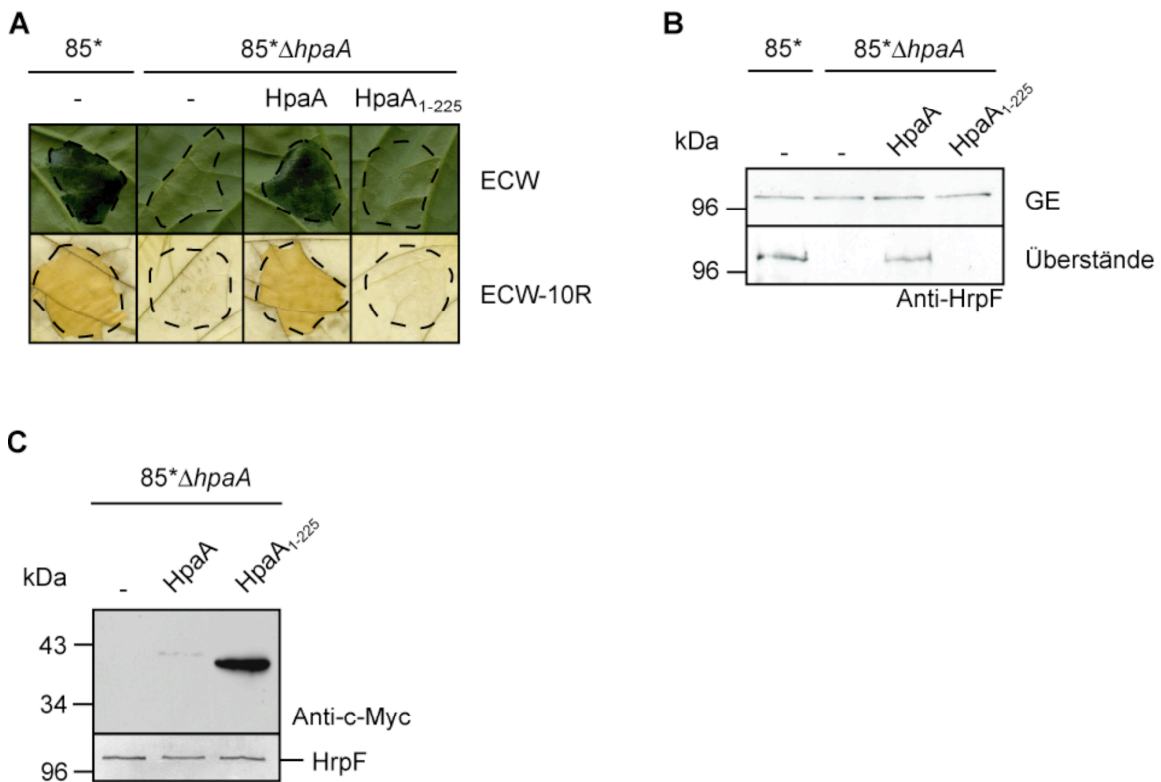


Abb. 3-2: Die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA sind für die Proteinfunktion essentiell. (A) Das C-terminale Deletionsderivat HpaA₁₋₂₂₅ kann den Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante nicht komplementieren. Die Stämme 85* und 85*Δ*hpaA*, welche HpaA-c-Myc (HpaA) oder HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc (HpaA₁₋₂₂₅) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in suszeptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 5 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. **(B)** HpaA₁₋₂₂₅ kann die Sekretionsdefizienz der *hpaA*-Deletionsmutante nicht komplementieren. Für *in vitro*-Sekretionsanalysen wurden die Stämme 85* und 85*Δ*hpaA*, welche HpaA-c-Myc (HpaA) oder HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc (HpaA₁₋₂₂₅) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), in Sekretionsmedium inkubiert und Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. **(C)** HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc wird stabil exprimiert. Der Stamm 85*Δ*hpaA*, welcher HpaA-c-Myc (HpaA) oder HpaA₁₋₂₂₅-c-Myc (HpaA₁₋₂₂₅) ektopisch exprimierte bzw. den Vektor enthielt (-), wurde in Minimalmedium A angezogen. Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit HrpF-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

3.1.2 HpaB interagiert mit der mutmaßlichen ATPase HrcN

Das T3S-Chaperon HpaB interagiert mit mehreren Effektorproteinen (Büttner *et al.*, 2004) und führt diese vermutlich an den T3S-Apparat heran, wobei das konservierte Innermembranprotein HrcV des T3S-Systems als Andockstelle dienen könnte (Büttner *et al.*, 2006). Eine Bindung von HpaB an HrcV konnte kürzlich gezeigt werden (Büttner *et al.*, 2006). Hier sollte in Protein-Protein-Interaktionsstudien untersucht werden, ob HpaB an weitere Komponenten des T3S-Apparates, z.B. HrcN, eine mutmaßliche ATPase, binden kann. Hierzu wurden die Konstrukte pGhrcN und pDStrephrcN zur Expression von GST-HrcN bzw. HrcN mit N-terminalen Strep-Epitop generiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.2). Für GST-„pull-down“-Analysen wurde GST-HrcN in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaB-c-Myc enthielt. Die Analyse der eluierten Proteine zeigte, dass HpaB-c-Myc im Eluat von GST-HrcN nachweisbar war (Abb. 3-3 A). Die Interaktion zwischen HpaB und HrcN wurde zusätzlich in Strep-„pull-down“-Analysen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.2) untersucht. Hierfür wurde Strep-HrcN, welches funktional in *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist (siehe Kapitel 3.2.1) in *E. coli* exprimiert, an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaB-c-Myc enthielt. Wie Abb. 3-3 B zeigt, war HpaB-c-Myc im Eluat von Strep-HrcN nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das T3S-Chaperon HpaB mit HrcN interagiert. Die biochemische Funktion von HrcN bei der Typ III-abhängigen Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist bislang unbekannt. Die Interaktion von HrcN und HpaB deutet auf eine mögliche Beteiligung von HrcN an der Erkennung von HpaB-Effektorprotein-Komplexen hin. Im Folgenden sollte daher HrcN funktionell näher charakterisiert werden.

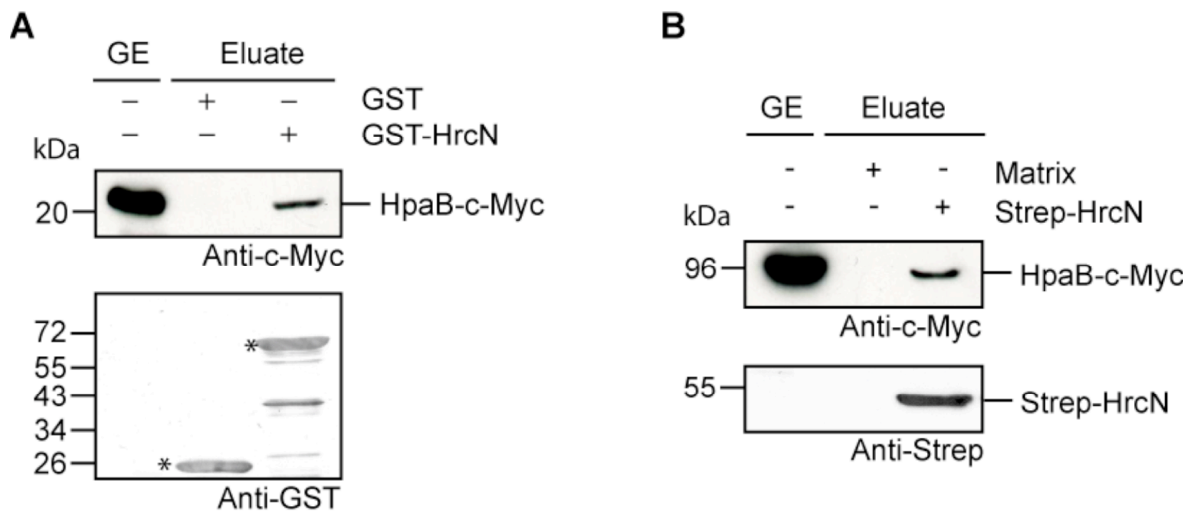


Abb. 3-3: HpaB interagiert mit HrcN. (A) GST-„pull-down“-Analysen mit HrcN. GST und GST-HrcN wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaB-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und das vollständige GST-Fusionsprotein sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. (B) Strep-„pull-down“-Analysen mit HrcN. Strep-HrcN wurde an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaB-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit Strep-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

3.2 Funktionelle Charakterisierung der ATPase HrcN und des möglichen regulatorischen Proteins HrcL

3.2.1 *hrcN* ist essentiell für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

HrcN wird vom sechsten Gen des *hrpB*-Operons des *hrp*-Genclusters kodiert und zeigt Aminosäuresequenzähnlichkeiten zur β -Untereinheit von F_0F_1 -ATPasen (Fenselau *et al.*, 1992; Rossier *et al.*, 2000). HrcN und homologe Proteine enthalten eine Phosphat-Bindedomäne (P-Loop; Konsensus-Sequenz G/AxxxxGKT/S), welche als Walker-Box A bezeichnet wird und an der ATP-Bindung beteiligt ist (Abb. 3-4 A) (Walker *et al.*, 1982; Zarivach *et al.*, 2007). HrcN weist außerdem das weniger konservierte Walker-Box-B-Motiv auf, welches in vielen ATP-bindenden Proteinen vorhanden ist (Abb. 3-4 A) (Walker *et al.*, 1982).

Um die Bedeutung von HrcN für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* zu untersuchen, wurden die Codons 13 bis 432 von *hrcN* aus dem Genom des Wildtyp-Stammes 85-10 deletiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.1) und die Stämme 85-10 und die *hrcN*-Deletionsmutante 85-10 Δ *hrcN* in suszeptible und resistente Paprikapflanzen inokuliert. Im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm 85-10 führte die Inokulation von 85-10 Δ *hrcN* nicht zur Ausbildung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen ECW-Pflanzen bzw. zur Induktion der HR in den resistenten ECW-10R-Pflanzen (Abb. 3-4 B). Der Phänotyp der *hrcN*-Mutante konnte durch ektopische Expression von HrcN (Plasmid pDhrcN, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.2) bzw. Strep-HrcN komplementiert werden und ist daher spezifisch auf die Deletion von *hrcN* zurückzuführen (Abb. 3-4 B).

Weiterhin wurde die Fähigkeit der *hrcN*-Deletionsmutante untersucht, sich in suszeptiblen ECW-Paprikapflanzen zu vermehren. Wie die Abb. 3-4 C zeigt, war das *in planta*-Wachstum des Stammes 85-10 Δ *hrcN* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm 85-10 drastisch reduziert, vergleichbar mit dem T3S-defizienten Stamm 85-10 Δ *hrpG*, in dem die Expression der *hrp*-Gene aufgrund der Abwesenheit des Transkriptionsaktivators HrpG nicht induziert werden kann (Wengelnik *et al.*, 1999).

Eine Walker-Box-A-Punktmutante von HrcN ist nicht funktional

Um zu untersuchen, ob das Walker-Box-A-Motiv von HrcN essentiell für die Proteinfunktion ist, wurde das *hrcN*-Codon 175 vom Plasmid pDStrephrcN so mutiert, dass der konservierte Glycinrest durch einen Cysteinrest ersetzt wurde (siehe Abb. 3-4 A und Material und Methoden, Kapitel 2.4.2). Das resultierende HrcN-Derivat Strep-HrcN_{G175C} konnte bei ektopischer Expression vom Plasmid pDStrephrcN_{G175C} im Stamm 85-10 Δ *hrcN* den Phänotyp der *hrcN*-Mutante nicht komplementieren (Abb. 3-4 B). Dies kann nicht auf Proteininstabilität zurückzuführen sein, da Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} etwa gleich stark exprimiert wurden (Abb. 3-4 D).

hrcN ist essentiell für die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation

Als nächstes wurde der Einfluss von HrcN auf die Typ III-abhängige Sekretion analysiert. Hierfür wurden *in vitro*-Sekretionsanalysen mit den Stämmen 85* und 85* Δ *hrcN* durchgeführt und Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die möglichen Translokationproteine HrpF

und XopA, das Pilusprotein HrpE, den Pathogenitätsfaktor HrpB2 und das Effektorprotein AvrBs3 untersucht. Die Analyse der Sekretion des Effektorproteins AvrBs3 erfolgte in den Stämmen 82* und 82* Δ *hrcN*, Derivate des Wildtyp-Stammes 82-8, die *avrBs3* von einem endogenen Plasmid exprimieren. Alle getesteten Proteine wurden erwartungsgemäß vom jeweiligen Wildtyp-Stamm sekretiert, waren aber nicht im Kulturüberstand der *hrcN*-Deletionsmutanten detektierbar (Abb. 3-4 D). Die Sekretionsdefizienz konnte durch die ektopische Expression von Strep-HrcN, nicht aber von Strep-HrcN_{G175C} komplementiert werden (Abb. 3-4 D).

Zusätzlich zur *in vitro*-Sekretion wurde auch der Beitrag von HrcN zur *in vivo*-Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC untersucht. Der Nachweis der Typ III-abhängigen Proteintranslokation erfolgte unter Verwendung des AvrBs3 Δ 2-Reporterproteins. Dabei handelt es sich um ein Derivat des Effektorproteins AvrBs3, welches in den Aminosäuren 2-152 und damit im T3S-Signal deletiert ist. AvrBs3 Δ 2 ist aber in der Lage, die HR in AvrBs3-responsiven ECW-30R Paprikapflanzen zu induzieren, wenn es *in planta* exprimiert oder als Fusionsprotein mit einem funktionalen T3S-Signal von *X. campestris* pv. *vesicatoria* transloziert wird (Szurek *et al.*, 2002). Da diese Reporter-basierte Methode sensitiver als *in vitro*-Sekretionsanalysen ist, kann die Translokation auch von solchen Proteinen detektiert werden, welche in *in vitro*-Kulturüberständen nicht nachweisbar sind (Büttner *et al.*, 2006). Fusionsproteine zwischen N-terminalen Bereichen von XopJ bzw. XopC, welche ein funktionales T3S-Signal enthalten, und dem Reporter AvrBs3 Δ 2 wurden vom Plasmid pL6xopJ356 bzw. pL6xopJ356 (Noël *et al.*, 2003) exprimiert und induzierten erwartungsgemäß die HR in ECW-30R-Pflanzen, wenn sie vom Stamm 85-10 transloziert wurden (Abb. 3-4 E). Keine HR-Induktion wurde dagegen mit der *hrcN*-Deletionsmutante beobachtet (Abb. 3-4 E). Die Translokationsdefizienz der Mutante konnte durch ektopische Expression von Strep-HrcN, nicht aber von Strep-HrcN_{G175C}, komplementiert werden (Abb. 3-4 E). Zusammenfassend deuten diese Experimente darauf hin, dass HrcN für die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation essentiell ist und dass die Funktion von HrcN vom konservierten Glycinrest der Walker-Box A abhängig ist.

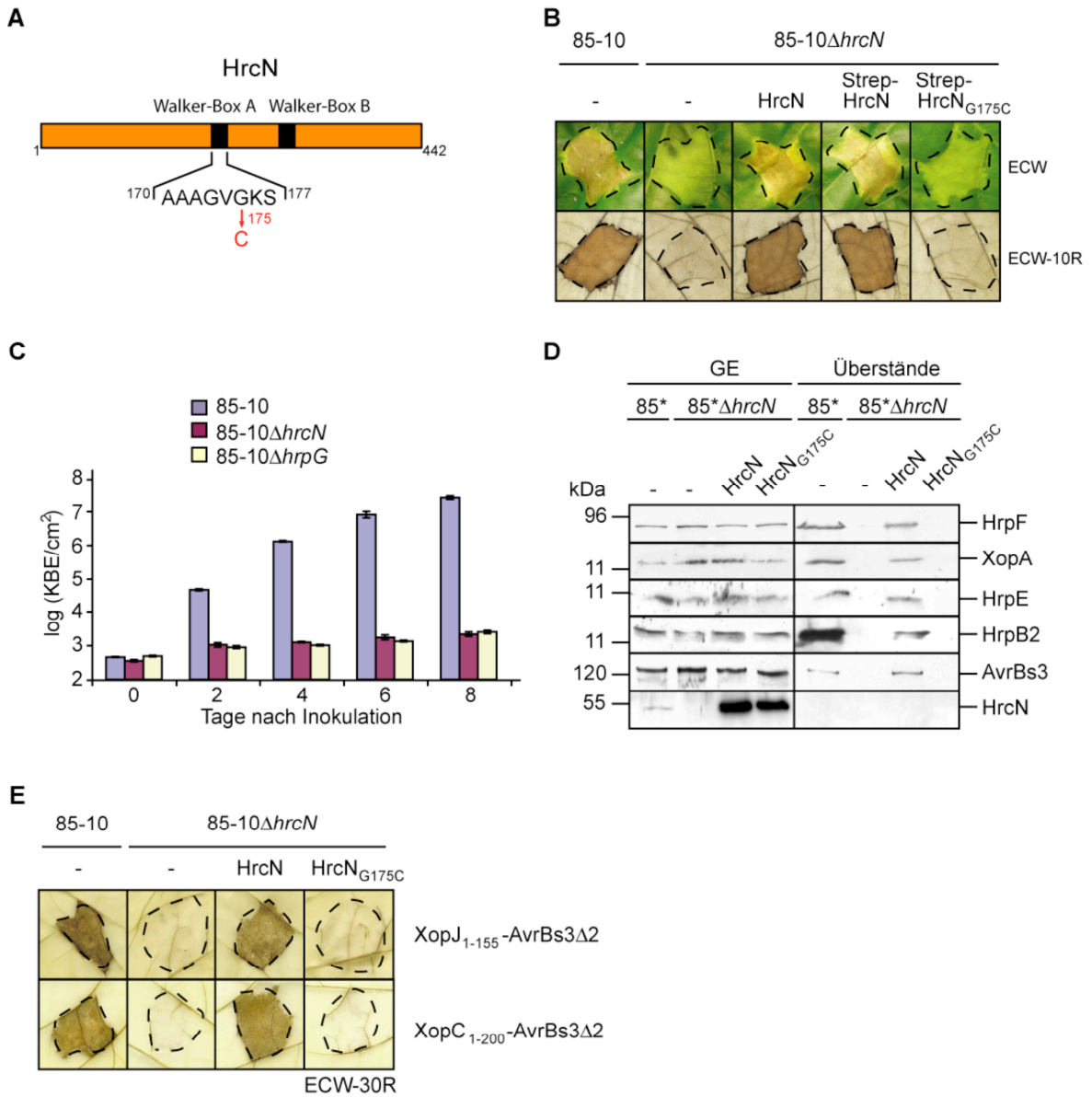


Abb. 3-4: HrcN ist für die Typ III-abhängige Sekretion und die bakterielle Pathogenität essentiell. (A) Schematische Darstellung von HrcN. Nummern beziehen sich auf Aminosäurepositionen, Buchstaben auf den Ein-Buchstaben-Code von Aminosäuren. Eine im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Punktmutation des Walker-Box-A-Motivs ist in rot dargestellt. **(B)** Eine *hrcN*-Deletionsmutante ist nicht pathogen. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 und 85-10 $\Delta hrcN$, welche HrcN, Strep-HrcN oder Strep-HrcN_{G175C} exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in susceptible ECW- ($OD_{600}=0,4$) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen ($OD_{600}=0,2$) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 7 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. **(C)** Das *in planta*-Wachstum einer *hrcN*-Deletionsmutante ist drastisch reduziert. Die Stämme 85-10, 85-10 $\Delta hrcN$ und 85-10 $\Delta hrpG$ wurden in susceptible ECW-Paprikapflanzen inokuliert und das bakterielle Wachstum über einen Zeitraum von 8 Tagen untersucht. Die dargestellten Werte sind jeweils Mittelwerte von 3 Proben aus 3 verschiedenen Pflanzen. Die Standardabweichungen sind angegeben. Das Experiment, von dem ein repräsentatives Ergebnis gezeigt wird, wurde dreimal durchgeführt. KBE = Koloniebildende Einheiten. **(D)** HrcN ist für die Typ III-abhängige *in vitro*-Sekretion essentiell. Die Stämme 85* und 85* $\Delta hrcN$, welche Strep-HrcN (HrcN) oder Strep-HrcN_{G175C} (HrcN_{G175C}) exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-, XopA-, HrpE-, HrpB2-, AvrBs3- und HrcN-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Zur Analyse der AvrBs3-

Sekretion wurden die Stämme 82* und 82* Δ *hrcN* verwendet, welche natürlicherweise *avrBs3* exprimieren. Die Analyse der HrpB2-Sekretion erfolgte in den Stämmen 85* Δ *hpaC* und 85* Δ *hpaC* Δ *hrcN*, da HrpB2 in Abwesenheit von HpaC verstärkt sekretiert wird und leichter in Kulturüberständen zu detektieren ist (Lorenz *et al.*, 2008b). **(E)** HrcN ist für die Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC essentiell. Die Stämme 85-10 und 85-10 Δ *hrcN*, welche XopJ₁₋₁₅₅-AvrBs3 Δ 2 oder XopC₁₋₂₀₀-AvrBs3 Δ 2 exprimierten, wurden in AvrBs3-responsive ECW-30R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an.

3.2.2 HrcN hydrolysiert ATP *in vitro*

Da HrcN Homologie zu bekannten ATPasen aufweist, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob HrcN ATP hydrolysieren kann. Hierfür wurde Strep-HrcN bzw. Strep-HrcN_{G175C} in *E. coli* exprimiert, an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und nach Entfernung ungebundener Proteine von der Matrix eluiert. Die Analyse der eluierten Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigte, dass Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} nahezu zur Homogenität gereinigt werden konnten (Abb. 3-5 A). Beide Proteine wurden anschließend mit Hilfe eines Malachitgrün-Phosphatase-Tests analysiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.7). Dabei wurde Strep-HrcN bzw. Strep-HrcN_{G175C} in Anwesenheit von ATP mit Malachitgrün-Reagenz inkubiert, das einen quantifizierbaren, grünen Komplex mit freigesetztem Phosphat bildet. Die Abb. 3-5 B zeigt, dass Strep-HrcN ATP in einer linear zeitabhängigen Weise hydrolysiert. Es wurden ca. 400 pmol Phosphat pro Minute und μ g Protein freigesetzt. Für Strep-HrcN_{G175C} konnte dagegen keine ATP-Hydrolyse gemessen werden (Abb. 3-5 B).

Da die enzymatische Aktivität von T3S-assoziierten ATPasen vermutlich vom Oligomerisierungszustand des Proteins abhängt, wurde untersucht, ob die Walker-Box-A-Mutation G175C die Fähigkeit zur Selbstinteraktion von HrcN beeinträchtigt. Die Selbstinteraktion der ATPase wurde bereits in vorangegangenen Experimenten für HrcN aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* und *X. axonopodis* pv. *citri* nachgewiesen (Alegria *et al.*, 2004; Berger, 2005). Für Interaktionsstudien wurden Strep-HrcN bzw. Strep-HrcN_{G175C} an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcN_{G175C} mit einer C-terminalen c-Myc-Epitopmarkierung (exprimiert vom Plasmid pDMhrcN_{G175C}; siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.2) enthielt. HrcN_{G175C}-c-Myc wurde in den Eluaten von Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} detektiert und interagiert demnach mit Wildtyp-HrcN und mit sich selbst (Abb. 3-5 C).

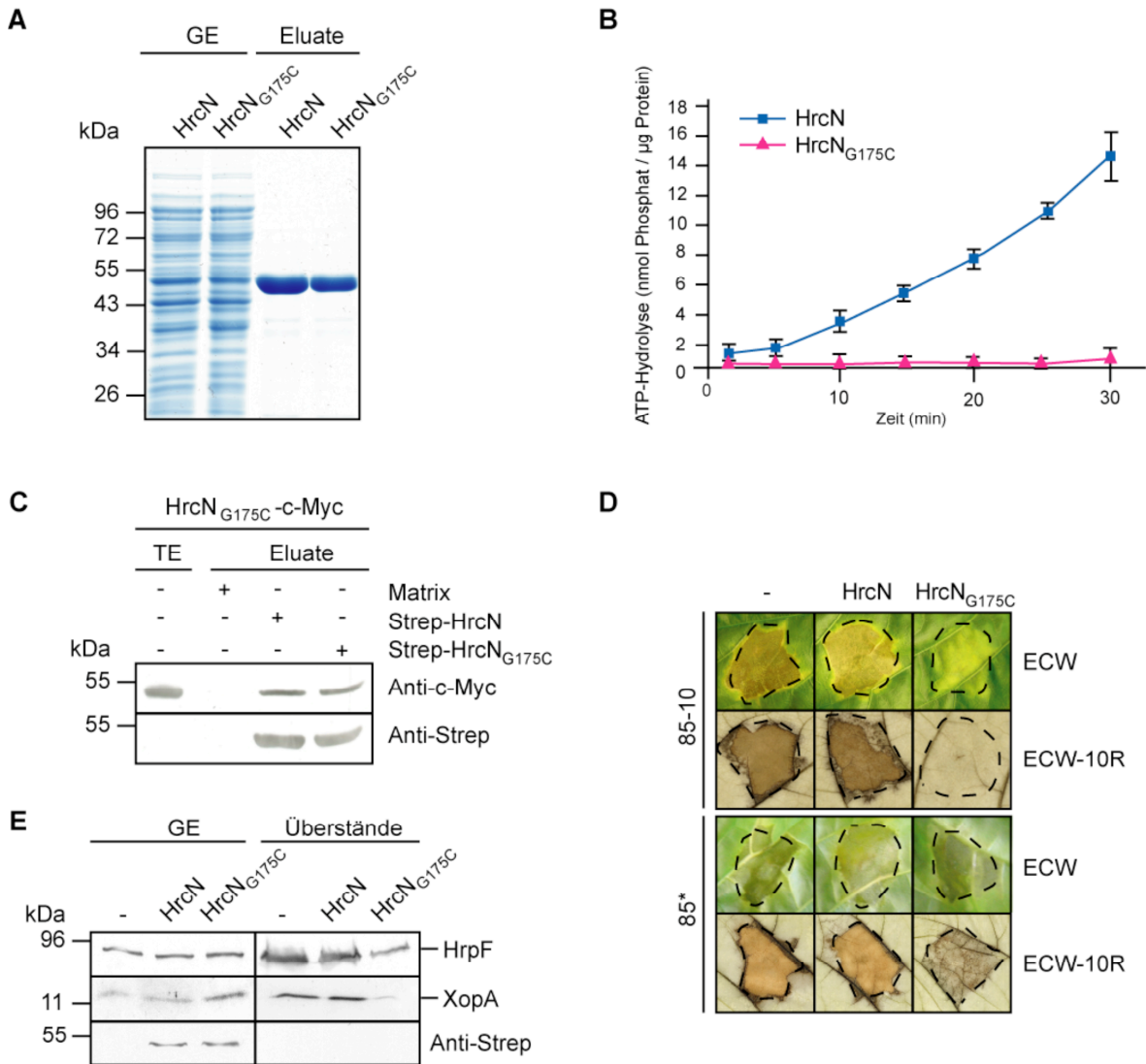


Abb. 3-5: HrcN hydrolysiert ATP *in vitro*. (A) Reinigung von Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C}. Strep-HrcN (HrcN) und Strep-HrcN_{G175C} (HrcN_{G175C}) wurden ektopisch in *E. coli* exprimiert und unter Verwendung von Strep-Tactin-Sepharose aus bakteriellen Lysaten gereinigt. Gesamtzellextrakte (GE) und von der Matrix eluierte Proteine (Eluate) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. (B) Bestimmung der ATPase-Aktivität von Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C}. Die ATP-Hydrolyse durch gereinigtes Strep-HrcN (HrcN) und Strep-HrcN_{G175C} (HrcN_{G175C}) wurde mit Hilfe eines Malachitgrün-Phosphatase-Tests über einen Zeitraum von 30 min gemessen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.7). (C) HrcN_{G175C} interagiert mit sich selber und mit Wildtyp-HrcN. Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} wurden an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcN_{G175C}-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 µl) und Eluate (20 µl) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit Strep-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. (D) Die ektopische Expression von Strep-HrcN_{G175C} beeinträchtigt die bakterielle Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Die Stämme 85-10 und 85*, welche Strep-HrcN (HrcN) oder Strep-HrcN_{G175C} (HrcN_{G175C}) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in susceptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 5 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. (E) Die ektopische Expression von Strep-HrcN_{G175C} beeinträchtigt die Typ III-abhängige *in vitro*-Sekretion von HrpF und XopA. Der Stamm 85*, welcher Strep-HrcN (HrcN) oder Strep-HrcN_{G175C} (HrcN_{G175C}) ektopisch exprimierte bzw. den Vektor enthielt (-), wurde in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-, XopA-, und Strep-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

Zusammengefasst deuten diese Experimente darauf hin, dass der konservierte Glycinrest an Aminosäureposition 175 von HrcN für die ATPase-Aktivität, nicht aber für die Selbstinteraktion von HrcN notwendig ist. Die fehlende Komplementation der *hrcN*-Mutante durch HrcN_{G175C} kann daher vermutlich mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität dieses HrcN-Derivates erklärt werden.

Interessanterweise führte die ektopische Expression von Strep-HrcN_{G175C} im Wildtyp-Stamm 85-10 zu deutlich reduzierten Symptomen in suszeptiblen und resistenten Paprikapflanzen (Abb. 3-5 D). Möglicherweise interferiert die Anwesenheit von Strep-HrcN_{G175C} mit der Bildung funktionaler ATPase-Komplexe. Da der inhibitorische Einfluss von Strep-HrcN_{G175C} im Stamm 85* weniger stark ausgeprägt war, ist zu vermuten, dass die konstitutive Expression des *hrpG*-Regulons den inhibitorischen Effekt von Strep-HrcN_{G175C} auf die Wirt-Pathogen-Interaktion partiell kompensieren kann (Abb. 3-10 D). Die *in vitro*-Sekretion der möglichen Translokationsproteine HrpF und XopA durch den Stamm 85* war jedoch in Anwesenheit von Strep-HrcN_{G175C} reduziert (Abb. 3-5 E).

3.2.3 HrcN dissoziiert einen HpaB/XopF1-Komplex

HrcN ist für die Sekretion von T3S-Substraten essentiell (siehe Kapitel 3.2.1). In weiteren Protein-Protein-Interaktionsstudien sollte untersucht werden, ob HrcN mit Typ III-abhängig sekretierten Proteinen interagiert. Dazu wurde GST-HrcN an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche C-terminal c-Myc-Epitop-markierte Derivate der Effektorproteine XopF1, XopC, XopG bzw. XopH enthielten. Die entsprechenden Expressionskonstrukte pDMxopC (Büttner *et al.*, 2007), pDGW4MxopG und pDGW4MxopH (A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlicht) lagen bereits vor, pDMxopF1 wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.4). Wie Abb. 3-6 A zeigt, konnte keine Interaktion zwischen den getesteten Effektorproteinen und HrcN detektiert werden. Zusätzlich zu GST-„pull-down“-Analysen wurde eine mögliche Interaktion von HrcN mit Typ III-abhängig sekretierten Proteinen mittels Strep-„pull-down“-Analysen untersucht. Hierfür wurden Strep-HrcN bzw. das katalytisch inaktive Strep-HrcN_{G175C} an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche C-terminal c-Myc-Epitop-markierte Derivate von XopF1 bzw. des Pathogenitätsfaktors HrpB2 (exprimiert vom Plasmid pDMhrpB2;

Lorenz *et al.*, 2008b) enthielten. Eine Interaktion von Strep-HrcN oder Strep-HrcN_{G175C} mit XopF1-c-Myc bzw. HrpB2-c-Myc konnte nicht nachgewiesen werden. Es gibt damit keine experimentellen Hinweise darauf, dass HrcN mit T3S-Substraten interagiert. Im Gegensatz dazu konnte HpaB-c-Myc sowohl in GST- als auch in Strep-„pull-down“-Analysen wie erwartet im Eluat von HrcN detektiert werden (Abb. 3-6 A und B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HrcN mit HpaB, nicht jedoch mit den getesteten Effektorproteinen bzw. HrpB2 interagiert. HpaB-c-Myc wurde auch im Eluat von Strep-HrcN_{G175C} detektiert (Abb. 3-6 B). Demnach ist der konservierte Glycinrest des Walker-Box-A-Motivs von HrcN nicht essentiell für die Interaktion mit HpaB.

T3S-assoziierte ATPasen wurden bislang intensiv in tierpathogenen Bakterien analysiert. In *S. enterica* wurde gezeigt, dass die ATPase InvC Chaperon-Effektor-Komplexe unter ATP-Verbrauch dissoziiert (Akeda und Galan, 2005). Hier sollte analysiert werden, ob HrcN aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* eine ähnliche Funktion erfüllt. Dazu wurde zunächst GST-HpaB vom Plasmid pGhpaB (Büttner *et al.*, 2006) in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches XopF1-c-Myc enthielt. Nach der Entfernung ungebundener Proteine wurden die immobilisierten HpaB/XopF1-Komplexe mit aus *E. coli* gereinigtem Strep-HrcN in Anwesenheit von ATP inkubiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.8). Gebundene und freigesetzte Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- bzw. GST-spezifischen Antikörpern analysiert. GST-HpaB war erwartungsgemäß nur an der Glutathion-Sepharose-Matrix detektierbar. Dagegen konnte XopF1-c-Myc sowohl an der Matrix als auch im Überstand, welcher die freigesetzten Proteine enthält, detektiert werden (Abb. 3-6 C). Dies deutet darauf hin, dass XopF1 in Anwesenheit der ATPase HrcN vom Chaperon HpaB freigesetzt wurde. Die Freisetzung von XopF1-c-Myc erfolgte hingegen nicht in Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren ATP-Derivates ATP γ S und war somit ATP-abhängig (Abb. 3-6 C). XopF1-c-Myc wurde auch nicht im Überstand detektiert, wenn das katalytisch inaktive Strep-HrcN_{G175C} verwendet wurde (Abb. 3-6 C). Dies ist nicht auf eine fehlende Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen, da Strep-HrcN_{G175C} an HpaB bindet (Abb. 3-6 B). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HrcN einen GST-HpaB/XopF1-c-Myc-Komplex unter ATP-Verbrauch dissoziiert.

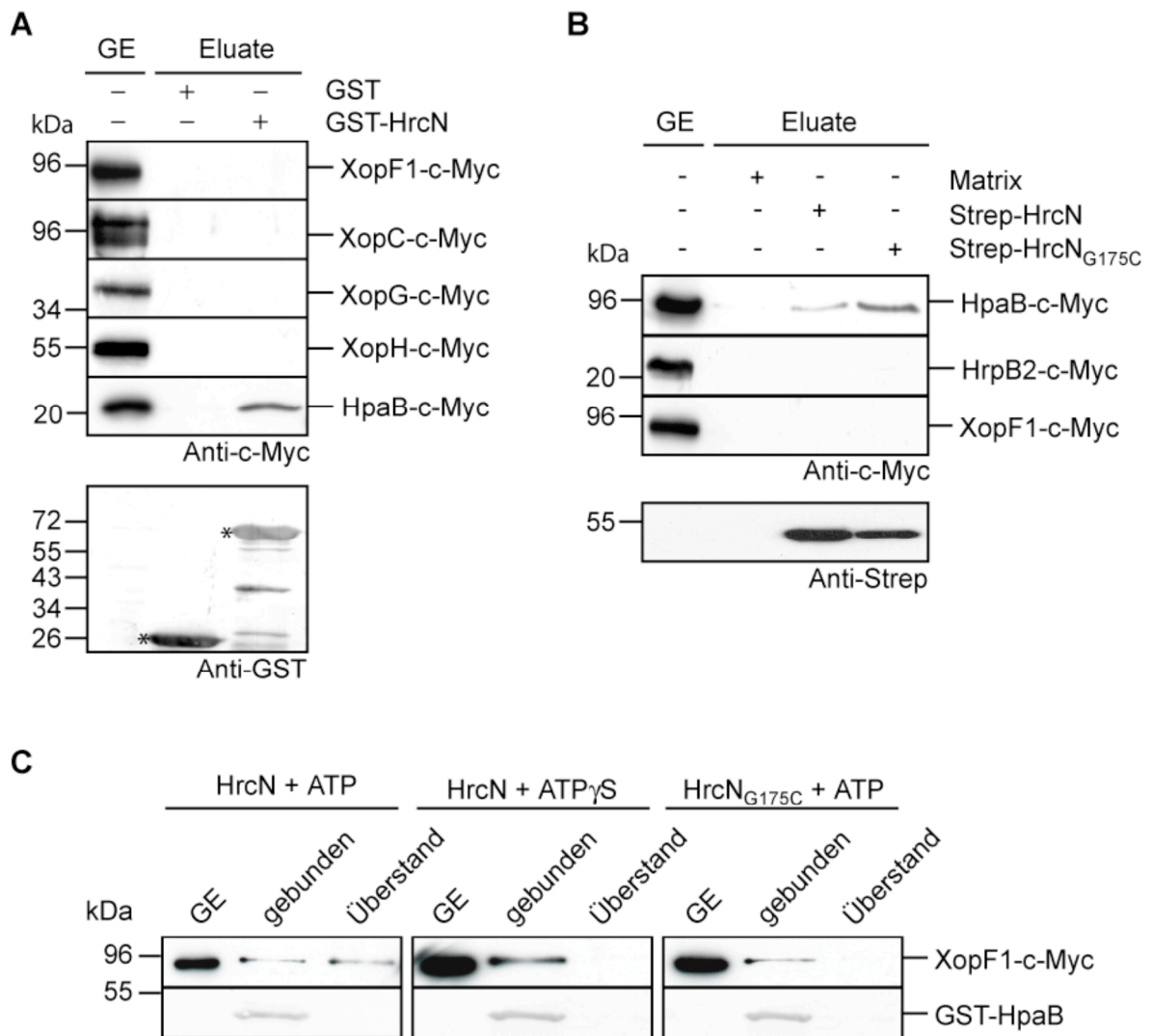


Abb. 3-6: HrcN dissoziiert einen HpaB-XopF1-Komplex. (A) GST-„pull-down“-Analysen mit HrcN. GST und GST-HrcN wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche XopF1-c-Myc, XopC-c-Myc, XopG-c-Myc, XopH-c-Myc bzw. HpaB-c-Myc enthielten. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und das vollständige GST-Fusionsprotein sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. Es ist ein repräsentativer GST-Western-Blot gezeigt. (B) Strep-„pull-down“-Analysen mit HrcN und HrcN_{G175C}. Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} wurden an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaB-c-Myc, HrpB2-c-Myc bzw. XopF1-c-Myc enthielten. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit Strep-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Es ist ein repräsentativer Strep-Western-Blot gezeigt. (C) HrcN setzt das Effektorprotein XopF1 vom T3S-Chaperon HpaB frei. An Glutathion-Sepharose gebundene GST-HpaB/XopF1-c-Myc-Komplexe (siehe Text) wurden wie angegeben mit gereinigtem Strep-HrcN bzw. Strep-HrcN_{G175C} in Anwesenheit von ATP (150 μ M) oder dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Derivat ATP_{γS} (150 μ M) inkubiert. Gesamtzellextrakte, welche XopF1-c-Myc enthielten (GE), gebundene Proteine (gebunden) sowie von der Matrix freigesetzte Proteine (Überstand) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit GST-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

3.2.4 HrcN interagiert mit HrcL

Das *hrcN*-Gen ist im *hrpB*-Operon benachbart zu *hrcL*, welches ebenfalls einen essentiellen Pathogenitätsfaktor kodiert, dessen biochemische Funktion jedoch noch ungeklärt ist. HrcL ist homolog zu FliH aus *S. enterica* und YscL aus *Yersinia* spp., welche an die ATPasen FliI bzw. YscN binden und die ATPase-Aktivität negativ regulieren (Blaylock *et al.*, 2006; Minamino und MacNab, 2000a; Minamino und MacNab, 2000b). Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass HrcL für die Auslösung von Krankheitssymptomen und der HR in suszeptiblen bzw. resistenten Paprikapflanzen, sowie für die Sekretion von HrpB2 und des Effektorproteins AvrBs3 notwendig ist (Rossier *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass HrcL auch für die Sekretion der möglichen Translokonproteine HrpF und XopA benötigt wird (Abb. 3-7 A). Dies deutet darauf hin, dass HrcL einen generellen Einfluss auf die Typ III-abhängige Sekretion hat. Weiterhin wurde der Beitrag von HrcL zur *in vivo*-Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC unter Verwendung des Reporterproteins AvrBs3 Δ 2 untersucht. XopJ₁₋₁₅₅-AvrBs3 Δ 2 und XopC₁₋₂₀₀-AvrBs3 Δ 2 induzierten erwartungsgemäß die HR in ECW-30R-Pflanzen, wenn sie von Stamm 85-10 transloziert wurden (Abb. 3-7 B). Keine HR-Induktion wurde dagegen mit den *hrcL*-Deletionsmutanten beobachtet (Abb. 3-7 B). Die Sekretions- und Translokationsdefizienz der *hrcL*-Deletionsmutanten konnte durch ektopische Expression von HrcL mit C-terminalen c-Myc-Epitop vom Plasmid pDMhrcL (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.2) komplementiert werden und ist daher spezifisch auf die Deletion von *hrcL* zurückzuführen (Abb. 3-7 A und B).

Um eine mögliche Interaktion zwischen HrcL und HrcN zu analysieren, wurden Strep-„pull-down“-Analysen durchgeführt. Strep-HrcN bzw. das katalytisch inaktive Derivat Strep-HrcN_{G175C} wurde an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcL-c-Myc enthielt. Die Analyse der Eluate zeigte, dass HrcL-c-Myc im Eluat von Strep-HrcN und Strep-HrcN_{G175C} detektierbar war, d.h. beide HrcN-Derivate interagierten mit HrcL (Abb. 3-7 C). Die Interaktion zwischen HrcN und HrcL konnte durch ein GST-„pull-down“-Experiment bestätigt werden, bei dem GST-HrcN an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert wurde, welches HrcL-c-Myc enthielt (Abb. 3-7 D).

Die Interaktion zwischen HrcL und HrcN wurde auch *in vivo* durch Koimmunpräzipitation mit *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Proteinextrakten analysiert. Mangels HrcL-spezifischer

Antikörper wurde HrcL mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop exprimiert. Die Bakterien wurden in einem T3S-induzierenden Medium angezogen, lysiert und HrcL-c-Myc mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper, der an Protein G-Agarose gekoppelt war, immunpräzipitiert. Western-Blot-Analysen zeigten, dass HrcN im Präzipitat von HrcL-c-Myc, nicht jedoch in Abwesenheit des c-Myc-spezifischen Antikörpers oder in Abwesenheit von HrcL-c-Myc detektierbar war (Abb. 3-7 E). Diese Ergebnisse konnten durch ein reziprokes Experiment, bei dem natives HrcN mit Hilfe von HrcN-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert wurde, bestätigt werden (Abb. 3-7 F). Dies deutet darauf hin, dass HrcL und HrcN auch in *X. campestris* pv. *vesicatoria* interagieren.

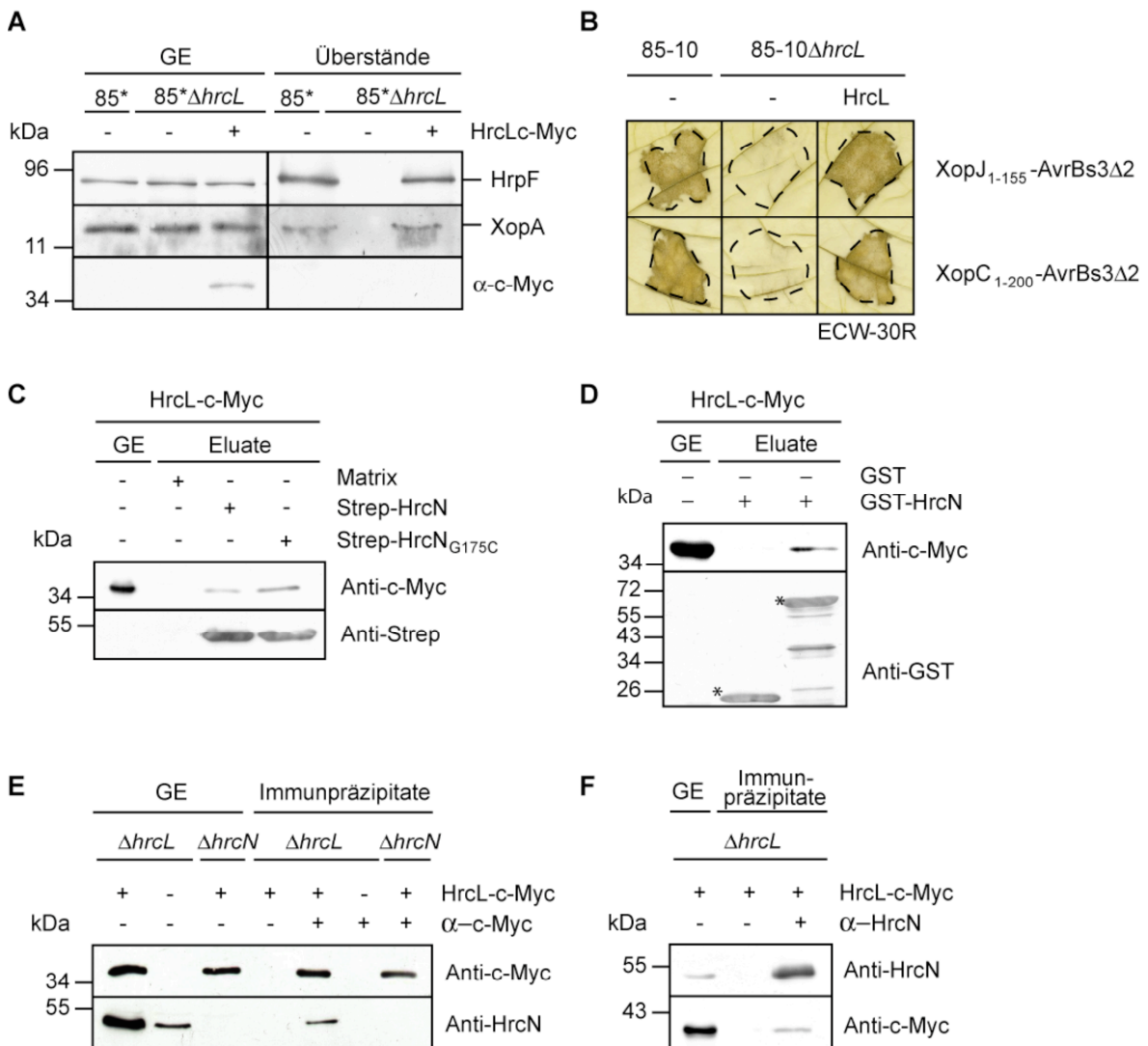


Abb. 3-7: HrcN interagiert mit dem konservierten HrcL-Protein. **(A)** HrcL ist für die Typ III-abhängige Sekretion von HrpF und XopA *in vitro* essentiell. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und 85* Δ *hrcL*, welche HrcL-c-Myc exprimierten (+) bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-, XopA- und c-Myc-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. **(B)** HrcL ist für die Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC essentiell. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *hrcL*, welche XopJ₁₋₁₅₅-AvrBs3 Δ 2 oder XopC₁₋₂₀₀-AvrBs3 Δ 2 ektopisch exprimierten, wurden in AvrBs3-responsive ECW-30R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. **(C)** Strep-„pull-down“-Analysen mit HrcL und HrcN. Strep-HrcL und Strep-HrcN_{G175C} wurden an Strep-Tactin-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcL-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und anschließend mit Strep-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. **(D)** GST-„pull-down“-Analysen mit HrcL und HrcN. GST und GST-HrcN wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysaten inkubiert, welches HrcL-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und GST-HrcN sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. **(E)** Koimmunpräzipitationsexperimente mit HrcL und HrcN in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Lysate der Stämme 85* Δ *hrcL* (Δ *hrcL*) und 85* Δ *hrcN* (Δ *hrcN*), welche HrcL-c-Myc ektopisch exprimierten (+) bzw. den Leervektor enthielten (-), wurden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) eines c-Myc-spezifischen Antikörpers (α -c-Myc) mit Protein G-Agarose inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Immunpräzipitate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und HrcN-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. **(F)** Koimmunpräzipitationsexperimente mit HrcL und HrcN in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Ein Lysat des Stammes 85* Δ *hrcL* (Δ *hrcL*), welcher HrcL-c-Myc ektopisch exprimiert (+), wurde in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von HrcN-spezifischen Antikörpern (α -HrcN) mit Protein G-Agarose inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Immunpräzipitate wurden wie in (E) beschrieben, analysiert.

3.2.5 HrcL trägt zur Proteinstabilität von HrcN bei

Interessanterweise zeigte die Analyse von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Proteinextrakten, dass die Menge an HrcN im Stamm 85* Δ *hrcL* signifikant reduziert war (Abb. 3-8 A). Dies ist spezifisch auf die Deletion von *hrcL* zurückzuführen, da Gesamtzellextrakte des Stammes 85* Δ *hrcL* bei ektopischer Expression von HrcL-c-Myc Wildtyp-Mengen an HrcN aufwiesen (Abb. 3-8 A). Die Menge anderer T3S-assoziiertes Proteine, z.B. HrpB2 und HrpF, war dagegen durch die Deletion von *hrcL* nicht beeinträchtigt (Abb. 3-8 A). Da HrpB2 im selben Operon wie HrcN kodiert wird, ist es unwahrscheinlich, dass die Deletion von *hrcL* die Transkriptstabilität beeinflusst. Um diese Möglichkeit trotzdem zu überprüfen, wurden semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR-Analysen mit RNA der Stämme 85* und 85* Δ *hrcL* unter der Verwendung genspezifischer Primer durchgeführt. Die Abb. 3-8 B zeigt, dass die Menge des *hrcN*-Transkriptes in beiden Stämmen vergleichbar war. Demnach scheint die Deletion von *hrcL* nicht die *hrcN*-

Expression auf Transkriptebene zu beeinträchtigen. Es wurde in den Stämmen 85* und 85* $\Delta hrcL$ auch kein Unterschied hinsichtlich der *hrpB2*-Transkriptmengen festgestellt (Abb. 3-8 B).

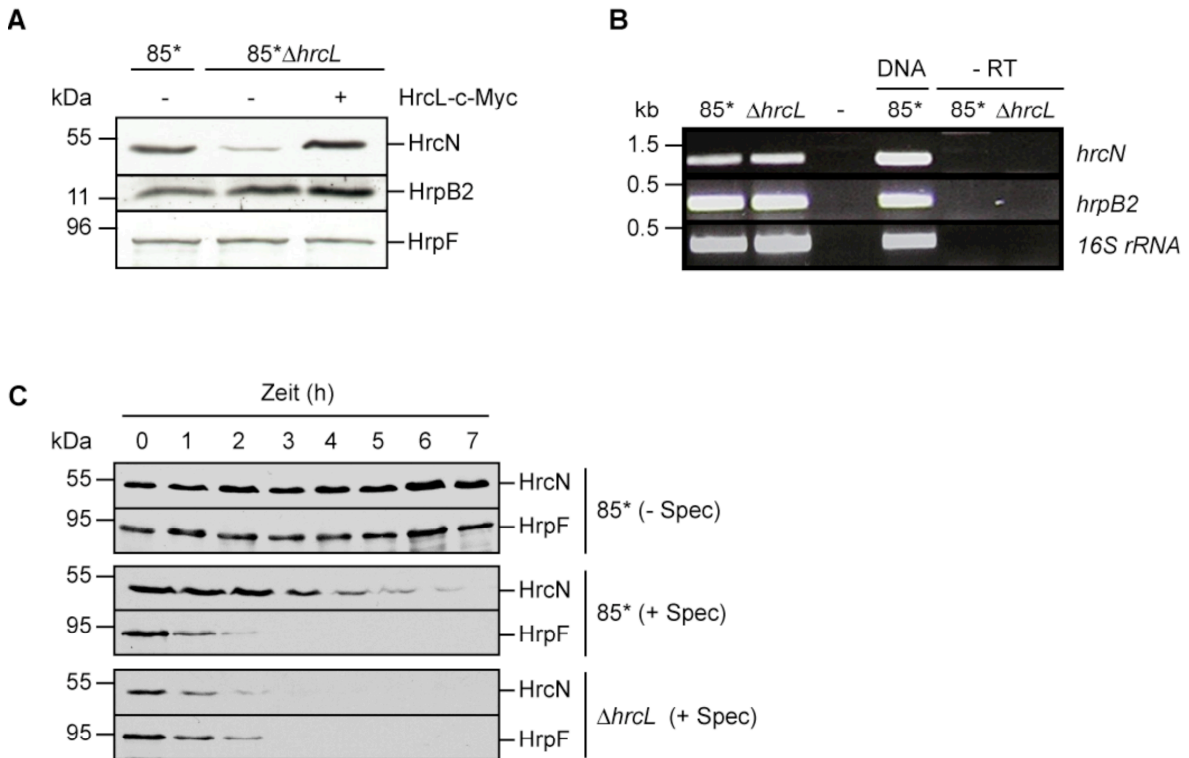


Abb. 3-8: HrcL trägt zur Proteinstabilität von HrcN bei. (A) Die HrcN-Proteinmenge ist in Abwesenheit von HrcL reduziert. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und 85* $\Delta hrcL$, welche HrcL-c-Myc ektopisch exprimierten (+) oder den Vektor enthielten (-), wurden in Minimalmedium A angezogen. Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit HrcN- und anschließend mit HrpF-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran bzw. mit HrpB2-spezifischen Antikörpern auf einer weiteren Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. (B) Die Transkription von *hrcN* ist in einer *hrcL*-Deletionsmutante nicht beeinträchtigt. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)-Analysen der *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und 85* $\Delta hrcL$ ($\Delta hrcL$) mit *hrcN*-, *hrpB2*- und 16S-rRNA-spezifischen Primern. Die 16S-rRNA wurde als konstitutive Kontrolle verwendet. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Stammes 85* eingesetzt. Als Negativkontrollen wurde die RT-PCR in Abwesenheit von cDNA (-) bzw. Reverser Transkriptase (-RT) durchgeführt. RT-PCR-Produkte wurden auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. (C) Die HrcN-Proteinstabilität ist in einer *hrcL*-Deletionsmutante reduziert. Die Stämme 85* und 85* $\Delta hrcL$ wurden in Minimalmedium A angezogen. Bakterielle Kulturen wurden auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 eingestellt und bei 30°C in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Spectinomycin (Spec) mit einer Endkonzentration von 400 μ g/ml inkubiert. Gleiche Mengen der über einen Zeitraum von 7 Stunden nach Spectinomycin-Zugabe entnommenen Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit HrcN- und anschließend mit HrpF-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

Da, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, HrcL mit HrcN in *X. campestris* pv. *vesicatoria* interagiert, sollte geklärt werden, ob HrcL zur Proteinstabilität von HrcN beiträgt. Dazu wurde die Proteinbiosynthese in den Stämmen 85* und 85* $\Delta hrcL$ mit dem Antibiotikum

Spectinomycin blockiert. Spectinomycin inhibiert den Elongationsfaktor G-Zyklus und die tRNA-Translokationsreaktion (Carter *et al.*, 2000). Die HrcN-Proteinmengen wurden in beiden Stämmen über einen Zeitraum von sieben Stunden nach Spectinomycin-Zugabe analysiert. Im Stamm 85* verringerte sich die Menge an HrcN drei Stunden nach Spectinomycin-Zugabe (Abb. 3-8 C). Im Gegensatz dazu war im Stamm 85* Δ *hrcL* eine Abnahme der HrcN-Menge bereits nach einer Stunde zu verzeichnen (Abb. 3-8 C). Dieser Effekt ist nicht durch einen Einfluss von HrcL auf die generelle Proteinstabilität erklärbar, da die Menge des Translokationsproteins HrpF in den Stämmen 85* und 85* Δ *hrcL* vergleichbar war (Abb. 3-8 C). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HrcL zur Stabilität von HrcN beiträgt.

Die HrcL-homologen Proteine YscL aus *Yersinia* spp. und FliH aus *S. enterica* agieren vermutlich als Regulatoren der ATPase (Blaylock *et al.*, 2006; Minamino und MacNab, 2000a). Ein möglicher Einfluss von HrcL auf die ATPase-Aktivität von HrcN konnte jedoch leider nicht untersucht werden, da HrcL nicht als GST- oder Strep-Fusionsprotein in ausreichender Quantität und Qualität aus *E. coli* gereinigt werden konnte.

3.2.6 Die Überexpression von HrcL beeinträchtigt die bakterielle Pathogenität

Um HrcL näher zu analysieren, wurden Überexpressionsstudien in *X. campestris* pv. *vesicatoria* durchgeführt. Die ektopische Expression von HrcL-c-Myc vom Plasmid pDMhrcL im Stamm 85-10 führte zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitssymptome und der HR in suszeptiblen bzw. resistenten Paprikapflanzen (Abb. 3-9 A). Bei gleichzeitiger ektopischer Expression von HrcL und HrcN vom Konstrukt pDhrcLN (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.2) waren die makroskopischen Reaktionen auf Paprikapflanzen dagegen nicht beeinträchtigt (Abb. 3-9 A). Da pDhrcLN den Phänotyp von *hrcL*- und *hrcN*-Deletionsmutanten komplementierte, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl HrcL als auch HrcN exprimiert wurden (Abb. 3-9 C). Dies konnte in Western-Blot-Analysen für HrcN (Abb. 3-10 B), mangels HrcL-spezifischer Antikörper jedoch nicht für HrcL nachgewiesen werden. Anscheinend wirkt die Überexpression von HrcN dem negativen Effekt der HrcL-Überexpression entgegen.

Im Stamm 85* war der inhibitorische Einfluss der ektopischen Expression von HrcL-c-Myc auf die Interaktion mit der Pflanze deutlich weniger stark ausgeprägt (Abb. 3-9 A). Es

konnte auch kein Einfluss der HrcL-Überexpression auf die Typ III-abhängige *in vitro*-Sekretion des Translokonproteins HrpF festgestellt werden (Abb. 3-9 B). Es ist daher anzunehmen, dass die konstitutive Expression des *hrpG*-Regulons im Stamm 85* den negativen Effekt einer *hrcL*-Überexpression kompensieren kann. Ähnliche Beobachtungen wurden schon für die ektopische Expression von Strep-HrcN_{G175C} im Stamm 85* beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2).

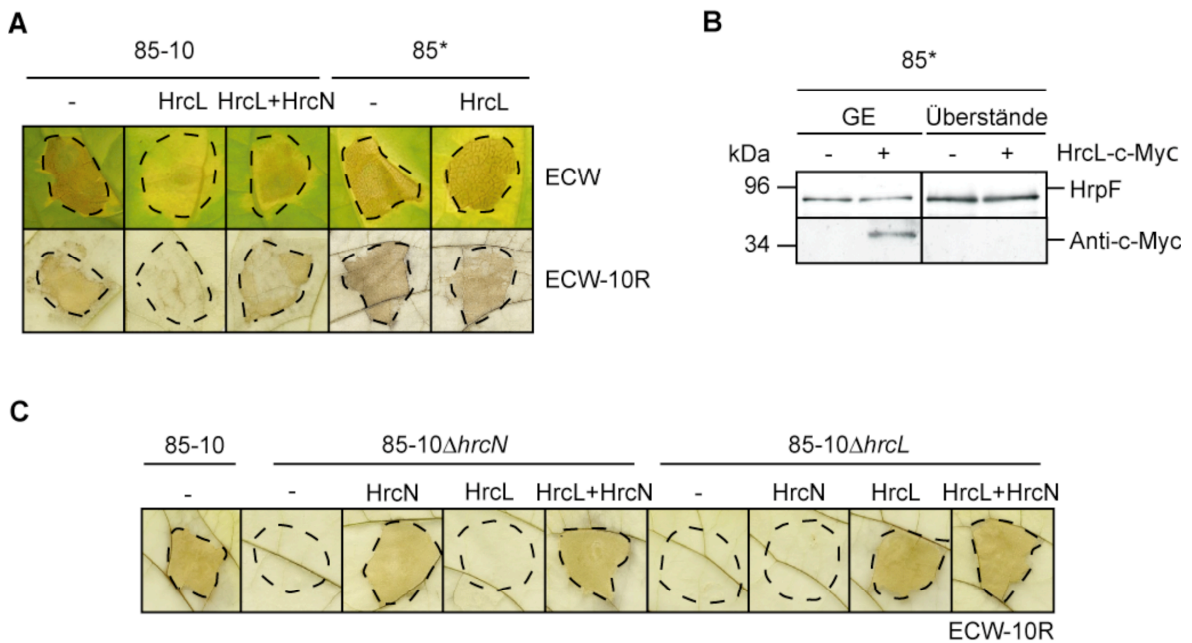


Abb. 3-9: Die ektopische Expression von HrcL beeinträchtigt die bakterielle Pathogenität. (A) Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 und 85*, welche HrcL-c-Myc (HrcL) oder HrcL und HrcN vom Plasmid pDhrcLN (HrcL+HrcN) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in susceptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 5 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. (B) *In vitro*-Sekretionsanalysen mit dem Stamm 85*, welcher HrcL-c-Myc ektopisch exprimierte (+) bzw. den Vektor enthielt (-). Die Bakterien wurden in Sekretionsmedium inkubiert und Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF- und anschließend mit c-Myc-spezifischen Antikörpern auf derselben Membran analysiert. (C) Komplementationsanalysen mit *hrcL*- und *hrcN*-Deletionsmutanten. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85-10Δ*hrcN* (Δ*hrcN*) und 85-10Δ*hrcL* (Δ*hrcL*), welche Strep-HrcN (HrcN), HrcL-c-Myc (HrcL) oder HrcL und HrcN vom Plasmid pDhrcLN (HrcL+HrcN) ektopisch exprimierten bzw. den Leervektor enthielten (-), wurden in resistente ECW-10R-Paprikapflanzen inokuliert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an.

3.2.7 Eine *hrcLhrcN*-Doppeldeletionsmutante ist nicht pathogen

In *S. enterica* wurde kürzlich gezeigt, dass die Deletion von *fliI* und *fliH*, welche die Flagellum-T3S-assoziierte ATPase FliI und den korrespondierenden Regulator FliH kodieren, nicht zu einem vollständigen Verlust der bakteriellen Motilität führt, und extrazelluläre Komponenten des Flagellum-T3S-Systems immer noch, wenn auch stark reduziert, sekretiert werden (Minamino und Namba, 2008). Eine Punktmutation (P28T) in der konservierten Komponente FlhB des Flagellum-T3S-Systems führte jedoch zu einer deutlichen Steigerung der bakteriellen Motilität und der Sekretionseffizienz in der *fliI*/*fliH*-Doppelmutante (Minamino und Namba, 2008). Es wurde daher postuliert, dass das Flagellum-T3S-System auch in Abwesenheit einer funktionalen ATPase assembliert werden kann (Minamino und Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008). Um zu testen, ob die Typ III-abhängige Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* auch in Abwesenheit von HrcN und HrcL stattfinden kann, wurden sowohl *hrcL* als auch *hrcN* aus dem Genom des Stammes 85* deletiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.1). Die resultierende Deletionsmutante 85* Δ *hrcLN* war nicht mehr in der Lage, Krankheitssymptome in suszeptiblen ECW-Pflanzen bzw. die HR in resistenten ECW-10R-Pflanzen auszulösen (Abb. 3-10 A). In *in vitro*-Sekretionsanalysen des Stammes 85* Δ *hrcLN* konnte zudem keine Sekretion des Translokonproteins HrpF nachgewiesen werden (Abb. 3-10 B). Der Phänotyp des Stammes 85* Δ *hrcLN* wurde durch die ektopische Expression von *hrcL* und *hrcN* vom Plasmid pDhrcLN komplementiert. Keine Komplementation wurde dagegen bei der ektopischen Expression von Strep-HrcN bzw. HrcL-c-Myc alleine beobachtet (Abb. 3-10 A und B).

Zusätzlich zur Doppeldeletion von *hrcL* und *hrcN* im Stamm 85* wurde eine Punktmutation in das *flhB*-homologe Gen *hrcU* eingeführt, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 24 von Prolin zu Threonin in HrcU führt (*hrcU*_{P24T}, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.2) und äquivalent zur P28T-Mutation in FlhB ist. HrcU stellt eine konservierte Komponente des T3S-Systems dar, welche in der inneren bakteriellen Membran lokalisiert ist (siehe Kapitel 3.3 und Abb. 3-14 A). Der Prolinrest (Aminosäureposition 24 in HrcU) ist in HrcU und FlhB konserviert und befindet sich außerhalb der Transmembrandomänen dieser Proteine (siehe Abb. 3-14 A und Anhang 2). Im Gegensatz zur FlhB-Mutation P28T in der *fliI*/*fliH*-Doppelmutante von *S. enterica* führte die zusätzliche HrcU-Mutation P24T jedoch zu keiner Veränderung des Phänotyps

des *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stammes 85* Δ *hrcLN* (Abb. 3-10 A und B). Im Stamm 85* resultierte die P24T-Mutation von HrcU in keiner Beeinträchtigung der Interaktion mit der Pflanze sowie der HrpF-Sekretion *in vitro* (Abb. 3-10 A und B). Der Prolinrest P24 ist demnach nicht essentiell für die Funktionalität von HrcU. Zusammengefasst konnten keine experimentellen Hinweise darauf gefunden werden, dass die ATPase HrcN für die Typ III-abhängige Sekretion entbehrlich ist.

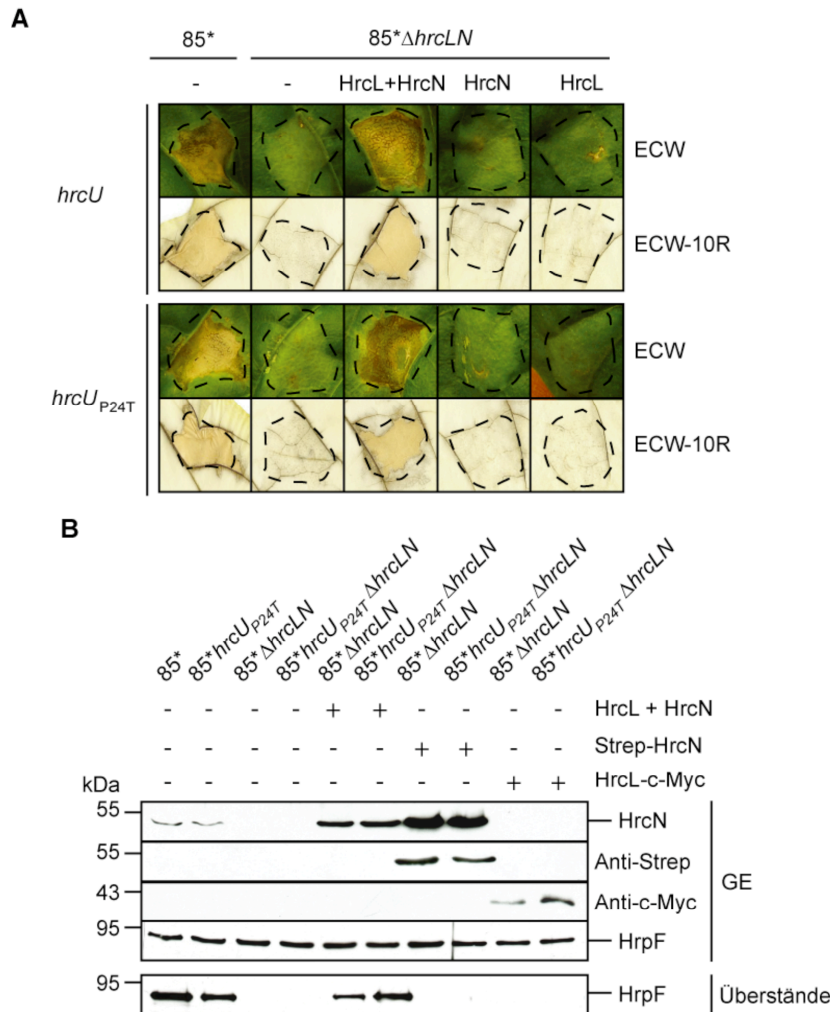


Abb. 3-10: Eine *hrcLhrcN*-Doppeldeletionsmutante ist nicht pathogen. (A) Eine *hrcLhrcN*-Doppeldeletionsmutante löst keine makroskopischen Reaktionen in Paprikapflanzen aus. Die Stämme 85*, 85* Δ *hrcLN*, 85**hrcU*_{P24T} und 85**hrcU*_{P24T} Δ *hrcLN*, welche wie angegeben Strep-HrcN (HrcN), HrcL-c-Myc (HrcL) oder HrcL und HrcN vom Plasmid pDhrcLN (HrcL+HrcN) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), wurden in susceptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 7 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. (B) HrpF-Sekretion ist in einer *hrcLhrcN*-Doppeldeletionsmutante nicht nachweisbar. Für *in vitro*-Sekretionsanalysen wurden die Stämme 85*, 85**hrcU*_{P24T}, 85* Δ *hrcLN* und 85**hrcU*_{P24T} Δ *hrcLN*, welche wie angegeben Strep-HrcN, HrcL-c-Myc oder HrcL und HrcN vom Plasmid pDhrcLN (HrcL+HrcN) ektopisch exprimierten bzw. den Vektor enthielten (-), in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrcN-, HrpF-, Strep- und c-Myc-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

3.2.8 Die Bedeutung der protonenmotorischen Kraft für die Typ III-abhängige Sekretion

Kürzlich publizierte Daten aus *S. enterica* und *Yersinia* spp. deuten darauf hin, dass die Typ III-abhängige Sekretion nicht allein durch die T3S-assoziierte ATPase, sondern auch durch die protonenmotorische Kraft (PMK) angetrieben wird. So führte die Zugabe des Protonophors CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon), einem PMK-Inhibitor, in beiden Pathogenen zu einer drastischen Reduktion der Typ III-abhängigen Sekretion (Minamino und Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008; Wilharm *et al.*, 2004).

Wie für die *in vitro*-Sekretion von HrpF gezeigt wurde, wird auch in *X. campestris* pv. *vesicatoria* die Typ III-abhängige Sekretion in Anwesenheit von CCCP bei Konzentrationen von mehr als 0,75 μ M inhibiert (Abb. 3-11 A). Allerdings inhibierten CCCP-Konzentrationen von nur 1 μ M das bakterielle Wachstum in Minimalmedium (Abb. 3-11 B). Dies lässt vermuten, dass durch die Inkubation mit CCCP nicht nur die Typ III-abhängige Sekretion, sondern auch andere zelluläre Prozesse beeinträchtigt werden. Der inhibitorische Effekt von CCCP auf das bakterielle Wachstum war bei einem pH-Wert des Mediums von 5,3 deutlich stärker ausgeprägt als bei einem pH-Wert von 7,0, was möglicherweise auf eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes infolge des Protoneneinstromes aus dem sauren Medium zurückzuführen ist. Aufgrund der vermutlich pleiotropen Effekte von CCCP auf zelluläre Prozesse von *X. campestris* pv. *vesicatoria* kann daher aus diesen Ergebnissen nicht auf einen Einfluss der protonenmotorischen Kraft bei der Typ III-abhängigen Sekretion geschlossen werden.

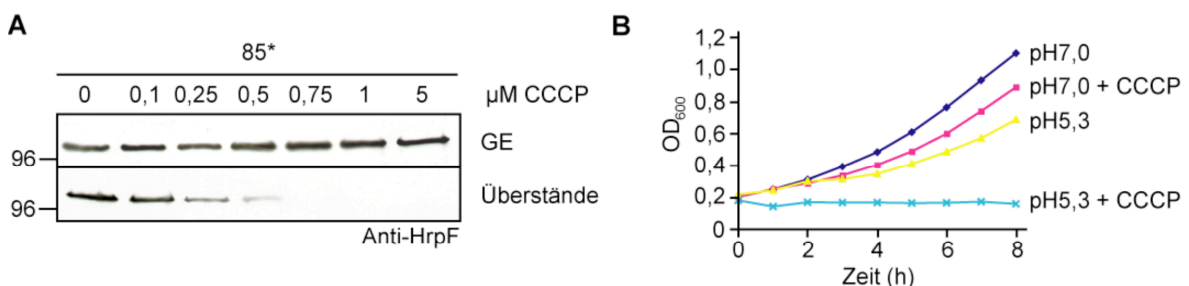


Abb. 3-11: Einfluss des Protonophors CCCP auf die Typ III-abhängige Sekretion und das Wachstum von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. (A) Das Protonophor CCCP inhibiert die Typ III-abhängige Sekretion. Der Stamm 85* wurde in Gegenwart von CCCP in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. (B) Das Protonophor CCCP inhibiert das bakterielle Wachstum. Kulturen des Stammes 85* wurden auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 eingestellt und bei 30°C in Minimalmedium A (pH 7,0 bzw. pH 5,3) in An- oder Abwesenheit von 1 µM CCCP inkubiert. OD₆₀₀ wurde stündlich über einen Zeitraum von 8 Stunden gemessen.

3.2.9 HrcN, HrcL und HpaB ändern unter T3S-induzierenden Bedingungen ihre subzelluläre Lokalisierung

Die Proteine HrcL und HrcN sind vermutlich mit dem T3S-System assoziiert, besitzen jedoch keine vorhergesagten Transmembrandomänen (Rossier *et al.*, 2000). Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von HrcN wurde der Stamm 85* in T3S-restriktivem Medium (Minimalmedium A; pH 7,0) bzw. in T3S-induzierendem Medium (Minimalmedium A; pH 5,3; Rossier *et al.*, 1999) angezogen. Durch Ultrazentrifugation bakterieller Lysate wurden lösliche Proteine von Membranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen getrennt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Wie die Abb. 3-12 zeigt, wurde HrcN bei Inkubation der Bakterien bei pH 7,0 sowohl in der Membran- als auch in der löslichen Fraktion detektiert. Dies bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Lokalisierungsstudien (Rossier *et al.*, 2000). Unter T3S-induzierenden Bedingungen (pH 5,3) war die HrcN-Menge in der löslichen Fraktion jedoch deutlich reduziert, was auf einer verstärkten Membranassoziiierung von HrcN beruhen könnte (Abb. 3-12). Da gleiche Ergebnisse auch mit dem Stamm 85* Δ *hrcL* beobachtet wurden, scheint HrcL nicht für die Membranassoziiierung von HrcN notwendig zu sein (Abb. 3-12).

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von HrcL wurde HrcL-c-Myc in den Stämmen 85* und 85* Δ *hrcN* exprimiert. HrcL-c-Myc wurde bei einem pH-Wert von 7,0 ähnlich wie HrcN sowohl in der Membran- als auch in der löslichen Fraktion detektiert (Abb. 3-12). Die Menge an HrcL-c-Myc in der löslichen Fraktion war dagegen unter T3S-induzierenden Bedingungen (pH 5,3) deutlich reduziert (Abb. 3-12). Zur Kontrolle wurden die Western-Blots mit Antikörpern gegen das in der äußeren bakteriellen Membran lokalisierte Sekretin des T3S-Systems HrcC inkubiert (Wengelnik *et al.*, 1996a). HrcC war erwartungsgemäß nur in den Membranfraktionen detektierbar (Abb. 3-12). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HrcL und HrcN nach der

Aktivierung des T3S-Systems verstärkt mit den bakteriellen Membranen assoziieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für ein C-terminal c-Myc-Epitop-markiertes Derivat des cytoplasmatischen T3S-Chaperons HpaB erzielt. Da die Membranlokalisierung von HpaB-c-Myc unter T3S-induzierenden Bedingungen in den Stämmen 85* und 85* Δ *hrcN* vergleichbar war (Abb. 3-12), ist HrcN vermutlich nicht für die Assoziierung von HpaB mit den bakteriellen Membranen essentiell.

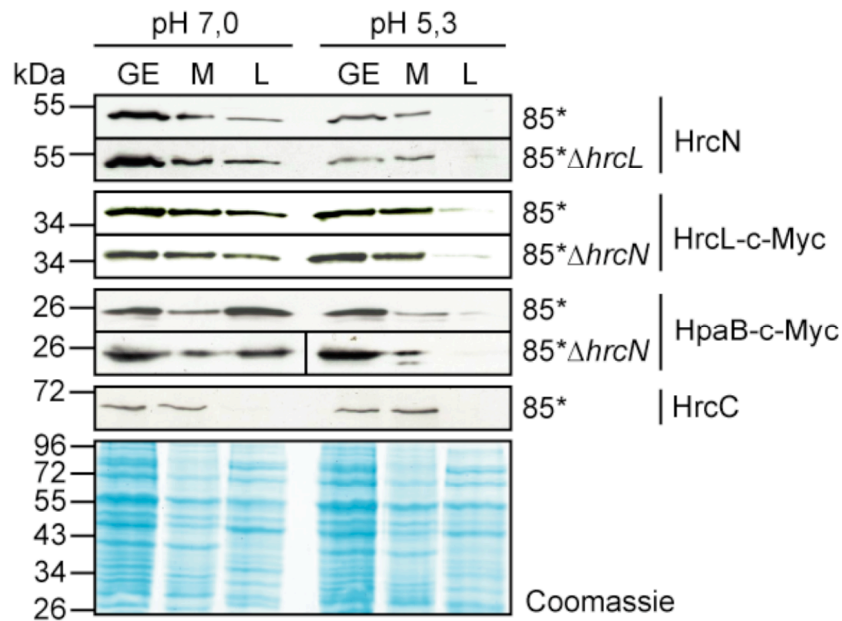


Abb. 3-12: HrcN, HrcL und HpaB lokalisieren unter T3S-induzierenden Bedingungen in der bakteriellen Membranfraktion. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85*, 85* Δ *hrcL* und 85* Δ *hrcN*, welche wie angegeben HrcL-c-Myc oder HpaB-c-Myc ektopisch exprimierten, wurden in Minimalmedium A unter T3S-restriktiven (pH 7,0) bzw. T3S-induzierenden Bedingungen (pH 5,3) angezogen und lysiert. Gesamtzellextrakte (GE) wurden durch Ultrazentrifugation in Membranfraktion (M) und lösliche Proteine (L) getrennt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot mit HrcN- bzw. c-Myc-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen und anschließend mit HrcC-spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Es sind ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes Proteingel und ein repräsentativer HrcC-Western-Blot gezeigt.

3.2.10 HrcN und HrcL interagieren mit dem konservierten HrcU-Protein

Die Membranlokalisierung von HrcL und HrcN unter T3S-permissiven Bedingungen deutet auf eine Interaktion beider Proteine mit Komponenten des T3S-Systems hin. In weiteren Experimenten sollte daher eine mögliche Interaktion von HrcL und HrcN mit dem konservierten HrcU-Protein analysiert werden. HrcU ist in der inneren Membran lokalisiert und besteht aus vier Transmembrandomänen und einer C-terminalen cytoplasmatischen

Region, die proteolytisch gespalten wird (siehe Kapitel 3.3 und Abb. 3-14 A) (Berger, 2005). Für Interaktionsstudien wurden Konstrukte zur Expression von GST-Fusionsproteinen des vollständigen HrcU (pGhrcU) bzw. der C-terminalen Domäne von HrcU (pGhrcU₂₅₅₋₃₅₇) generiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1). GST-HrcU und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurden in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche Strep-HrcN bzw. HrcL-c-Myc enthielten. Die Abb. 3-13 A zeigt, dass Strep-HrcN im Eluat von GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇, nicht aber von GST-HrcU detektierbar war. Im Gegensatz dazu band HrcL-c-Myc an das vollständige HrcU-Protein, nicht aber an die C-terminale Domäne von HrcU (Abb. 3-13 B). Dies lässt vermuten, dass HrcL und HrcN an verschiedene Regionen von HrcU binden bzw. dass die Bindung von der Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU abhängig ist, welche im Kontext des vollständigen HrcU-Fusionsproteins vermutlich unterschiedlich ist.

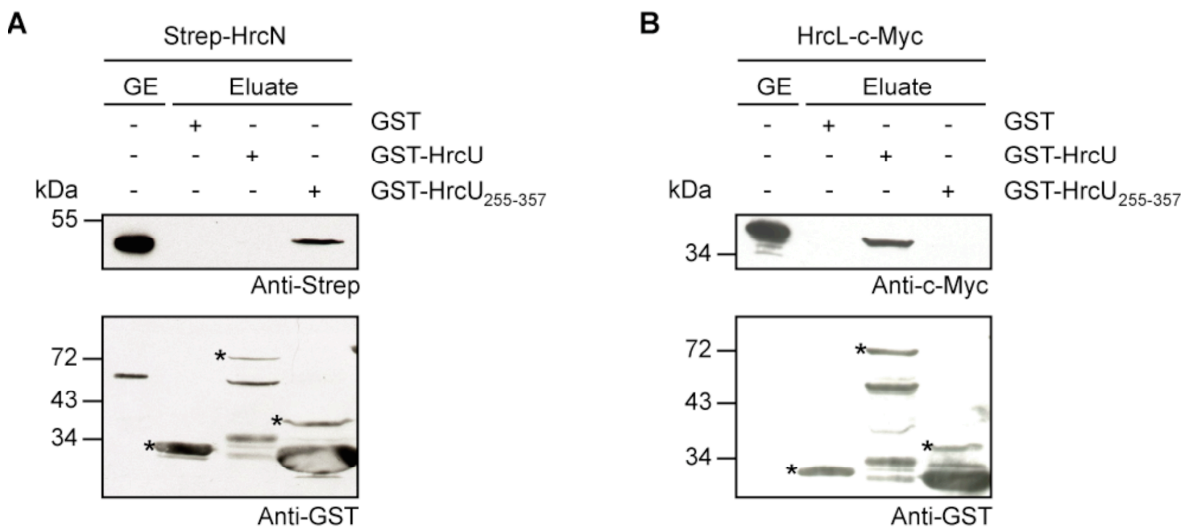


Abb. 3-13: HrcN und HrcL interagieren mit dem konservierten HrcU-Protein. (A) HrcN bindet an die C-terminale Domäne von HrcU. GST, GST-HrcU und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches Strep-HrcN enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit Strep- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. (B) HrcL interagiert mit HrcU. GST, GST-HrcU und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcL-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE, 5 μ l) und Eluate (20 μ l) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar.

3.3 Einfluss des HrcU-Proteins auf die Substratspezifität des T3S-Systems

3.3.1. HrcU ist für die Typ III-abhängige Sekretion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell

Bisher ist unklar, wie die Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* reguliert wird. Komponenten des T3S-Apparates, die in der inneren bakteriellen Membran lokalisiert sind, könnten an der Substraterkennung beteiligt sein. In tierpathogenen Bakterien wurde gezeigt, dass Mitglieder der konservierten FlhB/YscU-Familie an der Regulation der Substratspezifität von T3S-Systemen beteiligt sind (Minamino und Macnab, 2000b; Minamino und MacNab, 2000c; Sorg *et al.*, 2007). Das zu FlhB bzw. YscU homologe Protein von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, HrcU, wird vom ersten Gen des *hrpC*-Operons des *hrp*-Genclusters kodiert. HrcU enthält vier Transmembrandomänen und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne (Abb. 3-14 A) (Berger, 2005). Aus vorangegangenen elektronenmikroskopische Analysen war bekannt, dass ein *hrcU*-Deletionsderivat des Stammes 85*E keine Hrp-Pili ausbilden kann (Weber *et al.*, 2005). Der Stamm 85*E enthält eine Mutation, welche die Bildung von Exopolysacchariden sehr stark reduziert und so die Analyse der Hrp-Pili erleichtert (Wengelnik *et al.*, 1999). Die Mutation hat jedoch keinen Einfluss auf die Proteinexpression und -sekretion.

Für phänotypische Analysen wurde der Stamm 85*E Δ *hrcU* (Weber *et al.*, 2005) in suszeptible und resistente Paprikapflanzen inokuliert. Wie die Abb. 3-14 B zeigt, löste der Stamm 85*E Δ *hrcU* wie erwartet keine Krankheitssymptome in suszeptiblen ECW-Pflanzen und keine HR in resistenten ECW-10R-Pflanzen aus. *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten zudem, dass das Translokonprotein HrpF in Abwesenheit von HrcU nicht nachweisbar sekretiert wird. Der Phänotyp und die Sekretionsdefizienz der *hrcU*-Mutante konnte durch ektopische Expression von HrcU mit C-terminalen c-Myc-Epitop vom Plasmid pDGW4M*hrcU* (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1) im Stamm 85*E Δ *hrcU* komplementiert werden (Abb. 3-14 B und C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HrcU die Typ III-abhängige Sekretion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell ist.

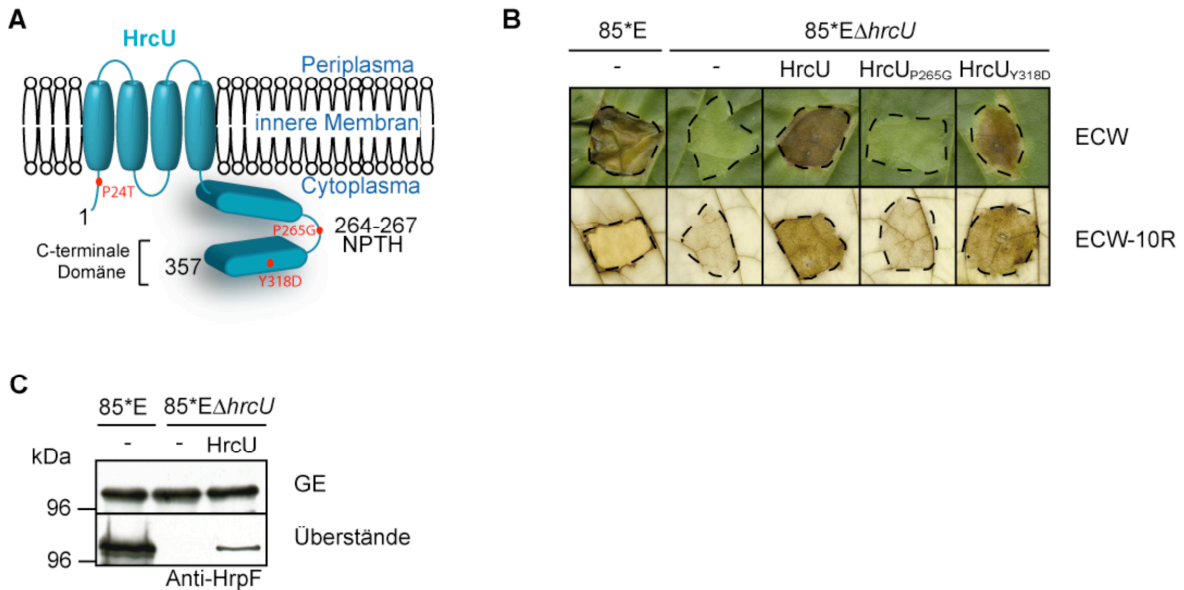


Abb. 3-14: HrcU ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor. (A) Schematische Darstellung der Struktur von HrcU (nach Berger, 2005). Nummern beziehen sich auf Aminosäurepositionen, Buchstaben auf den Einbuchstaben-Code von Aminosäuren. Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Punktmutationen sind in rot dargestellt. Die konservierte Sequenz NPTH wird in HrcU-Homologen proteolytisch gespalten. (B) HrcU ist für die bakterielle Pathogenität essentiell. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85*E und 85*EΔhrcU, welche HrcU-c-Myc (HrcU), HrcU_{P265G}-c-Myc (HrcU_{P265G}) bzw. HrcU_{Y318D}-c-Myc (HrcU_{Y318D}) ektopisch exprimierten oder den Vektor enthielten (-), wurden in susceptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 7 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. (C) Analyse der *in vitro*-Sekretion in *hrcU*-Deletionsmutanten. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85*E und 85*EΔhrcU, welche HrcU-c-Myc (HrcU) ektopisch exprimierten oder den Vektor enthielten (-), wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert.

3.3.2 HrcU wird proteolytisch gespalten

HrcU besitzt in seiner cytoplasmatischen Domäne das Aminosäuremotiv NPTH (Asparagin-Prolin-Threonin-Histidin), welches in homologen Proteinen zwischen dem Asparagin- und Prolinrest proteolytisch gespalten wird (Abb. 3-14 A) (Ferris *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2003; Lavander *et al.*, 2002; Minamino und Macnab, 2000c; Riordan und Schneewind, 2008; Sorg *et al.*, 2007; Zarivach *et al.*, 2008). Um auf eine mögliche proteolytische Spaltung von HrcU zu testen, wurde HrcU-c-Myc vom Plasmid pDGW4MhrcU in *E. coli* und *X. campestris* pv. *vesicatoria* exprimiert und die bakteriellen Proteinextrakte mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Sowohl in *E. coli*- als auch in *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Extrakten konnten zwei Proteinsignale von ungefähr 50 und 20 kDa detektiert werden

(Abb. 3-15 A). Das obere Signal entspricht dabei vermutlich dem vollständigen HrcU-c-Myc-Protein (39 kDa + 5 kDa c-Myc-Epitop), das untere Signal dem vorhergesagten C-terminalen Spaltprodukt (10 kDa + 5 kDa c-Myc-Epitop). Beide Proteine weisen also ein verzögertes Laufverhalten auf, das bereits zuvor für andere T3S-assoziierte Proteine beobachtet wurde (Büttner *et al.*, 2002; Noël *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HrcU ebenso wie die Homologen aus tierpathogenen Bakterien proteolytisch gespalten wird.

Unklar ist jedoch, welche Bedeutung die Spaltung von HrcU für die Typ III-abhängige Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* besitzt. Um dies beurteilen zu können, wurde das Prolin-Codon 265 des NPTH-Motivs von *hrcU* in ein Glycin-Codon mutiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.2). Das resultierende HrcU-Derivat HrcU_{P265G} wurde mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop vom Plasmid pDGW4MhrcU_{P265G} (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1) in *E. coli* und *X. campestris* pv. *vesicatoria* exprimiert und bakterielle Proteinextrakte mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Sowohl in *E. coli*- als auch in *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Extrakten konnte nur das vollständige HrcU_{P265G}-c-Myc-Protein, jedoch kein C-terminales Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb. 3-15 B).

Um die Bedeutung der proteolytischen Spaltung von HrcU für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* zu analysieren, wurde getestet, ob das Plasmid pDGW4MhrcU_{P265G} den Phänotyp der *hrcU*-Deletionsmutante komplementieren kann. Wie die Abb. 3-14 B zeigt, löste der Stamm 85*EΔ*hrcU*, der HrcU_{P265G}-c-Myc ektopisch exprimierte, keine Krankheitssymptome in suszeptiblen bzw. keine HR in resistenten Paprikapflanzen aus. Da ein möglicher negativer Effekt der ektopischen Expression nicht ausgeschlossen werden kann, wurde die HrcU-Punktmutation P265G mittels homologer Rekombination in das Genom der Stämme 85-10 und 85* eingeführt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.2). Die resultierenden Stämme 85-10*hrcU*_{P265G} und 85**hrcU*_{P265G} induzierten, im Gegensatz zu den Stämmen 85-10 und 85*, keine Krankheitssymptome in suszeptiblen bzw. keine HR in resistenten Paprikapflanzen (Abb. 3-15 C). Außerdem war das *in planta*-Wachstum des Stammes 85-10*hrcU*_{P265G} in suszeptiblen ECW-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm 85-10 sehr stark reduziert (Abb. 3-15 D). *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass das Translokonprotein HrpF, der Pathogenitätsfaktor HrpB2 sowie das Effektorprotein AvrBs3 nicht im Kulturüberstand des Stammes 85**hrcU*_{P265G} detektierbar waren (Abb. 3-15 E). Da AvrBs3 im Stamm 85-10

natürlicherweise nicht enthalten ist, wurde es ektopisch vom Plasmid pDSF300 (Van den Ackerveken *et al.*, 1996) exprimiert. Zusätzlich zur Sekretion wurde der Effekt der *hrcU*_{P265G}-Mutation auf die Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC untersucht. Fusionsproteine zwischen N-terminalen Bereichen von XopJ bzw. XopC mit dem Reporter AvrBs3Δ2 induzierten erwartungsgemäß die HR in AvrBs3-responsiven ECW-30R-Pflanzen, wenn sie vom Stamm 85-10 transloziert wurden (Abb. 3-15 F). Der Stamm 85-10*hrcU*_{P265G} hingegen induzierte keine HR (Abb. 3-15 F). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die proteolytische Spaltung von HrcU für die Pathogenität und Typ III-abhängige Sekretion und Translokation von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell ist.

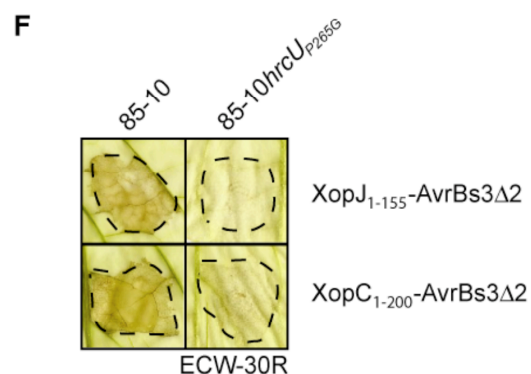
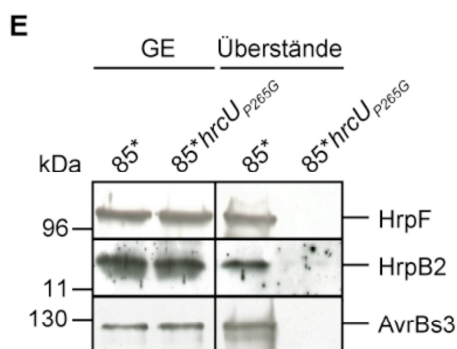
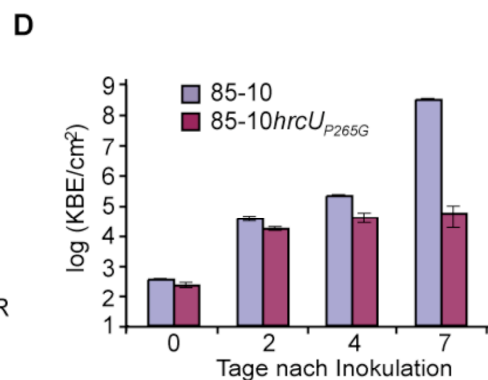
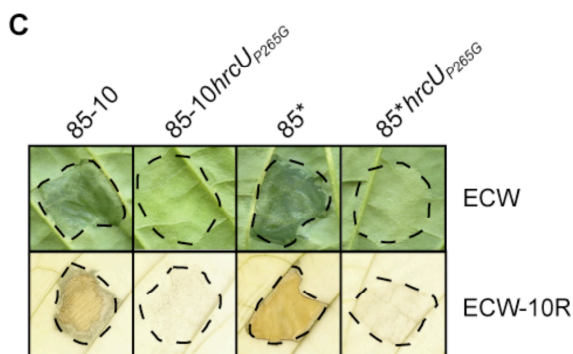
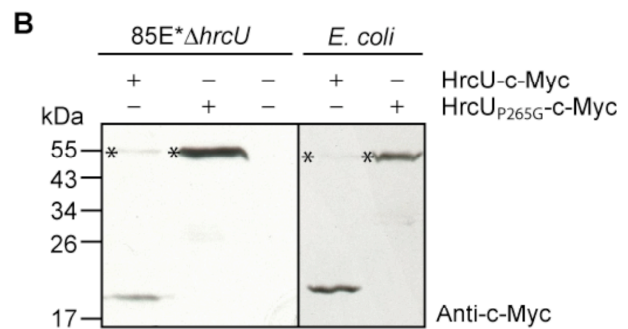
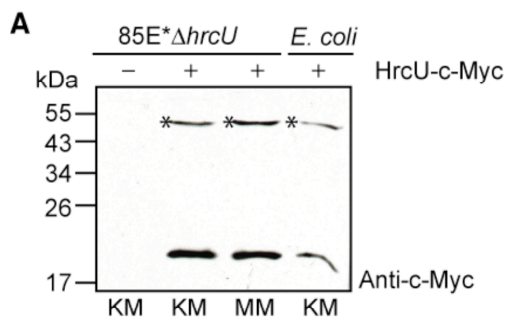


Abb. 3-15: Die proteolytische Spaltung von HrcU ist für die Typ III-abhängige Sekretion essentiell. (A) HrcU wird in *X. campestris* pv. *vesicatoria* und *E. coli* gespalten. Der *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85*EΔ*hrcU* und *E. coli*, welche HrcU-c-Myc ektopisch exprimierten (+) oder den Vektor enthielten (-), wurden in Komplexmedium (KM) oder Minimalmedium A (MM) angezogen. Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. HrcU-c-Myc ist mit einem Stern gekennzeichnet. **(B)** Eine Punktmutation im konservierten NPTH-Motiv verhindert die proteolytische Spaltung von HrcU. Der *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85*EΔ*hrcU* und *E. coli*, welche HrcU-c-Myc bzw. HrcU_{P265G}-c-Myc ektopisch exprimierten (+) oder den Vektor enthielten (-), wurden in Komplexmedium angezogen. Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. HrcU-c-Myc und HrcU_{P265G}-c-Myc sind mit einem Stern gekennzeichnet. **(C)** *hrcU*_{P265G}-Mutanten sind nicht pathogen. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85-10*hrcU*_{P265G}, 85* und 85**hrcU*_{P265G} wurden in suszeptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 5 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. **(D)** Die P265G-Mutation in HrcU führt zu einer Reduktion des bakteriellen Wachstums *in planta*. Die Stämme 85-10 und 85-10*hrcU*_{P265G} wurden in suszeptible ECW-Paprikapflanzen inokuliert und das bakterielle Wachstum über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Die dargestellten Werte sind jeweils Mittelwerte von 3 Proben aus 3 verschiedenen Pflanzen. Die Standardabweichungen sind angegeben. Das Experiment, von dem ein repräsentatives Ergebnis gezeigt wird, wurde dreimal durchgeführt. KBE = Koloniebildende Einheiten. **(E)** Die P265G-Mutation in HrcU führt zu einem Verlust der Typ III-abhängigen Sekretion. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85* und 85**hrcU*_{P265G} wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-, HrpB2- und AvrBs3-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Zur Analyse der AvrBs3-Sekretion wurde AvrBs3 ektopisch vom Plasmid pDSF300 exprimiert. **(F)** Die Translokation der Effektorproteine XopJ und XopC ist in *hrcU*_{P265G}-Mutanten inhibiert. Die Stämme 85-10 und 85-10*hrcU*_{P265G}, welche XopJ₁₋₁₅₅-AvrBs3Δ2 oder XopC₁₋₂₀₀-AvrBs3Δ2 ektopisch exprimierten, wurden in AvrBs3-responsive ECW-30R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionsstudien mit einem GST-HrcU-Fusionsprotein durchgeführt (Kapitel 3.2.10, 3.3.3 und 3.3.4). Es sollte getestet werden, ob HrcU auch als GST-Fusion proteolytisch gespalten wird. Hierfür wurden GST-HrcU sowie GST-HrcU-c-Myc vom Plasmid pGhrcU bzw. pGMhrcU (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1) in *E. coli* exprimiert und entsprechende Proteinextrakte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 3-16). Mit einem GST-spezifischen Antikörper wurde neben den vollständigen Fusionsproteinen und einigen Abbauprodukten auch ein weiteres Proteinsignal detektiert, welches vermutlich dem GST-Fusionsprotein mit abgespaltener C-terminale Domäne entspricht (Abb. 3-16). Mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper wurde neben dem vollständigen GST-HrcU-c-Myc auch das C-terminale Spaltprodukt detektiert (Abb. 3-16). Dies deutet darauf hin, dass HrcU als GST-Fusion proteolytisch gespalten wird und daher vermutlich auch korrekt gefaltet ist.

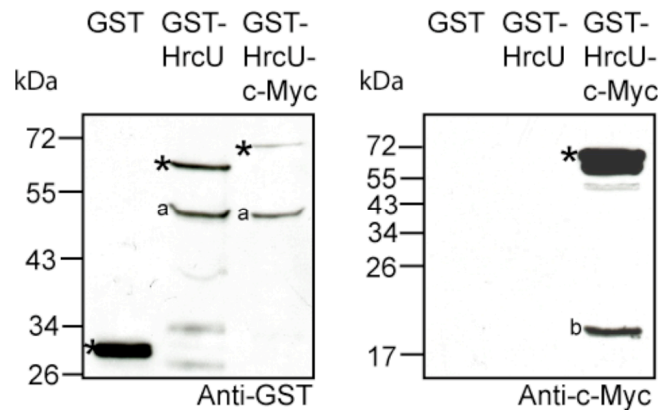


Abb. 3-16: Ein GST-HrcU-Fusionsprotein wird proteolytisch gespalten. GST, GST-HrcU und GST-HrcU-c-Myc wurden in *E. coli* exprimiert. Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und vollständige GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. „a“ kennzeichnet GST-HrcU mit abgespaltener C-terminaler Domäne. „b“ kennzeichnet die C-terminale Domäne von HrcU mit C-terminalen c-Myc-Epitop. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar.

3.3.3 HrcU interagiert mit dem Pathogenitätsfaktor HrpB2

In GST-„pull-down“-Experimenten sollte untersucht werden, ob die lösliche C-terminale Domäne von HrcU mit Typ III-abhängig sekretierten Proteinen interagiert und somit an der Substraterkennung beteiligt sein könnte. Dazu wurde eine GST-Fusion der C-terminalen Domäne von HrcU (GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇) an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche C-terminal c-Myc-Epitop-markierte Derivate der Effektorproteine XopF1, XopG bzw. XopH enthielten. Die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern ergab, dass keines der Effektorproteine im Eluat von GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ detektiert werden konnte und deutet darauf hin, dass die getesteten Effektorproteine nicht mit der C-terminalen Domäne von HrcU interagieren (Abb. 3-17 A).

Zusätzlich wurde eine mögliche Interaktion der C-terminalen Domäne von HrcU mit dem Pathogenitätsfaktor HrpB2 untersucht. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass HrpB2 Typ III-abhängig sekretiert wird und für die Typ III-abhängige Sekretion anderer Proteine essentiell ist, selbst jedoch nicht in die Pflanzenzelle transloziert wird (Lorenz *et al.*, 2008b; Rossier *et al.*, 2000). Auch wurde eine Interaktion zwischen den HrcU- und HrpB2-Homologen aus *X. axonopodis* pv. *citri* bereits in Hefe-Dihybrid-Analysen nachgewiesen (Alegria *et al.*, 2004). Wie die Abb. 3-17 A zeigt, war HrpB2-c-Myc im

Eluat von GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass HrpB2 mit der C-terminalen Domäne von HrcU interagiert. Weitere Interaktionsstudien zeigten, dass HrpB2 auch an das vollständige HrcU-Protein bindet (Abb. 3-17 B).

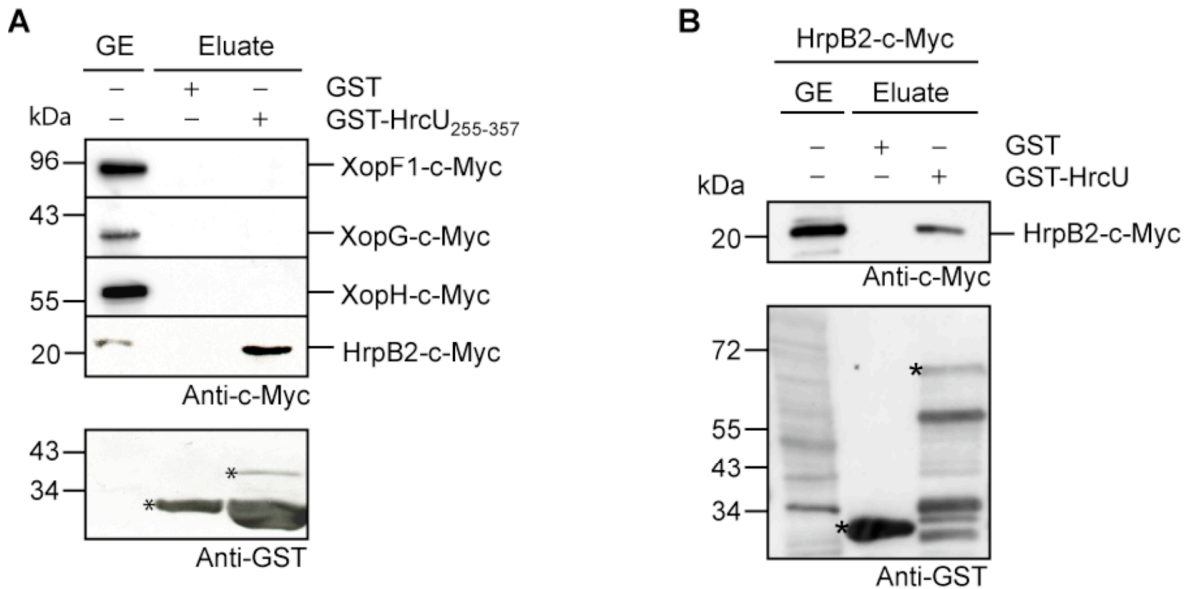


Abb. 3-17: HrcU interagiert mit HrpB2. (A) Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit HrpB2. GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche XopF1-c-Myc, XopG-c-Myc, XopH-c-Myc bzw. HrpB2-c-Myc enthielten. Gesamtzell-extrakte (GE, 5 µl) und Eluate (20 µl) wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und das vollständige GST-Fusionsprotein sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. Es ist ein repräsentativer GST-Western-Blot gezeigt. (B) HrcU interagiert mit HrpB2. GST und GST-HrcU wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrpB2-c-Myc enthielt. Gesamtzell-extrakte (GE) und Eluate wurden wie in (A) beschrieben, analysiert.

3.3.4 Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit dem Kontrollprotein HpaC

Wie in den Kapiteln 3.2.10 und 3.3.3 beschrieben, interagiert HrcU mit HrcN, HrcL und HrpB2. In weiteren Interaktionsstudien sollte eine mögliche Bindung der C-terminalen Domäne von HrcU an die Kontrollproteine des T3S-Systems, HpaA, HpaB und HpaC, analysiert werden. Hierfür wurden GST-„pull-down“-Analysen mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und C-terminal c-Myc-Epitop-markierten Derivaten von HpaA, HpaB und HpaC (exprimiert vom Plasmid pDMhpaC; Büttner *et al.*, 2006) durchgeführt. Dabei wurde eine Interaktion der C-terminalen Domäne von HrcU mit HpaC-c-Myc, nicht aber mit HpaA-c-Myc oder HpaB-c-Myc nachgewiesen (Abb. 3-18 A). Eine Bindung von HpaC-c-Myc an das

vollständige HrcU-Protein wurde jedoch nicht detektiert (Abb. 3-18 B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Interaktion zwischen HpaC und HrcU von der Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU abhängig ist, welche im Kontext des vollständigen HrcU-Proteins vermutlich unterschiedlich ist. Von HpaC ist bekannt, dass es die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen fördert, jedoch die Sekretion des Pathogenitätsfaktors HrpB2 inhibiert (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008b).

Interessanterweise besitzt der C-terminale Proteinbereich von HpaC Homologie zu einer sogenannten T3S4 (T3S substrate specificity switch)-Domäne, welche in homologen Proteinen tierpathogener Bakterien am Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems beteiligt ist (Agrain *et al.*, 2005; Minamino *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob der C-terminale Proteinbereich von HpaC für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU essentiell ist, wurden GST-„pull-down“-Experimente mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und dem Deletionsderivat HpaC₁₋₁₁₈-c-Myc (exprimiert vom Plasmid pDMhpaC₁₋₁₁₈; Lorenz *et al.*, 2008b) durchgeführt. HpaC₁₋₁₁₈ fehlen die C-terminalen 94 Aminosäuren und damit die gesamte vorhergesagte T3S4-Domäne. Wie die Abb. 3-18 A zeigt, bindet HpaC₁₋₁₁₈-c-Myc, im Gegensatz zum vollständigen HpaC, nicht an GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇. Dies lässt vermuten, dass die vorhergesagte T3S4-Domäne von HpaC für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU essentiell ist.

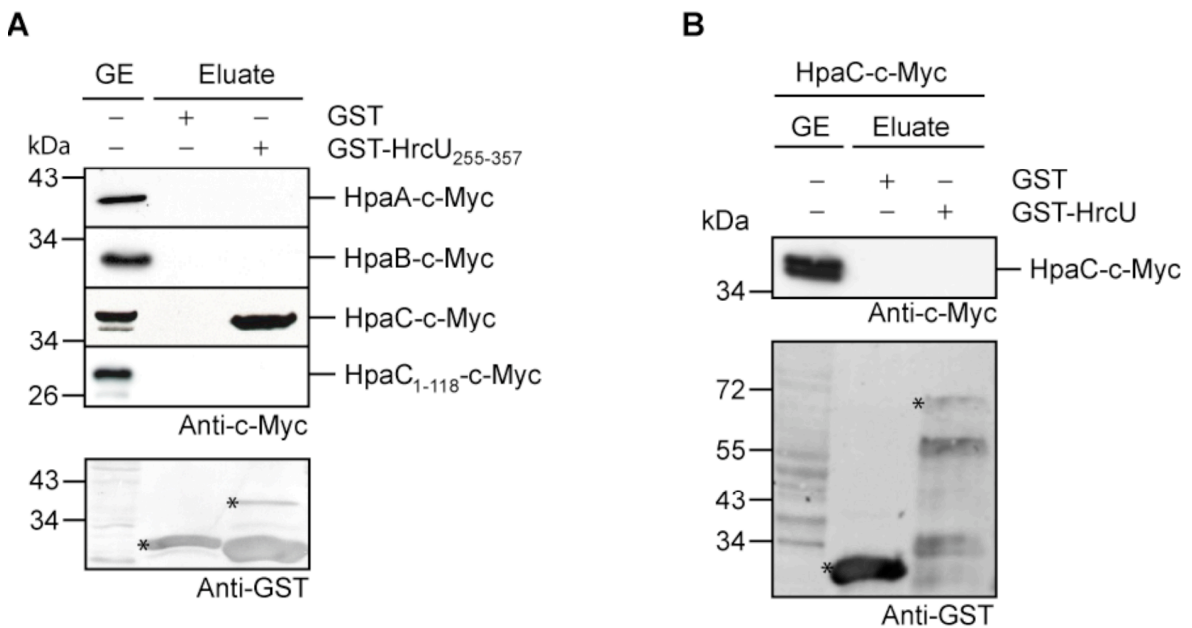


Abb. 3-18: Die C-terminale Domäne von HrcU interagiert mit HpaC. (A) GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaA-c-Myc, HpaB-c-Myc, HpaC-c-Myc bzw. HpaC₁₋₁₁₈-c-Myc enthielten. Gesamtzellextrakte (GE, 5 µl) und Eluate (20 µl) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. (B) HrcU interagiert nicht mit HpaC. GST und GST-HrcU wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaC-c-Myc enthielt. Gesamtzellextrakte (GE) und Eluate wurden wie in (A) beschrieben, analysiert.

3.3.5 Eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HrcU supprimiert den Phänotyp der *hpaC*-Mutante

Die Interaktion zwischen HpaC und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ deutet darauf hin, dass die C-terminale Domäne von HrcU am HpaC-vermittelten Wechsel der Substratspezifität beteiligt sein könnte. Die Analyse von HrcU-homologen Proteinen aus tierpathogenen Bakterien zeigte, dass bestimmte Punktmutationen in der C-terminalen Domäne dieser Proteine einen Wechsel der Substratspezifität auch in Abwesenheit eines entsprechenden T3S4-Proteins induzieren können (Edqvist *et al.*, 2003; Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob Mutationen in der C-terminalen Domäne von HrcU den Phänotyp einer *hpaC*-Deletionsmutante beeinflussen, wurde eine Punktmutation in *hrcU* eingeführt, welche zu einem Austausch des Tyrosinrestes an Aminosäureposition 318 gegen Aspartat führt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.2). Eine äquivalente Mutation des HrcU-homologen Proteins FlhB aus *S. enterica* konnte den Phänotyp einer Deletionsmutante von *fliK*, welches ein T3S4-Protein kodiert, supprimieren (Williams *et al.*, 1996). Die Punktmutation Y318D wurde in *hrcU* im Genom der *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *hpaC*, 85* und 85* Δ *hpaC* eingeführt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.2). Wie die Abb. 3-19 A zeigt, übte die *hrcU*_{Y318D}-Mutation keinen sichtbaren Einfluss auf die Pathogenität des Wildtyp-Stammes 85-10 aus. Interessanterweise führte die *hrcU*_{Y318D}-Mutation im Δ *hpaC*-Hintergrund jedoch im Vergleich zum Stamm 85-10 Δ *hpaC* zu deutlich verstärkten Krankheitssymptomen in suszeptiblen ECW-Pflanzen und einer stärkeren HR in resistenten ECW-10R-Pflanzen (Abb. 3-19 A). Ähnliche Reaktionen wurden für die Stämme 85**hrcU*_{Y318D} und 85**hrcU*_{Y318D} Δ *hpaC* beobachtet (Abb. 3-19 A).

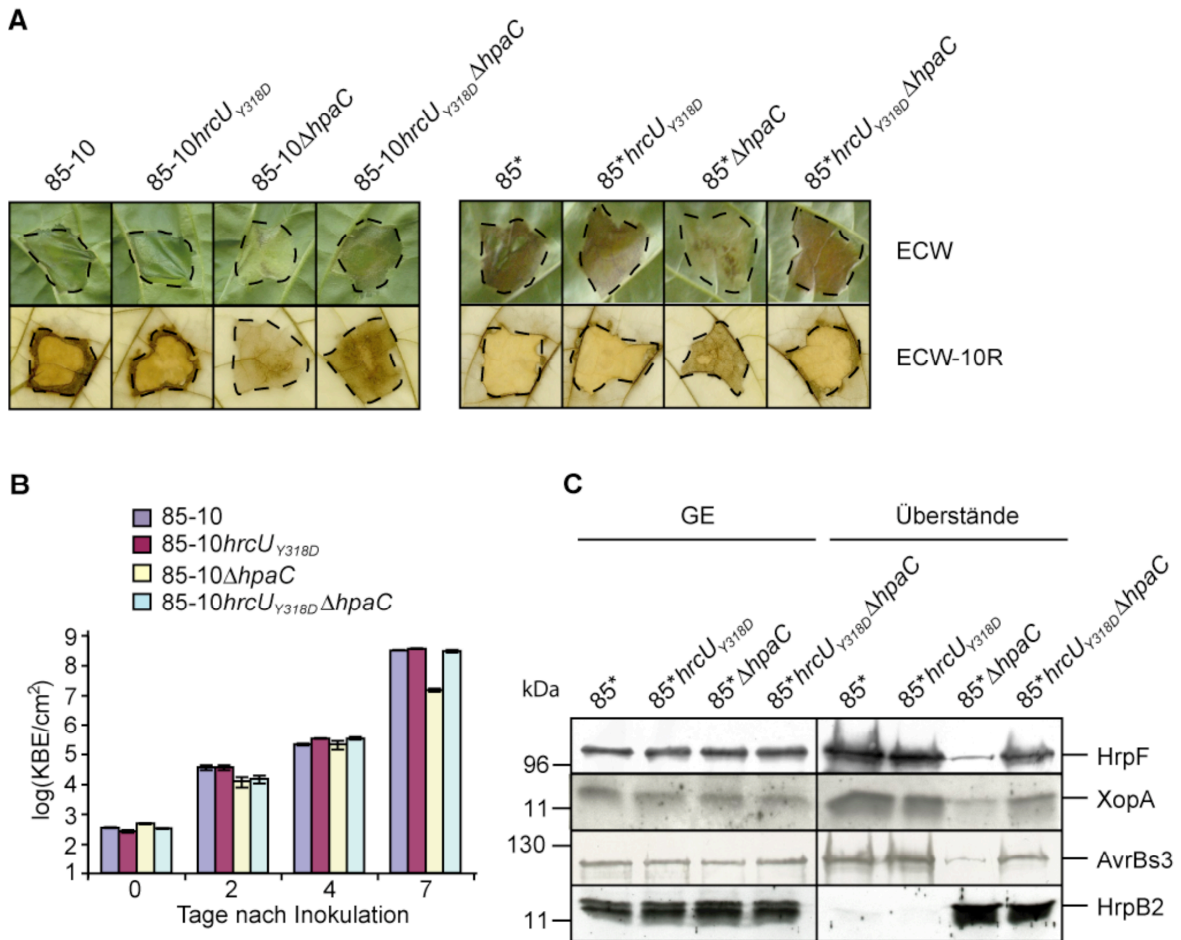


Abb. 3-19: Die HrcU-Punktmutation Y318D supprimiert den Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante. (A) *hrcU*_{Y318D} erhöht die Pathogenität der *hpaC*-Deletionsmutante. Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10, 85-10*hrcU*_{Y318D}, 85-10Δ*hpaC* und 85-10*hrcU*_{Y318D}Δ*hpaC* sowie 85*, 85**hrcU*_{Y318D}, 85*Δ*hpaC* und 85**hrcU*_{Y318D}Δ*hpaC* wurden in susceptible ECW- (OD₆₀₀=0,4) und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen (OD₆₀₀=0,2) inokuliert. Krankheitssymptome wurden 6 Tage nach der Inokulation fotografiert. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter 2 Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien zeigen die inokulierten Bereiche an. (B) *hrcU*_{Y318D} erhöht das *in planta*-Wachstum der *hpaC*-Deletionsmutante. Zur Bestimmung des Wachstum der Stämme 85-10, 85-10*hrcU*_{Y318D}, 85-10Δ*hpaC* und 85-10*hrcU*_{Y318D}Δ*hpaC* wurden die Bakterien in susceptible ECW-Paprikapflanzen inokuliert und die bakterielle Vermehrung über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Die dargestellten Werte sind jeweils Mittelwerte von 3 Proben aus 3 verschiedenen Pflanzen. Die Standardabweichungen sind angegeben. Das Experiment, von dem ein repräsentatives Ergebnis gezeigt wird, wurde dreimal durchgeführt. KBE = Koloniebildende Einheiten. (C) *In vitro*-Sekretionsanalysen mit den Stämmen 85*, 85**hrcU*_{Y318D}, 85*Δ*hpaC* und 85**hrcU*_{Y318D}Δ*hpaC*. Die Bakterien wurden in Sekretionsmedium inkubiert und Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände durch SDS-PAGE und Western-Blot mit HrpF-, XopA-, AvrBs3- und HrpB2-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Zur Analyse der AvrBs3-Sekretion wurde AvrBs3 ektopisch vom Plasmid pDSF300 exprimiert.

Zusätzlich zu den makroskopischen Analysen wurde der Einfluss der Punktmutation Y318D in HrcU auf das Wachstum der Stämme 85-10 und 85-10Δ*hpaC* in suszeptiblen

ECW-Paprikapflanzen untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im *in planta*-Wachstum der Stämme 85-10, 85-10*hrcU*_{Y318D} und 85-10*hrcU*_{Y318D} Δ *hpaC* beobachtet werden (Abb. 3-19 B). Der Stamm 85-10 Δ *hpaC* zeigte dagegen ein reduziertes Wachstum, welches bereits bekannt war (Abb. 3-19 B) (Büttner *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass die HrcU-Punktmutation Y318D den Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante bezüglich der Pathogenität und des *in planta*-Wachstums supprimieren kann.

In früheren Experimenten wurde bereits gezeigt, dass die Deletion von *hpaC* zu einer reduzierten Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen führt, die Sekretion des Pathogenitätsfaktors HrpB2 jedoch fördert (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008b). Hier durchgeführte Sekretionsanalysen zeigten, dass die *hrcU*_{Y318D}-Mutation im Stamm 85* keinen nachweisbaren Einfluss auf die Sekretion von HrpB2, der möglichen Translokonproteine HrpF und XopA und des ektopisch exprimierten Effektorproteins AvrBs3 ausübt (Abb. 3-19 C). Der Stamm 85**hrcU*_{Y318D} Δ *hpaC* führte im Vergleich zum Stamm 85* Δ *hpaC* zu einer signifikant verstärkten Sekretion von HrpF, XopA und dem ektopisch exprimierten AvrBs3, vergleichbar mit dem Stamm 85*. Die Sekretion von HrpB2 war jedoch im Vergleich zum Stamm 85* Δ *hpaC* unverändert (Abb. 3-19 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HrcU-Punktmutation Y318D den negativen Einfluss der Deletion von *hpaC* auf die Typ III-abhängige Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen kompensieren kann.

Die HrcU-Punktmutation Y318D führt zu einem Verlust der Interaktion der C-terminalen Domäne von HrcU mit HpaC und HrpB2

Wie im Kapitel 3.3.4 gezeigt, interagiert HpaC, welches vermutlich als T3S4-Protein agiert, mit der C-terminalen Domäne von HrcU und induziert dadurch möglicherweise einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems. Um zu untersuchen, ob die HrcU-Punktmutation Y318D die Interaktion der C-terminalen Domäne von HrcU mit HpaC bzw. mit HrpB2 beeinflusst, wurden GST-„pull-down“-Analysen mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ bzw. GST-HrcU_{255-357/Y318D} (exprimiert vom Plasmid pGhrcU_{255-357/Y318D}; siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1) und HpaC-c-Myc bzw. HrpB2-c-Myc durchgeführt. Wie die Abb. 3-20 A zeigt, wurden HpaC-c-Myc und HrpB2-c-Myc im Eluat von GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇, nicht aber im Eluat von GST-HrcU_{255-357/Y318D} detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die

HrcU-Mutation Y318D zum Verlust der Interaktion der C-terminalen Domäne von HrcU mit HpaC und HrpB2 führt.

Die HrcU-Punktmutation Y318D inhibiert die proteolytische Spaltung von HrcU

Als nächstes wurde der Einfluss der HrcU-Punktmutation Y318D auf die proteolytische Spaltung von HrcU untersucht. Dazu wurde ein mit einer C-terminalen c-Myc-Epitopmarkierung versehenes HrcU_{Y318D}-Derivat vom Plasmid pDGW4MhrcU_{Y318D} (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.1) in *E. coli* und *X. campestris* pv. *vesicatoria* exprimiert und bakterielle Zellextrakte mit Hilfe eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Im Gegensatz zu HrcU-c-Myc wurden größere Mengen von HrcU_{Y318D}-c-Myc detektiert, das C-terminale Spaltprodukt war dagegen nur schwach nachweisbar (Abb. 3-20 B). Dies deutet darauf hin, dass die proteolytische Spaltung von HrcU durch die Punktmutation Y318D inhibiert wird. Da HrcU_{Y318D}-c-Myc den Phänotyp der *hrcU*-Deletionsmutante 85*EΔ*hrcU* im gleichen Maß komplementiert wie HrcU-c-Myc (Abb. 3-14 B), ist HrcU_{Y318D} anscheinend trotz beeinträchtigter proteolytischer Spaltung und beeinträchtigter Interaktion mit HpaC und HrpB2 funktional.

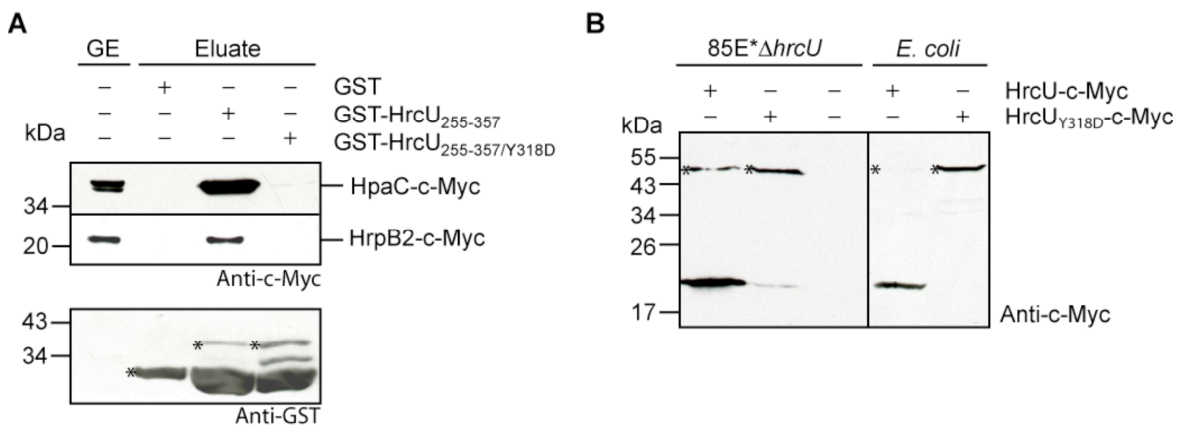


Abb. 3-20: Einfluss der HrcU-Punktmutation Y318D auf die proteolytische Spaltung von HrcU und die Interaktion von HrcU₂₅₅₋₃₅₇ mit HpaC und HrpB2. (A) HrcU_{255-357/Y318D} interagiert nicht mit HpaC und HrpB2. GST, GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und GST-HrcU_{255-357/Y318D} wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaC-c-Myc bzw. HrpB2-c-Myc enthielten. Gesamtzellextrakte (GE, 5 µl) und Eluate (20 µl) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. Es ist ein repräsentativer GST-Western-Blot gezeigt. (B) Die Punktmutation Y318D beeinträchtigt die proteolytische Spaltung von HrcU. Der *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85*EΔ*hrcU* und *E. coli*, welche HrcU-c-Myc bzw. HrcU_{Y318D}-c-Myc ektopisch exprimierten (+) oder den Vektor enthielten (-), wurden in Komplexmedium angezogen. Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. HrcU-c-Myc und HrcU_{Y318D}-c-Myc sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4. Diskussion

4.1 Die C-terminalen 50 Aminosäuren des Kontrollproteins HpaA enthalten eine Bindestelle für das T3S-Chaperon HpaB

HpaA aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist für die effiziente Sekretion von Pilus-, Translokation- und Effektorproteinen essentiell und wurde daher als ein T3S-Kontrollprotein identifiziert (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). Interessanterweise wird HpaA vom T3S-System sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert, wo es mit Hilfe von zwei Kernlokalisierungssequenzen in den Zellkern lokalisiert (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a).

Nachdem bereits in vorangegangenen Arbeiten durch *in vitro*-Studien eine Interaktion zwischen HpaA und dem T3S-Chaperon HpaB nachgewiesen wurde (Lorenz, 2005), sollte im Rahmen dieser Arbeit die HpaA-HpaB-Interaktion in *in vivo*-Untersuchungen analysiert werden. Mittels Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass HpaA und HpaB in *X. campestris* pv. *vesicatoria* miteinander interagieren, und zwar unabhängig von der Aktivität des T3S-Systems (Kapitel 3.1.1 und Lorenz *et al.*, 2008a). Dies deutet darauf hin, dass HpaA und HpaB in einem gemeinsamen Komplex im bakteriellen Cytoplasma vorliegen. *In vitro*-Interaktionsstudien ergaben, dass die C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA, die für die Virulenzfunktion von HpaA essentiell sind, eine Bindestelle für HpaB enthalten (Kapitel 3.1.1 und Lorenz *et al.*, 2008a). Die Lokalisierung der HpaB-Bindestelle im C-terminalen Bereich von HpaA ist ungewöhnlich, da sich Chaperon-Bindedomänen von Substraten von Translokations-assoziierten T3S-Systemen typischerweise im N-terminalen bzw. zentralen Bereich des Proteins befinden. So wurde in vorangegangenen Arbeiten, im Unterschied zu HpaA, die Bindestelle von HpaB im Effektorprotein AvrBs3 auf die N-terminalen 50 Aminosäuren eingegrenzt (Büttner *et al.*, 2004). Die Chaperon-Bindestelle im C-terminalen Bereich von HpaA stellt somit für Substrate des Translokations-assoziierten T3S-Systems eine Ausnahme dar und steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Funktion von HpaA, welche vermutlich nicht primär als Effektorprotein in der Wirtszelle, sondern als T3S-Kontrollprotein im Bakterium zu sehen ist. Die Beobachtung, dass HpaA ohne die C-terminalen 50 Aminosäuren nicht funktional

ist, deutet darauf hin, dass die Interaktion mit HpaB für die Virulenzaktivität von HpaA essentiell ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion der C-terminalen 50 Aminosäuren auch andere Proteinfunktionen von HpaA betroffen sind, die für die Funktionalität wichtig sind. So befindet sich in diesem Proteinbereich auch eine der beiden Kernlokalisierungssequenzen. Es gibt bisher jedoch keine Hinweise darauf, dass die Kernlokalisierung für die Virulenzfunktion von HpaA bedeutend ist (Lorenz *et al.*, 2008a). Bindestellen von Klasse IA- und Klasse IB-Chaperonen in Effektorproteinen wurden vor allem in tierpathogenen Bakterien analysiert. (Boyd *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001a; Parsot *et al.*, 2003). Eine begrenzte Proteolyse des Klasse IA-Chaperons SicP aus *Salmonella* spp., welches mit dem Effektor SptP (543 Aminosäuren) assoziiert war, bzw. SycE aus *Yersinia* spp., das den Effektor YopE (219 Aminosäuren) gebunden hatte, deuten darauf hin, dass die Aminosäurereste 35 bis 139 von SptP und 17 bis 85 von YopE durch die Bindung des Chaperons vor Degradation geschützt sind (Birtalan *et al.*, 2002; Stebbins und Galan, 2001a). Die Effektorproteine SopE (240 Aminosäuren) und SspA (212 Aminosäuren) aus *Salmonella* spp. enthalten eine Bindestelle für das Klasse IB-Chaperon InvB innerhalb der Aminosäurereste 39 bis 77 (SopE) bzw. 1 bis 158 (SspA) (Bronstein *et al.*, 2000; Ehrbar *et al.*, 2006). Die Deletion der Chaperon-Bindedomäne führt nicht zwangsläufig zu einem Funktionsverlust der Effektorproteine. So ist beispielsweise die Tyrosin-Phosphatase-Aktivität des Effektorproteins SptP durch die Deletion der Chaperon-Bindestelle nicht beeinträchtigt (Akedo und Galan, 2005).

Weiterführende Arbeiten zu HpaA in unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, (i) dass die Interaktion zwischen HpaA und HpaB im bakteriellen Cytoplasma die Sekretion von extrazellulären Komponenten begünstigt und (ii) dass HpaB nach der Sekretion von HpaA zur Sekretion von Effektorproteinen beitragen kann (Lorenz *et al.*, 2008a).

4.2 Neue Erkenntnisse zur Funktion des konservierten HrcN-Proteins

Die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation ist ein energieverbrauchender Prozess. Seit langem wird vermutet, dass die Hydrolyse von ATP durch T3S-assoziierte ATPasen die für den Sekretionsprozess benötigte Energie liefert. Der Beitrag von ATPasen zur Typ III-abhängigen Sekretion wurde vor allem in den tierpathogenen Bakterien *Salmonella* spp. (FliH, InvC), *Yersinia* spp. (YscN) und enteropathogenen *E. coli* (EscN) intensiv erforscht (Tabelle 4-1). Über T3S-assoziierte ATPasen aus pflanzenpathogenen Bakterien ist hingegen nur sehr wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde HrcN aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*, welches Homologie zur β -Untereinheit von F₀F₁-ATPasen aufweist, funktionell näher charakterisiert.

4.2.1 HrcN ist eine funktionale ATPase

Die Deletion von *hrcN* aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* führte zu einem vollständigen Verlust der bakteriellen Pathogenität und der Typ III-abhängigen Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen (Kapitel 3.2.1; Lorenz und Büttner, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass HrcN ATP *in vitro* hydrolysiert und demnach eine funktionale ATPase ist. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen wurden etwa 400 pmol Phosphat pro Minute und μg HrcN freigesetzt (Kapitel 3.2.2; Lorenz und Büttner, 2009). Eine Punktmutation (G175C) in der Walker-Box-A-Domäne von HrcN führte zum Verlust der ATPase-Aktivität. Da HrcN_{G175C} den Phänotyp und die Sekretionsdefizienz der *hrcN*-Deletionsmutante nicht komplementierte, ist zu vermuten, dass die ATPase-Aktivität für die Proteinfunktion von HrcN essentiell ist (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2; Lorenz und Büttner, 2009). Die Überexpression des katalytisch inaktiven HrcN_{G175C} im Wildtyp-Stamm zeigte einen dominant-negativen Effekt auf die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, der möglicherweise durch die Assemblierung nicht-funktionaler ATPase-Komplexe zu erklären ist (Kapitel 3.2.2; Lorenz und Büttner, 2009).

T3S-assoziierte ATPasen wurden auch in anderen Pathogenen, z.B. *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. und *Shigella* spp., als essentielle Pathogenitätsfaktoren identifiziert (Eichelberg *et al.*, 1994; Kubori *et al.*, 2000; Tamano *et al.*, 2000; Woestyn *et al.*, 1994). Die ATP-Hydrolyserate von HrcN aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist vergleichbar mit

der *in vitro* gemessenen ATPase-Aktivität von HrcN aus *P. syringae* (ca. 415 pmol Phosphat pro Minute und μg Protein; Pozidis *et al.*, 2003) und FliI des Flagellum-T3S-Systems aus *S. typhimurium* (ca. 380 pmol Phosphat pro Minute und μg Protein; Minamino und MacNab, 2000a). Die gemessene *in vitro*-Aktivität von InvC des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus *S. typhimurium* war dagegen etwas geringer (ca. 250 pmol Phosphat pro Minute und μg Protein; Eichelberg *et al.*, 1994), die von CdsN aus *Chlamydomphila pneumoniae* etwas höher (ca. 550 pmol Phosphat pro Minute und μg Protein; Stone *et al.*, 2008) als von HrcN aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Allgemein betrachtet, sind die ATP-Hydrolyseraten der ATPasen von Flagellum- und Translokations-assoziierten T3S-Systemen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien jedoch untereinander vergleichbar. Es ist möglich, dass die ATPase-Aktivität unter *in vivo*-Bedingungen, d.h. im Kontext eines aktiven T3S-Apparates und in Assoziierung mit der inneren bakteriellen Membran, signifikant höher ist. Für die ATPase FliI wurde gezeigt, dass die ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Phospholipiden etwa zehnfach gesteigert ist (Claret *et al.*, 2003). Die enzymatische Aktivität von ATPasen hängt vermutlich auch vom Oligomerisierungszustand des Proteins ab (Andrade *et al.*, 2007; Claret *et al.*, 2003). So wurde für HrcN aus *P. syringae* gezeigt, dass es in dodecamerer Form eine deutlich höhere ATPase-Aktivität (ca. 650fach) besitzt als in monomerer Form (Pozidis *et al.*, 2003).

4.2.2 HrcN interagiert mit dem T3S-Chaperon HpaB

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcN mit dem globalen T3S-Chaperon HpaB interagiert (Kapitel 3.1.2; Lorenz und Büttner, 2009), welches zur effizienten Sekretion von Effektorproteinen beiträgt (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). Interaktionen von HrcN mit den Effektorproteinen XopF1, XopC, XopG bzw. XopH wurden nicht detektiert (Kapitel 3.2.3).

Interaktionen zwischen T3S-assoziierten ATPasen und T3S-Chaperonen wurden zuvor in den tierpathogenen Bakterien *S. typhimurium* (ATPase FliI und Chaperon FlgN; ATPase InvC und Chaperon SicP) und enteropathogenen *E. coli* (ATPase EscN und Chaperon CesT) beschrieben (Akeda und Galan, 2005; Gauthier und Finlay, 2003; Thomas *et al.*, 2004). Weiterhin wurde kürzlich eine Interaktion der ATPase CdsN aus *C. pneumoniae* und dem möglichen T3S-Chaperon Cpn0706 berichtet (Stone *et al.*, 2008).

Eine direkte Interaktion zwischen T3S-assoziierten ATPasen und Effektorproteinen wurden bislang nur in einem Fall gezeigt, und zwar zwischen der ATPase EscN aus enteropathogenen *E. coli* und dem Effektorprotein Tir (Gauthier und Finlay, 2003). Diese Interaktion erfolgte unabhängig von der An- oder Abwesenheit des korrespondierenden T3S-Chaperons CesT. Im Gegensatz dazu war das Effektorprotein SptP aus *S. typhimurium* nur in Anwesenheit des T3S-Chaperons SicP in einem Komplex mit der ATPase InvC zu detektieren (Akeda und Galan, 2005). Ähnliches wurde auch für T3S-Substrate aus *S. typhimurium* berichtet, deren Bindung an die ATPase FliI nur in Anwesenheit des T3S-Chaperons FlgN detektiert werden konnte. Jedoch konnte FlgN nicht alleine an die ATPase binden, sondern nur wenn es ein entsprechendes T3S-Substrat gebunden hatte und unterscheidet sich in dieser Hinsicht von HrcN (Thomas *et al.*, 2004). Die Erkennung von Effektorproteinen durch ATPasen benötigt möglicherweise einen teilentfalteten Zustand des Effektors, der durch die Bindung des Chaperons vermittelt werden könnte. Kokristallstrukturen von Chaperon-Effektor-Komplexen aus tierpathogenen Bakterien, z.B. von SycE/YopE- und SycH/YopH-Interaktionen aus *Yersinia* spp., zeigten, dass Chaperon-gebundene Effektoren im Bereich der meist in der N-terminalen Region befindlichen Chaperon-Bindedomäne entfaltet sind. Diese Struktur ist vermutlich für die Erkennung durch den T3S-Apparat entscheidend (Birtalan *et al.*, 2002; Neumayer *et al.*, 2004; Stebbins und Galan, 2001a; Wilharm *et al.*, 2007).

4.2.3 HrcN dissoziiert einen HpaB-Effektorprotein-Komplex

Mit Hilfe einer von Akeda *et al.* beschriebenen *in vitro*-Methode (Akeda und Galan, 2005) wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass HrcN, nicht jedoch HrcN_{G175C}, einen Komplex aus dem Effektorprotein XopF1 und HpaB ATP-abhängig dissoziiert (Kapitel 3.2.3; Lorenz und Büttner, 2009). Die ATPase-Aktivität von HrcN könnte demnach wichtig für die Freisetzung von HpaB-gebundenen Effektoren am T3S-Apparat sein (Abb. 4-1).

Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor für die ATPase InvC aus *S. typhimurium* beschrieben, welche einen aus dem Chaperon SicP und dem Effektorprotein SptP bestehenden Komplex dissoziierte (Akeda und Galan, 2005). Die Freisetzung Chaperon-gebundener Effektoren könnte demnach eine zentrale Rolle von T3S-assoziierten ATPasen sein.

Es ist anzunehmen, dass HpaB sich nach der Entladung des Effektorproteins am T3S-Apparat von HrcN ablöst bzw. von einem noch unbekanntem Faktor abgelöst wird, so dass der nächste HpaB-Effektor-Komplex binden kann. In *S. typhimurium* werden entladene Chaperone durch FliJ von der ATPase FliI des Flagellum-T3S-Systems abgelöst (Evans *et al.*, 2006). Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für Translokations-assoziierte T3S-Systeme existiert, ist noch ungeklärt. FliJ-homologe Proteine wurden in diesen Systemen nicht identifiziert. Es sind jedoch direkt stromabwärts der Gene, welche T3S-assoziierte ATPasen kodieren, Gene identifizierbar, welche Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht und ähnlicher Ladung wie FliJ kodieren (Evans *et al.*, 2006). Dazu zählt neben *invI/spaM* (*Salmonella* spp.), *yscO* (*Yersinia* spp.) und *spa13* (*Shigella* spp.) auch *hrpB7* aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*, welches funktionell noch nicht charakterisiert wurde (Evans *et al.*, 2006). Ob diese Gene tatsächlich Proteine kodieren, die eine ähnliche Funktion wie FliJ ausüben, muss erst noch untersucht werden.

Die Rolle von HrcN muss allerdings über die Dissoziation von HpaB-Effektorprotein-Komplexen hinausgehen, da HrcN auch für die Sekretion von T3S-Substraten essentiell ist, welche HpaB-unabhängig sekretiert werden wie das Pilusprotein HrpE, die möglichen Translokonproteine HrpF und XopA sowie der Pathogenitätsfaktor HrpB2 (Kapitel 3.2.1; Lorenz und Büttner, 2009). T3S-Chaperone, welche die Sekretion dieser Proteine fördern, wurden in *X. campestris* pv. *vesicatoria* noch nicht identifiziert. Die effiziente Sekretion von HrpF und XopA ist jedoch abhängig vom Kontrollprotein HpaC, das an Translokon- und Effektorproteine sowie an die konservierten Komponenten HrcU und HrcV des T3S-Systems bindet (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008b). Es wurde daher spekuliert, dass HpaC Translokon- und Effektorproteine an den T3S-Apparat heranführt und somit zu deren Sekretion beiträgt. Es bleibt zu untersuchen, ob HrcN mit HpaC interagiert und HpaC-gebundene Translokonproteine freisetzt. Der genaue Mechanismus, welcher der HrcN-vermittelten Sekretion von extrazellulären Komponenten des T3S-Systems zugrunde liegt, ist noch zu erforschen.

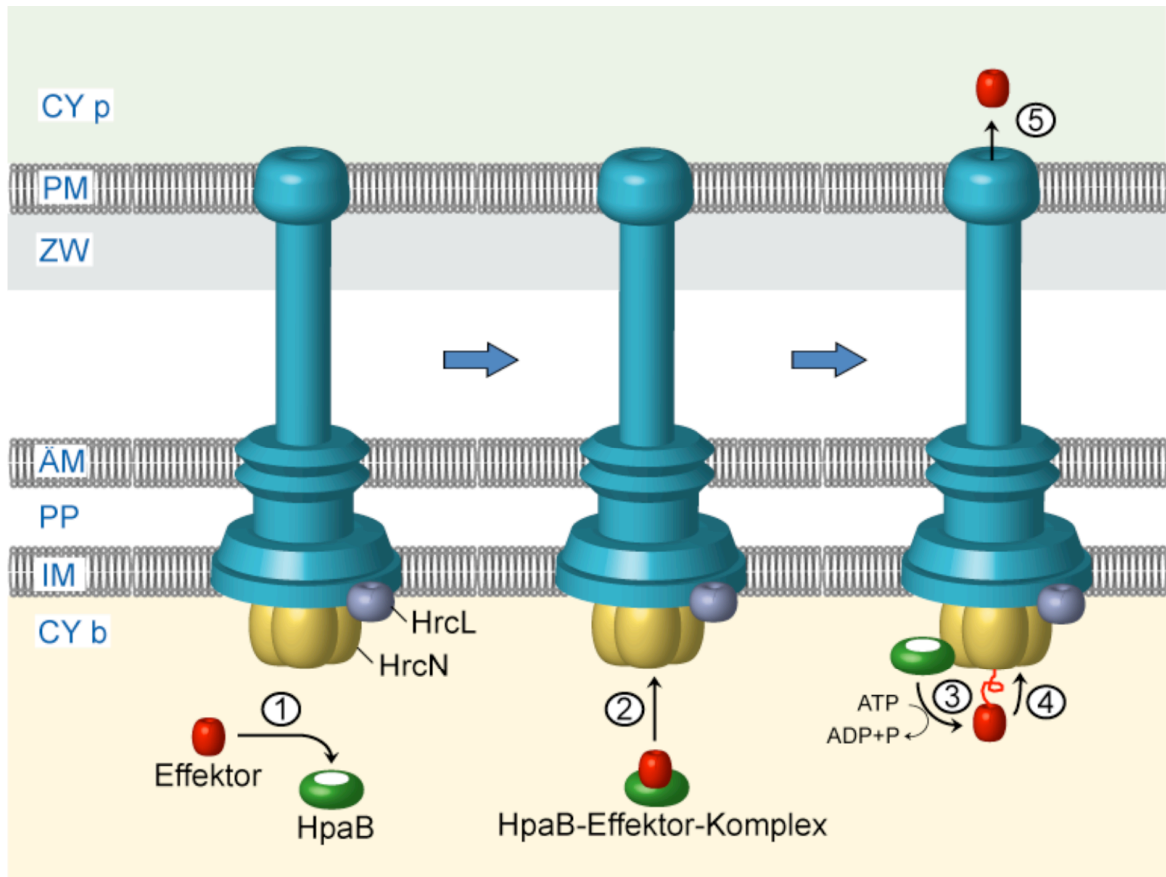


Abb. 4-1: Modell der Effektorproteintranslokation in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Effektorproteine werden im bakteriellen Cytoplasma vom T3S-Chaperon HpaB gebunden (1) und an den T3S-Apparat herangeführt, wo die ATPase HrcN als Andockstelle dienen könnte (2). HrcN bildet mit dem möglichen Regulator HrcL einen Komplex, der peripher mit dem T3S-System assoziiert ist, wahrscheinlich mittels Interaktionen mit konservierten Komponenten des Sekretionsapparates. In einem weiteren Schritt dissoziiert HrcN den HpaB-Effektor-Komplex unter ATP-Verbrauch (3), so dass das Effektorprotein freigesetzt wird und nach Entfaltung in den Exportkanal eintreten kann (4), um anschließend sekretiert und in die pflanzliche Wirtszelle transloziert zu werden (5). CY b = bakterielles Cytoplasma, CY p = pflanzliches Cytoplasma, IM = innere bakterielle Membran, AM = äußere bakterielle Membran, PP = Periplasma, PM = Plasmamembran, ZW = pflanzliche Zellwand.

Entfaltet HrcN T3S-Substrate?

Wenn man berücksichtigt, dass der innere Durchmesser des Exportkanals von T3S-Systemen im Durchschnitt nur 2-3 nm beträgt und somit zu eng für den Transport von gefalteten Proteinen ist, scheint es offensichtlich, dass T3S-Substrate vor ihrer Sekretion zumindest teilweise entfaltet werden müssen (Blocker *et al.*, 2001; Hoiczky und Blobel, 2001; Marlovits *et al.*, 2004). Diese Aufgabe wird vermutlich von T3S-assoziierten ATPasen erfüllt. Akeda *et al.* zeigten, dass die ATPase InvC das Effektorprotein SptP nach Ablösung des Chaperons SicP ATP-abhängig entfaltet (Akeda und Galan, 2005). Zugabe von InvC, nicht aber von dem katalytisch inaktiven Derivat InvC_{K165E}, zu SicP/SptP-Komplexen führte zu signifikanten Änderungen der Proteinkonformation der Tyrosin-

Phosphatase SptP, welche sich in Form einer erhöhten Proteaseempfindlichkeit und einer drastischen Reduktion der enzymatischen Aktivität äußerte. Da bisher für Effektorproteine aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* noch keine *in vitro* messbare enzymatische Aktivität gezeigt wurde, konnte eine Rolle von HrcN bei der Entfaltung von T3S-Substraten in ähnlichen Experimenten nicht untersucht werden. Falls für ein Effektorprotein aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden kann, sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob das globale T3S-Chaperon HpaB an dieses Effektorprotein bindet und ob HrcN einen Einfluss auf die Aktivität des HpaB-gebundenen Effektors ausübt.

4.2.4 HrcL - ein Regulator von HrcN?

In vitro- und *in vivo*-Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcN mit dem konservierten HrcL-Protein interagiert, welches zur FliH/YscL-Familie gehört. Es wurde zudem ein positiver Einfluss von HrcL auf die Proteinstabilität von HrcN beobachtet (Kapitel 3.2.4, 3.2.5; Lorenz und Büttner, 2009). Interaktionen zwischen HrcL-Homologen und T3S-assoziierten ATPasen wurden bereits für die tierpathogenen Bakterien *Salmonella* spp. (FliH und ATPase FliI), *Yersinia* spp. (YscL und ATPase YscN) sowie *Shigella* spp. (MxiN und ATPase Spa47) beschrieben (Blaylock *et al.*, 2006; Jouihri *et al.*, 2003; Minamino und MacNab, 2000b). Einen Einfluss von Mitgliedern der FliH/YscL-Familie auf die Proteinstabilität der korrespondierenden ATPasen wurde bislang nicht berichtet. Für einige HrcL-Homologe konnte jedoch gezeigt werden, dass sie die enzymatische Aktivität von ATPasen regulieren. So ist die *in vitro*-Aktivität von FliI aus *S. typhimurium* und von YscN aus *Y. enterocolitica* in Anwesenheit von FliH bzw. YscL reduziert (Blaylock *et al.*, 2006; Minamino und MacNab, 2000a). Da HrcL nicht in hinreichender Qualität und Quantität gereinigt werden konnte, konnte ein möglicher regulatorischer Einfluss von HrcL auf die ATPase-Aktivität von HrcN leider nicht analysiert werden.

Interessanterweise beeinträchtigten erhöhte Mengen von HrcL die Pathogenität und Typ III-abhängige Sekretion von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Dies könnte auf einer Inhibierung der ATPase-Aktivität von HrcN und/oder auf einer Blockierung des T3S-Systems durch gesteigerte HrcL-Proteinmengen beruhen. Dieser negative Effekt wurde durch gleichzeitig gesteigerte Mengen von HrcN partiell kompensiert. Es ist daher

anzunehmen, dass das stöchiometrische Verhältnis zwischen HrcN und HrcL wichtig ist. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor für das HrcL-homologe Protein FliH und die ATPase FliI aus *S. typhimurium* berichtet (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2002; Minamino und MacNab, 2000a).

4.2.5 Membranassoziiierung von HrcL und HrcN

Die Ergebnisse von Fraktionierungsstudien zeigten, dass HrcL und HrcN unter T3S-restriktiven Bedingungen sowohl im bakteriellen Cytoplasma als auch an den bakteriellen Membranen lokalisiert sind (Kapitel 3.2.9; Lorenz und Büttner, 2009). Dies stimmt mit der zuvor beschriebenen subzellulären Lokalisierung von HrcN überein (Rossier *et al.*, 2000). Interessanterweise war unter T3S-induzierenden Bedingungen eine Verlagerung von HrcL und HrcN aus dem Cytoplasma an die bakteriellen Membranen zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Aktivierung des T3S-Systems ATP-Komplexe aus dem Cytoplasma an den membranständigen Sekretionsapparat rekrutiert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden für T3S-assoziierte ATPasen von anderen Pathogenen noch nicht beschrieben. Es ist anzumerken, dass die Membranlokalisierung von HrcN unabhängig von HrcL erfolgte und umgekehrt. Eine Verlagerung aus dem Cytoplasma an die bakteriellen Membranen unter T3S-induzierenden Bedingungen wurde auch für das T3S-Chaperon HpaB beobachtet (Kapitel 3.2.9; Lorenz und Büttner, 2009). Da HrcL und HpaB für diese Analysen von Plasmiden unter der Kontrolle eines starken Promotors exprimiert wurden, können Überexpressionseffekte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die subzelluläre Lokalisierung dieser Proteine sollte daher nach Expression von einem schwächeren bzw. dem nativen Promotor überprüft werden.

Die Membranassoziiierung von HpaB, HrcL und HrcN unter T3S-induzierenden Bedingungen könnte durch Interaktionen mit konservierten Komponenten des T3S-Systems, die in der inneren bakteriellen Membran lokalisiert sind, begünstigt werden. Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde in vorangegangenen Arbeiten eine Interaktion von HpaB mit der konservierten Komponente HrcV des T3S-Apparates gezeigt (Büttner *et al.*, 2006), welche auch für homologe Proteine aus *X. axonopodis* pv. *citri* beschrieben wurde (Alegria *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von HrcL bzw. HrcN mit dem konservierten HrcU-Protein detektiert werden, welches in der inneren

bakteriellen Membran lokalisiert ist und neben vier Transmembranhelices auch eine C-terminale cytoplasmatische Domäne aufweist, die proteolytisch gespalten wird (siehe Kapitel 3.3.2). Für HrcN konnte eine Bindung an die C-terminale Domäne von HrcU, nicht aber an das vollständige HrcU-Protein beobachtet werden. Interaktionen mit der C-terminalen Domäne von HrcU sind vermutlich von einer bestimmten Konformation abhängig, welche im Kontext des vollständigen HrcU-Proteins geändert ist (siehe auch Kapitel 4.3.3). Im Gegensatz dazu interagiert HrcL mit dem vollständigen HrcU-Protein, nicht aber mit der C-terminalen Domäne von HrcU. Dies lässt vermuten, dass HrcL und HrcN nicht um dieselbe HrcU-Bindestelle konkurrieren und dass die Bindung von HrcN an HrcU von einer bestimmten Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU begünstigt wird. Es ist denkbar, dass die Aktivierung des T3S-Systems zu Konformationsänderungen von membranständigen Komponenten des Sekretionsapparates führt, welche die Anlagerung von ATPase-Komplexen fördern (siehe auch Kapitel 4.3.1 und Abb. 4-2).

4.2.6 Typ III-abhängige Sekretion in Abwesenheit von HrcN?

Die Annahme, dass T3S-assoziierte ATPasen für die Typ III-abhängige Sekretion essentiell sind, wurde kürzlich durch zwei Publikationen in Frage gestellt (Minamino und Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Substraten des Flagellum-T3S-Systems aus *S. enterica*, wenn auch mit geringerer Effizienz, auch in Abwesenheit der ATPase FliI und ihres Regulators FliH stattfinden kann. Die FliI/FliH-unabhängige Sekretion konnte durch Punktmutationen in den konservierten Komponenten FlhA und FlhB des Flagellum-T3S-Systems deutlich gesteigert werden (Minamino und Namba, 2008). Es wurde daher postuliert, dass die ATPase nur am Eintritt der Substrate in den Exportkanal des T3S-Apparates beteiligt ist, für die Passage durch das T3S-System jedoch entbehrlich ist. Punktmutationen in FlhA und FlhB sind vermutlich mit Konformationsänderungen dieser Proteine verbunden, die den Eintritt der Substrate in den Exportkanal in Abwesenheit von FliI und FliH erleichtern. Die anschließende Entfaltung und Sekretion der Substrate wird durch die protonenmotorische Kraft (PMK) angetrieben (Minamino und Namba, 2008).

Im Gegensatz zur *fli/fliH*-Doppelmutante in *S. enterica* war eine *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrcLhrcN*-Doppelmutante T3S-defizient und nicht pathogen (Kapitel 3.2.8; Lorenz und Büttner, 2009). Der Phänotyp der Mutante konnte auch nicht durch die Einführung der P24T-Punktmutation in das FlhB-Homolog HrcU revertiert werden, obwohl eine äquivalente Mutation in *S. enterica* die bakterielle Motilität und Typ III-abhängige Sekretion in der *fli/fliH*-Doppelmutante signifikant steigern konnte (Minamino und Namba, 2008). Es gibt also keine Hinweise darauf, dass die ATPase HrcN für die Typ III-abhängige Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* entbehrlich ist. Dies schließt nicht aus, dass neben ATP auch andere Energiequellen wie die PMK zum T3S-Prozess in *X. campestris* pv. *vesicatoria* beitragen. In der Tat war die Typ III-abhängige Sekretion in Anwesenheit des Protonophors CCCP, einem PMK-Inhibitor, reduziert (Kapitel 3.2.8; Lorenz und Büttner, 2009). Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor auch für das Translokations-assoziierte T3S-System von *Y. enterocolitica* berichtet (Wilharm *et al.*, 2004). Da das Wachstum von *X. campestris* pv. *vesicatoria* in Flüssigmedium nach CCCP-Zugabe reduziert war, ist jedoch anzunehmen, dass das Protonophor auch mit anderen zellulären Prozessen interferiert. Die reduzierte Typ III-abhängige Sekretion in Anwesenheit von CCCP kann daher nicht als ein Beweis einer direkten Beteiligung der PMK am Sekretionsprozess angesehen werden.

Es ist weiterhin anzumerken, dass im Gegensatz zu den mit dem Flagellum assoziierten Proteinen MotA und MotB noch keine durch die PMK angetriebenen Motorkomponenten von Translokations-assoziierten T3S-Systemen identifiziert wurden (Blair, 2003; Wilharm *et al.*, 2007). Eventuell unterscheiden sich Flagellum- und Translokations-assoziierte T3S-Systeme sowie tier- und pflanzenpathogene Bakterien hinsichtlich der Beteiligung verschiedener Energiequellen wie ATP oder der PMK an der Typ III-abhängigen Sekretion.

Tabelle 4-1: Charakterisierte ATPasen des T3S-Systems

ATPase	Pathogen	Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit (%) ^a	nachgewiesene ATPase-Aktivität	Interaktion mit Mitglied der FliH/YscL-Familie	Charakteristika	Referenz
Pflanzenpathogene Bakterien						
HrcN	<i>Xcv</i>	100 / 100	+	HrcL	setzt den Effektor XopF1 vom T3S-Chaperon HpaB frei	(Lorenz und Büttner, 2009)
HrcN	<i>P. syringae</i>	50 / 67	+	n.a.	bildet dodecamere Ringstruktur	(Müller <i>et al.</i> , 2006; Pozidis <i>et al.</i> , 2003)
Tierpathogene Bakterien						
InvC	<i>S. typhimurium</i>	46 / 63	+	n.a.	setzt den Effektor SptP vom T3S-Chaperon SicP frei	(Akedo und Galan, 2005; Eichelberg <i>et al.</i> , 1994)
FliI	<i>S. typhimurium</i>	48 / 63	+	FliH	ATPase-Aktivität wird reguliert durch FliH	(Fan und Macnab, 1996; Minamino und MacNab, 2000a)
YscN	<i>Y. enterocolitica</i>	60 / 73	+	YscL	ATPase-Aktivität wird reguliert durch YscL	(Blaylock <i>et al.</i> , 2006)
EscN	EPEC	46 / 64	+	n.a.	interagiert mit dem T3S-Chaperon CesT und dem Effektor Tir	(Andrade <i>et al.</i> , 2007; Gauthier und Finlay, 2003)
Spa47	<i>S. flexneri</i>	46 / 64	-	MxiN	Interaktion mit MxiN ist nicht essenziell für Effektorsekretion	(Jouhri <i>et al.</i> , 2003)
CdsN	<i>C. pneumoniae</i>	53 / 69	+	n.a.	interagiert mit dem möglichen T3S-Chaperon Cpn0706	(Stone <i>et al.</i> , 2008)

^a in Bezug auf HrcN von *X. campestris pv. vesicatoria*. n.a. = nicht analysiert.

4.3 Neue Erkenntnisse zur Funktion des konservierten HrcU-Proteins

Das T3S-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria* sekretiert Pilus-, Translokon- und Effektorproteine. Es ist daher naheliegend, dass die Sekretion von Pilus- und Translokonproteinen zeitlich vor der Sekretion von Effektorproteinen erfolgt, da der Aufbau der extrazellulären Komponenten des Sekretionsapparates die Voraussetzung für die Proteintranslokation in die pflanzliche Wirtszelle ist. Eine wichtige Frage ist daher, wie die Typ III-abhängige Sekretion der verschiedenen Substratklassen zeitlich reguliert wird. Hierzu war aus pflanzenpathogenen Bakterien noch nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass HrcU an der Regulation der Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* beteiligt ist. HrcU ist in der inneren bakteriellen Membran lokalisiert und gehört zur konservierten FlhB/YscU-Familie. HrcU besitzt vier Transmembranhelices und eine cytoplasmatische Domäne, welche in homologen Proteinen von tierpathogenen Bakterien proteolytisch gespalten wird (Berger, 2005; Fraser *et al.*, 2003; Sorg *et al.*, 2007).

4.3.1 Die Bedeutung der proteolytischen Spaltung von HrcU

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HrcU sowohl in *X. campestris* pv. *vesicatoria* als auch in *E. coli* proteolytisch gespalten wird (Kapitel 3.3.2 und Lorenz *et al.*, 2008b). Die Spaltung wird demnach nicht von einer *X. campestris* pv. *vesicatoria*- oder Pathogenspezifischen Protease vermittelt, sondern erfolgt vermutlich autokatalytisch. Für HrcU-homologe Proteine aus tierpathogenen Bakterien wurde ein autokatalytischer Mechanismus postuliert, der eine Zyklisierung des Asparaginrestes des konservierten NPTH-Aminosäuremotivs beinhaltet und zur proteolytischen Spaltung zwischen dem Asparagin- und dem Prolinrest führt (Ferris *et al.*, 2005; Wiesand *et al.*, 2008; Zarivach *et al.*, 2008). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, ist das NPTH-Motiv auch für die proteolytische Spaltung von HrcU aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell (Kapitel 3.3.2). Die Einführung einer HrcU-Punktmutation im NPTH-Motiv (P265G) in das Genom von *X. campestris* pv. *vesicatoria* führte zu einem vollständigen Verlust der bakteriellen Pathogenität und der Typ III-abhängigen Sekretion. Dies deutet darauf hin, dass die

proteolytische Spaltung von HrcU für die Aktivität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell ist.

Die Bedeutung der proteolytischen Spaltung von HrcU-homologen Proteinen für die Typ III-abhängige Sekretion wurde bereits für einige Vertreter der FlhB/YscU-Familie aus tierpathogenen Bakterien beschrieben. Eine Punktmutation des NPTH-Motivs von EscU (EscU_{P263A}) aus enteropathogenen *E. coli* führte zu einem Verlust der proteolytischen Spaltung von EscU und zum Verlust der Sekretion von Filament- (EspA), Effektor- (Tir) und Translokonproteinen (EspB/D) (Zarivach *et al.*, 2008). Dagegen resultierten Punktmutationen im NPTH-Motiv von YscU aus *Yersinia* spp. bzw. FlhB und SpaS aus *S. typhimurium* ebenfalls in ungespaltenen Proteinen, zeigten im Gegensatz zu HrcU und EscU jedoch nur Auswirkungen auf die Sekretion von bestimmten Substratklassen (Fraser *et al.*, 2003; Lavander *et al.*, 2002; Sorg *et al.*, 2007; Wiesand *et al.*, 2008; Zarivach *et al.*, 2008). YscU_{N263A} bzw. YscU_{P264A} vermittelten keinen Export der Translokonproteine LrcV, YopB und YopD, während Effektorproteine unvermindert sekretiert wurden (Lavander *et al.*, 2002; Sorg *et al.*, 2007; Wiesand *et al.*, 2008). Ebenso hatten SpaS_{N258A} bzw. SpaS_{P259A} keine Auswirkung auf die Sekretion des Effektorproteins SipA, während die Translokonproteine SipB und SipC nicht mehr nachweisbar sekretiert wurden (Zarivach *et al.*, 2008). FlhB_{N269A} vermittelte die Sekretion des Hakenproteins FliD, nicht jedoch des Filamentproteins FliC (Fraser *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass die proteolytische Spaltung von YscU, SpaS und FlhB im Gegensatz zu HrcU und EscU nicht generell essentiell für die Typ III-abhängige Sekretion ist, sondern nur für den Export von bestimmten Substraten benötigt wird. Eine Verallgemeinerung der Bedeutung der proteolytischen Spaltung von Proteinen der FlhB/YscU-Familie für die Typ III-abhängige Sekretion kann daher weder für tier- oder pflanzenpathogene Bakterien noch für Flagellum- oder Translokations-assoziierte T3S-Systeme getroffen werden.

Kürzlich konnten die Kristallstrukturen der cytoplasmatischen Domänen einiger Vertreter der FlhB/YscU-Familie aufgeklärt werden (Deane *et al.*, 2008; Wiesand *et al.*, 2008; Zarivach *et al.*, 2008). Diese zeigen eine starke strukturelle Konservierung der cytoplasmatischen Domänen von EscU (*E. coli*), SpaS (*S. enterica*), Spa40 (*S. flexneri*) und YscU (*Y. enterocolitica*). Die NPTH-Sequenz bildet eine Oberflächen-exponierte Typ II β -Schleife, die zwei β -Faltblätter verbindet und eine optimale Struktur für einen nukleophilen Angriff auf eine Seitenkette des Asparaginrestes aufweist. Strukturanalysen zeigten, dass die beiden Fragmente der cytoplasmatischen Domänen nach der

proteolytischen Spaltung assoziiert bleiben (Deane *et al.*, 2008; Minamino und Macnab, 2000c). Die Spaltung verändert nicht die Gesamtstruktur der cytoplasmatischen Domäne, sondern führt zu geringen, physiologisch jedoch hoch relevanten Änderungen in der NPTH-Region (Deane *et al.*, 2008; Wiesand *et al.*, 2008). Daher könnte die Spaltung von HrcU zu Konformationsänderungen führen, welche beispielsweise eine Anlagerung von cytoplasmatischen ATPase-Komplexen an den Sekretionsapparat erleichtern. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass (i) die ATPase HrcN und der mögliche Regulator HrcL von *X. campestris* pv. *vesicatoria* bei Aktivierung des T3S-Systems aus dem Cytoplasma an die bakteriellen Membranen verlagert werden, (ii) HrcN und HrcL mit HrcU interagieren und (iii) diese Interaktionen vermutlich von der Konformation von HrcU abhängig sind (siehe Kapitel 4.2.5). Eine Bedeutung der proteolytischen Spaltung von HrcU-homologen Proteinen für die Anlagerung von ATPase-Komplexen an den Sekretionsapparat wurde kürzlich auch für YscU aus *Y. enterocolitica* postuliert, welches mit dem ATPase-Regulator YscL interagiert (Riordan und Schneewind, 2008). Die Lokalisierung von YscL und der ATPase YscN unter T3S-induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen wurde bislang allerdings nicht analysiert.

4.3.2 HrcU interagiert mit HrpB2

In dieser Arbeit konnten keine Interaktionen zwischen der C-terminalen Domäne von HrcU und den Effektorproteinen XopF1, XopG und XopH nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.3). Weiterführende Arbeiten zeigten zudem, dass das Pilusprotein HrpE und das mögliche Translokonprotein XopA nicht an die C-terminale Domäne von HrcU binden (Lorenz *et al.*, 2008b). In dieser Hinsicht scheint sich HrcU vom homologen Protein FlhB des Flagellum-T3S-System aus *S. typhimurium* zu unterscheiden. Für die C-terminale Domäne von FlhB wurde eine zentrale Rolle bei der Erkennung von T3S-Substraten postuliert, da sie mit den Hakenkomponenten FliE, FlgB, FlgE und FlgD sowie mit den Filamentproteinen FlgK und FlgL interagiert (Minamino und Macnab, 2000b; Minamino und MacNab, 2000c). Es ist daher denkbar, dass die Bindung von T3S-Substraten an den Sekretionsapparat von *X. campestris* pv. *vesicatoria* von anderen konservierten Membrankomponenten des T3S-Systems vermittelt wird.

Interessanterweise interagiert die C-terminale Domäne von HrcU mit dem essentiellen Pathogenitätsfaktor HrpB2 (Kapitel 3.3.3 und Lorenz *et al.*, 2008b), der vermutlich als eines der ersten Substrate Typ III-abhängig sekretiert wird (Lorenz *et al.*, 2008b; Rossier *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2005). Über die Wirkungsweise von HrpB2 ist noch sehr wenig bekannt. Homologe Proteine gibt es in anderen pflanzenpathogenen Bakterien (*Xanthomonas* spp., *Burkholderia* spp. und *R. solanacearum*), was darauf hindeutet, dass HrpB2 eine wichtige Rolle spielt. Eine Interaktion zwischen HrcU- und HrpB2-Homologen wurde zuvor auch für *X. axonopodis* pv. *citri* berichtet (Alegria *et al.*, 2004).

4.3.3 HrcU und HpaC regulieren die Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Neben der HrcU-Interaktion mit HrpB2 wurde in dieser Arbeit eine Bindung des T3S-Kontrollproteins HpaC an die C-terminale Domäne von HrcU nachgewiesen. Eine Interaktion von HpaC mit dem vollständigen HrcU-Protein wurde hingegen nicht detektiert (Kapitel 3.3.4 und Lorenz *et al.*, 2008b). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die C-terminale Domäne im Kontext des vollständigen HrcU-Proteins möglicherweise eine andere Konformation und somit eine veränderte Oberflächenstruktur aufweist. Von HpaC ist bekannt, dass es für die effiziente Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen benötigt wird (Büttner *et al.*, 2006). Interessanterweise inhibiert HpaC jedoch die Sekretion von HrpB2, welches in dieser Arbeit als Interaktor von HrcU identifiziert wurde (Lorenz *et al.*, 2008b). Proteine, die wie HpaC die Sekretion verschiedener T3S-Substrate unterschiedlich regulieren, wurden auch in Flagellum- und Translokations-assoziierten T3S-Systemen identifiziert und schließen u.a. T3S4-Proteine aus tierpathogenen Bakterien ein. T3S4-Proteine sind am Wechsel der Substratspezifität von T3S-Systemen beteiligt und wurden in *S. typhimurium* (FliK, InvJ), *Y. enterocolitica* (YscP) und *S. flexneri* (Spa32) funktionell charakterisiert (Agrain *et al.*, 2005; Botteaux *et al.*, 2008; Edqvist *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2005; Hirano *et al.*, 1994; Kutsukake *et al.*, 1994; Magdalena *et al.*, 2002; Marlovits *et al.*, 2006; Moriya *et al.*, 2006; Rüssmann *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2008). FliK vom Flagellum-T3S-System aus *S. typhimurium* interagiert mit der C-terminalen Domäne des HrcU-Homologen FlhB und induziert dadurch vermutlich eine Konformationsänderung in FlhB, die zu einem Wechsel

der Substratspezifität von Haken- zu Filamentproteinen führt (Fraser *et al.*, 2003; Minamino und Macnab, 2000c). YscP, InvJ und Spa32 sind T3S4-Proteine von Translokations-assoziierten T3S-Systemen und regulieren den Wechsel der Substratspezifität von Nadel- zu Effektorproteinen (Agrain *et al.*, 2005; Botteaux *et al.*, 2008; Edqvist *et al.*, 2003; Magdalena *et al.*, 2002; Rüssmann *et al.*, 2002). Während Spa32 an die C-terminale Domäne des HrcU-homologen Proteins Spa40 bindet, konnte eine Interaktion zwischen YscP und YscU bisher nicht gezeigt werden (Botteaux *et al.*, 2008; Riordan und Schneewind, 2008). Eine mögliche Interaktion zwischen InvJ und SpaS wurde noch nicht analysiert.

T3S4-Proteine besitzen eine für den Wechsel der Substratspezifität essentielle T3S4-Domäne im C-terminalen Bereich, welche trotz geringer Sequenzähnlichkeiten strukturell konserviert ist (Agrain *et al.*, 2005; Minamino *et al.*, 2006). Die T3S4-Domäne ist nicht nur in T3S4-Proteinen von tierpathogenen Bakterien vorhanden, sondern zeigt auch eine schwache Homologie zum C-terminalen Bereich des HpaC-Homologen HpaP aus *R. solanacearum* (Agrain *et al.*, 2005). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von HpaC und HpaP ergab, dass die meisten konservierten Aminosäuren der T3S4-Domäne von HpaP auch in HpaC vorhanden sind bzw. durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt sind (siehe Anhang 3). Da ein C-terminales Deletionsderivat von HpaC (HpaC₁₋₁₁₈) nicht mit der C-terminalen Domäne von HrcU interagiert (Kapitel 3.3.4 und Lorenz *et al.*, 2008b), scheint der C-terminale Proteinbereich von HpaC für die HrcU-Interaktion essentiell zu sein. Es ist daher wahrscheinlich, dass HpaC als T3S4-Protein von *X. campestris* pv. *vesicatoria* agiert und die Spezifität des Sekretionsapparates von frühen (HrpB2) zu späteren (Translokon- und Effektorproteine) T3S-Substraten ändert. Der genaue Mechanismus des HpaC-vermittelten Wechsels der Substratspezifität ist noch ungeklärt. Er könnte auf einer HpaC-vermittelten Konformationsänderung der C-terminalen Domäne von HrcU beruhen (welche sich von der Konformation nach der proteolytischen Spaltung unterscheidet), die von der T3S4-Domäne von HpaC abhängig ist und die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen ermöglicht (Abb. 4-2).

Da HrpB2 und HpaC an die C-terminale Domäne von HrcU binden, konkurrieren sie möglicherweise um die gleiche Bindestelle. In diesem Fall würde die Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne von HrcU und HpaC die Bindung von HrpB2 an HrcU verhindern und könnte somit die HpaC-abhängige Suppression der HrpB2-Sekretion

bedingen. Da HrpB2 auch mit HpaC interagiert, gestalten sich Konkurrenzexperimente zur Klärung dieser Fragestellung jedoch schwierig (Lorenz *et al.*, 2008b).

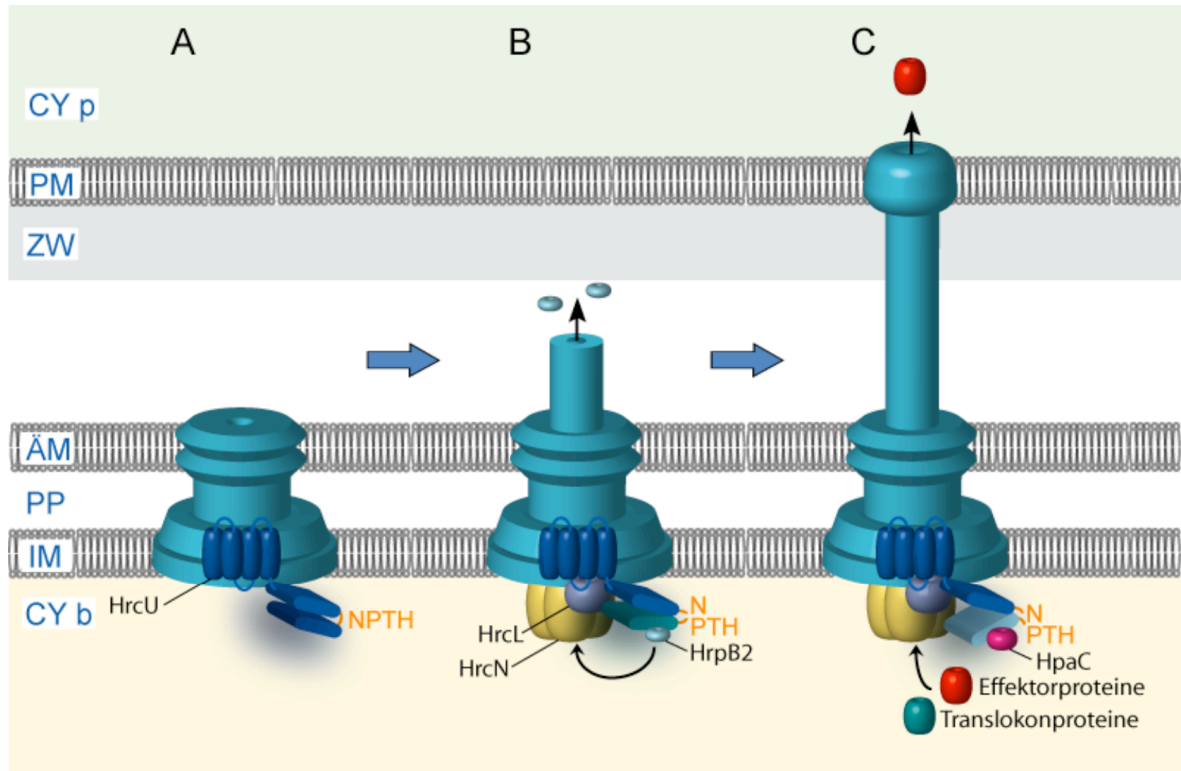


Abb. 4-2: Modell des Substratspezifitätswechsels des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Das NPTH-Aminosäuremotiv der cytoplasmatischen Domäne des integralen Membranproteins HrcU wird bei Aktivierung des T3S-Systems proteolytisch gespalten (A). Die Spaltung führt zu einer Konformationsänderung der C-terminalen Domäne von HrcU und begünstigt die Anlagerung von cytoplasmatischen ATPase-Komplexen (ATPase HrcN und möglicher Regulator HrcL) an den Sekretionsapparat und ermöglicht damit die Sekretion von frühen Substraten wie HrpB2 (B). HrpB2 stellt eine extrazelluläre Komponente des T3S-Systems dar und wird vermutlich durch Bindung an die C-terminale Domäne von HrcU als T3S-Substrat erkannt. In einem nachfolgenden Schritt bindet das Kontrollprotein HpaC an die C-terminale Domäne von HrcU und induziert eine weitere Konformationsänderung, welche zur Inhibierung der HrpB2-Sekretion führt und die Sekretion von späteren Substraten wie Translokon- und Effektorproteinen initiiert (C). Unterschiedliche Konformationen der C-terminalen Domäne sind durch verschiedene Blautöne angedeutet. AM = äußere bakterielle Membran; IM = innere bakterielle Membran; PP = Periplasma; Cy p = pflanzliches Cytoplasma; Cy b = bakterielles Cytoplasma.

4.3.4 Eine Punktmutation in der C-terminalen Domäne von HrcU supprimiert den Phänotyp der *hpaC*-Mutante

In tierpathogenen Bakterien kann die Abwesenheit von T3S4-Proteinen durch Punktmutationen in HrcU-homologen Proteinen kompensiert werden. So führt der Austausch des Tyrosinrestes des in HrcU-homologen Proteinen konservierten LARXLY-Motivs (siehe Anhang 2) gegen einen Aspartatrest in FlhB aus *S. typhimurium* (FlhB_{Y323D})

und YscU aus *Yersinia* spp. (YscU_{Y317D}) zu einem Wechsel der Substratspezifität unabhängig von den T3S4-Proteinen FliK bzw. YscP und damit zur Suppression der Phänotypen der *fliK*- und *yscP*-Deletionsmutanten (Edqvist *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde eine äquivalente Punktmutation (Y318D) in der C-terminalen Domäne von HrcU analysiert. In *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Wildtyp-Stämmen hatte *hrcU*_{Y318D} keinen Einfluss auf die bakterielle Pathogenität und die Typ III-abhängige Sekretion *in vitro* (Kapitel 3.3.5). Dies deutet darauf hin, dass der konservierte Tyrosinrest des LARXLY-Motivs für die Funktion von HrcU nicht essentiell ist. *hrcU*_{Y318D} ermöglichte jedoch die effiziente Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen auch in Abwesenheit von HpaC und supprimierte somit den Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante (Kapitel 3.3.5). Es ist denkbar, dass die C-terminale Domäne von HrcU durch die Punktmutation Y318D eine Konformation erhält, welche normalerweise durch die Bindung von HpaC induziert wird und die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen ermöglicht. Die HrcU-Punktmutation Y318D beeinflusste aber nicht die in Abwesenheit von HpaC auftretende, drastisch verstärkte HrpB2-Sekretion (Kapitel 3.3.5). Daher scheint die Inhibierung der HrpB2-Sekretion HpaC-abhängig zu bleiben und könnte auf der bereits gezeigten direkten Interaktion zwischen HpaC und HrpB2 beruhen (Lorenz *et al.*, 2008b). Alternativ könnte die C-terminale Domäne von HrcU_{Y318D} eine Konformation aufweisen, welche die gleichzeitige Sekretion von HrpB2, Translokon- und Effektorproteinen ermöglicht und sich so von der HpaC-induzierten Konformation unterscheidet, die zwar die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen erlaubt, jedoch zur Inhibierung der HrpB2-Sekretion führt. Diese Möglichkeit wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass weder HpaC noch HrpB2 in *in vitro*-Interaktionsstudien an die C-terminale Domäne von HrcU_{Y318D} banden und dass die proteolytische Spaltung von HrcU_{Y318D} stark reduziert war. Ein Einfluss von HpaC auf die proteolytische Spaltung von HrcU wurde bisher nicht festgestellt.

Interessanterweise sind alle bekannten *fliK*- und *yscP*-Suppressormutationen in der C-terminalen Domäne von FlhB bzw. YscU lokalisiert und stellen in der Regel Aminosäureaustausche hydrophober Reste gegen polare bzw. größere hydrophobe Reste dar (Edqvist *et al.*, 2003; Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996). Es wurde daher spekuliert, dass die mutierten Proteine eine leicht geänderte Konformation aufweisen, die der Konformation entspricht, welche normalerweise in Anwesenheit von FliK bzw. YscP auftritt. Strukturanalysen von Zarivach *et al.* zeigten, dass der zur HrcU-Punktmutation

Y318D äquivalente Austausch in EscU (Y316D) aus enteropathogenen *E. coli* die elektrostatischen Oberflächeneigenschaften der NPTH-Region und infolgedessen die Orientierung der PTH-Schleife verändert (Zarivach *et al.*, 2008).

Wie die Analysen in Kapitel 3.3.5 zeigten, war die proteolytische Spaltung von HrcU_{Y318D} im Vergleich zum Wildtyp-HrcU stark reduziert. Vergleichbar zu HrcU_{Y318D} zeigten *fliK*-Suppressormutanten von FlhB eine Beeinträchtigung der proteolytischen Spaltung, welche mit einer veränderten Konformation dieser Proteine und einem daraus resultierenden Schutz des NPTH-Motivs erklärt wurden (Minamino und Macnab, 2000c). Tatsächlich deuten Kristallstrukturanalysen der cytoplasmatischen Domänen von Mitgliedern der FlhB/YscU-Familie darauf hin, dass die Mutation des konservierten Tyrosinrestes des LARXLY-Motivs, welcher teilweise Oberflächen-exponiert ist und sich in räumlicher Nähe zum Prolinrest des NPTH-Motivs befindet, einen Einfluss auf die proteolytische Spaltung haben könnte (Deane *et al.*, 2008).

Der genaue Mechanismus der Suppression des Phänotyps der *hpaC*-Mutante durch HrcU_{Y381D} ist noch unbekannt. Er bietet jedoch einige Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten. So wurde u.a. beobachtet, (i) dass sich eine verstärkte Sekretion von HrpB2, welche in Abwesenheit von HpaC auftritt, nicht negativ auf die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* auswirkt und somit nicht ursächlich für den Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante ist, (ii) dass eine effiziente Sekretion von HrpB2, Translokon- und Effektorproteinen gleichzeitig erfolgen kann, (iii) dass die Interaktion zwischen HrpB2 und HrcU nicht zwingend Voraussetzung für die Sekretion von HrpB2 ist und (iv) dass eine reduzierte proteolytische Spaltung von HrcU bei einer bestimmten Konformation der C-terminalen Domäne nicht zu einer Reduktion der bakteriellen Pathogenität führen muss.

Zusammenfassend deuten die hier beschriebenen experimentellen Daten von HrcU aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* und homologer Proteinen aus tierpathogenen Bakterien darauf hin, dass die Funktion der Mitglieder der FlhB/YscU-Familie in der Regulation der Substratspezifität von T3S-Systemen auf geringen, physiologisch jedoch bedeutsamen Konformationsänderungen ihrer C-terminalen Domänen beruht.

5. Literaturverzeichnis

- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L.J. and Cornelis, G.R. (2005) Characterization of a type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, **56**, 54-67.
- Agrios, G.N. (2005) *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego.
- Aizawa, S.I. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett*, **202**, 157-164.
- Akeda, Y. and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, **437**, 911-915.
- Alegria, M.C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H., da Silva, A.C. and Farah, C.S. (2004) New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *J Bacteriol*, **186**, 6186-6197.
- Alfano, J.R. and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*, **179**, 5655-5662.
- Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 385-414.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C. and Cornelis, G.R. (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol*, **176**, 4534-4542.
- Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A. and Schneewind, O. (1999) Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12839-12843.
- Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, **278**, 1140-1143.
- Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol Microbiol*, **31**, 1139-1148.
- Andersson, K., Magnusson, K.E., Majeed, M., Stendahl, O. and Fallman, M. (1999) *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun*, **67**, 2567-2574.
- Andrade, A., Pardo, J.P., Espinosa, N., Perez-Hernandez, G. and Gonzalez-Pedrajo, B. (2007) Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys*, **468**, 121-127.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C. and Boucher, C.A. (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J*, **13**, 543-553.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.). (1996) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, **276**, 726-733.

- Berger, C. (2005) Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Birtalan, S. and Ghosh, P. (2001) Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat Struct Biol*, **8**, 974-978.
- Birtalan, S.C., Phillips, R.M. and Ghosh, P. (2002) Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell*, **9**, 971-980.
- Blair, D.F. (2003) Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett*, **545**, 86-95.
- Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M. and Schneewind, O. (2006) Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol*, **188**, 3525-3534.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol*, **39**, 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K. and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3027-3030.
- Bogdanove, A., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.-C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J. and Van Gijsegem, F. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, **20**, 681-683.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V., Staskawicz, B.J. and Stall, R.E. (1991) Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, **4**, 81-88.
- Bonas, U., Stall, R.E. and Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, **218**, 127-136.
- Botteaux, A., Sani, M., Kayath, C.A., Boekema, E.J. and Allaoui, A. (2008) Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism. *Mol Microbiol*.
- Boyd, A.P., Lambermont, I. and Cornelis, G.R. (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol*, **182**, 4811-4821.
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **41**, 459-472.
- Bronstein, P.A., Miao, E.A. and Miller, S.I. (2000) InvB is a type III secretion chaperone specific for SspA. *J Bacteriol*, **182**, 6638-6644.
- Burghout, P., van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S.A., Tommassen, J. and Koster, M. (2004) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **186**, 4645-4654.
- Buttner, C.R., Cornelis, G.R., Heinz, D.W. and Niemann, H.H. (2005) Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci*, **14**, 1993-2002.

- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L.D. and Bonas, U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol*, **54**, 755-768.
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E. and 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*. *Mol Microbiology*, **59**, 513-527.
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B. and Bonas, U. (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, **184**, 2389-2398.
- Büttner, D., Noël, L., Stuttmann, J. and Bonas, U. (2007) Characterization of the non-conserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 1063-1074.
- Canteros, B.I. (1990) Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. University of Florida.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340-348.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E.T. and Staskawicz, B. (2002) Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8336-8341.
- Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Preston, G., Yuan, J., He, S.Y. and Collmer, A. (1998) The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol*, **180**, 5211-5217.
- Cheng, L.W. and Schneewind, O. (2000) Type III machines of gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol*, **8**, 214-220.
- Claret, L., Calder, S.R., Higgins, M. and Hughes, C. (2003) Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol Microbiol*, **48**, 1349-1355.
- Coombes, B.K. and Finlay, B.B. (2005) Insertion of the bacterial type III translocon: not your average needle stick. *Trends Microbiol*, **13**, 92-95.
- Coplin, D.L. and Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, **3**, 271-279.
- Cornelis, G.R. (2002) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol*, **158**, 401-408.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 811-825.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 735-774.
- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., Do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira,

- M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., De Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade Dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C. and Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459-463.
- Daniell, S.J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F.P., Shaw, R.K., Knutton, S., Frankel, G. and Aizawa, S. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, **3**, 865-871.
- Deane, J.E., Graham, S.C., Mitchell, E.P., Flot, D., Johnson, S. and Lea, S.M. (2008) Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol*, **69**, 267-276.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S. and Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8024-8029.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Henderson, I.R. and Pallen, M.J. (2006) Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol*, **14**, 157-160.
- DeYoung, B.J. and Innes, R.W. (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol*, **7**, 1243-1249.
- Dharmapuri, S. and Sonti, R.V. (1999) A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol Lett*, **179**, 53-59.
- Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Lloyd, S.A. (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol*, **185**, 2259-2266.
- Ehrbar, K., Friebel, A., Miller, S.I. and Hardt, W.D. (2003) Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1. *J Bacteriol*, **185**, 6950-6967.
- Ehrbar, K., Winnen, B. and Hardt, W.D. (2006) The chaperone binding domain of SopE inhibits transport via flagellar and SPI-1 TTSS in the absence of InvB. *Mol Microbiol*, **59**, 248-264.
- Eichelberg, K., Ginocchio, C.C. and Galan, J.E. (1994) Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the F0F1 ATPase family of proteins. *J Bacteriol*, **176**, 4501-4510.
- Engelhardt, S., Lee, J., Gabler, Y., Kemmerling, B., Haapalainen, M.L., Li, C.M., Wei, Z., Keller, H., Joosten, M., Taira, S. and Nurnberger, T. (2008) Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *Plant J*.
- Escobar, L., Van den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. and Bonas, U. (2001) Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol*, **2**, 287-296.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q. and Alfano, J.R. (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol*, **49**, 377-387.

- Evans, L.D., Stafford, G.P., Ahmed, S., Fraser, G.M. and Hughes, C. (2006) An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17474-17479.
- Evdokimov, A.G., Phan, J., Tropea, J.E., Routzahn, K.M., Peters, H.K., Pokross, M. and Waugh, D.S. (2003) Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat Struct Biol*, **10**, 789-793.
- Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Routzahn, K.M. and Waugh, D.S. (2002) Crystal structure of the *Yersinia pestis* GTPase activator YopE. *Protein Sci*, **11**, 401-408.
- Fadoulglou, V.E., Tampakaki, A.P., Glykos, N.M., Bastaki, M.N., Hadden, J.M., Phillips, S.E., Panopoulos, N.J. and Kokkinidis, M. (2004) Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 70-75.
- Fan, F. and Macnab, R.M. (1996) Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, **271**, 31981-31988.
- Fan, F., Ohnishi, K., Francis, N.R. and Macnab, R.M. (1997) The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol Microbiol*, **26**, 1035-1046.
- Feldman, M.F. and Cornelis, G.R. (2003) The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett*, **219**, 151-158.
- Fenselau, S., Balbo, I. and Bonas, U. (1992) Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol Plant-Microbe Interact*, **5**, 390-396.
- Fenselau, S. and 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. *Mol Plant-Microbe Interact*, **8**, 845-854.
- Ferris, H.U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M.B., Kihara, M., Namba, K. and Macnab, R.M. (2005) FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem*, **280**, 41236-41242.
- Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1648-1652.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*, **9**, 275-296.
- Fraser, G.M., Hirano, T., Ferris, H.U., Devgan, L.L., Kihara, M. and Macnab, R.M. (2003) Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol*, **48**, 1043-1057.
- Fu, Z.Q., Guo, M. and Alfano, J.R. (2006) *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 harpin. *J Bacteriol*, **188**, 6060-6069.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D. and Alfano, J.R. (2007) A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, **447**, 284-288.
- Galán, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.

- Gauthier, A. and Finlay, B.B. (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 6747-6755.
- Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 771-795.
- Gonzalez-Pedrajo, B., Fraser, G.M., Minamino, T. and Macnab, R.M. (2002) Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol Microbiol*, **45**, 967-982.
- Gonzalez-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M. and Namba, K. (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol*, **60**, 984-998.
- Gophna, U., Ron, E.Z. and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, **312**, 151-163.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. and Dangl, J. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **60**, 425-449.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F. and Yin, Z. (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, **435**, 1122-1125.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. and Greenberg, J.T. (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*, **295**, 1722-1726.
- He, S.Y., Huang, H.C. and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**, 1255-1266.
- He, S.Y., Nomura, K. and Whittam, T.S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 181-206.
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T. and Aizawa, S. (2005) N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol Microbiol*, **56**, 346-360.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. and Aizawa, S. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **176**, 5439-5449.
- Hoiczyk, E. and Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4669-4674.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. and Mudgett, M.B. (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol*, **50**, 377-389.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 379-433.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U. (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol*, **29**, 1379-1390.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E. and Schaad, N.W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*, **27**, 755-762.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.

- Jouihri, N., Sory, M.P., Page, A.L., Gounon, P., Parsot, C. and Allaoui, A. (2003) MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, **49**, 755-767.
- Kao, C.C., Barlow, E. and Sequeira, L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bact*, **174**, 1068-1071.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, **318**, 648-651.
- Kearney, B. and Staskawicz, B.J. (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*, **346**, 385-386.
- Kim, J.F. and Beer, S.V. (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol*, **180**, 5203-5210.
- Kim, J.G., Jeon, E., Oh, J., Moon, J.S. and Hwang, I. (2004) Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J Bacteriol*, **186**, 6239-6247.
- Kim, J.G., Park, B.K., Yoo, C.H., Jeon, E., Oh, J. and Hwang, I. (2003) Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J Bacteriol*, **185**, 3155-3166.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z. and Dangl, J.L. (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 73-78.
- Klement, Z. (1982) Hypersensitivity. In Mount, M.S. and Lacy, G.H. (eds.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 149-177.
- Knoop, V., Staskawicz, B. and Bonas, U. (1991) Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol*, **173**, 7142-7150.
- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A. and Bonas, U. (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol*, **188**, 7652-7660.
- Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G. and Stathopoulos, C. (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol*, **187**, 4306-4314.
- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R. and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol*, **26**, 789-797.
- Kousik, C.S. and Ritchie, D.F. (1998) Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant Disease*, **82**, 181-186.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. and Galan, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10225-10230.
- Kutsukake, K., Minamino, T. and Yokoseki, T. (1994) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **176**, 7625-7629.

- Kvitko, B.H., Ramos, A.R., Morello, J.E., Oh, H.S. and Collmer, A. (2007) Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J Bacteriol*, **189**, 8059-8072.
- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P.J., Lloyd, S.A., Wolf-Watz, H. and Forsberg, A. (2002) Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol*, **184**, 4500-4509.
- Lee, J., Klusener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W. and Nurnberger, T. (2001) HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 289-294.
- Lee, S.H. and Galan, J.E. (2004) *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol*, **51**, 483-495.
- Lee, Y.H., Kolade, O.O., Nomura, K., Arvidson, D.N. and He, S.Y. (2005) Use of dominant-negative HrpA mutants to dissect Hrp pilus assembly and type III secretion in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Biol Chem*, **280**, 21409-21417.
- Lilic, M., Vujanac, M. and Stebbins, C.E. (2006) A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell*, **21**, 653-664.
- Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., Greenberg, J.T., Mansfield, J.W. and Guttman, D.S. (2005) Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 275-282.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Francis, M.S. (2001a) Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol*, **9**, 367-371.
- Lloyd, S.A., Norman, M., Rosqvist, R. and Wolf-Watz, H. (2001b) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol*, **39**, 520-532.
- Lloyd, S.A., Sjostrom, M., Andersson, S. and Wolf-Watz, H. (2002) Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol*, **43**, 51-59.
- Locher, M., Lehnert, B., Krauss, K., Heesemann, J., Groll, M. and Wilharm, G. (2005) Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J Biol Chem*, **280**, 31149-31155.
- Lorenz. (2005) Analyse des Einflusses von HpaC auf den Typ III-abhängigen Proteinexport in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lorenz, C. and Büttner, D. (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*. in press
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. and Büttner, D. (2008a) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol*, **69**, 344-360.
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. and Büttner, D. (2008b) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog*, **4**, e1000094.

- Luo, Y., Bertero, M.G., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Wenk, M.R., Creagh, L., Marcus, S.L., Lim, D., Sicheri, F., Kay, C., Haynes, C., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C. (2001) Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat Struct Biol*, **8**, 1031-1036.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. and Dangel, J. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, **108**, 743-754.
- Macnab, R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 207-217.
- Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M., Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A. and Allaoui, A. (2002) Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J Bacteriol*, **184**, 3433-3441.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M. and Galan, J.E. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*, **441**, 637-640.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E. and Unger, V.M. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, **306**, 1040-1042.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 637-646.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, **262**, 1432-1436.
- McMurry, J.L., Murphy, J.W. and Gonzalez-Pedrajo, B. (2006) The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry*, **45**, 11790-11798.
- McMurry, J.L., Van Arnam, J.S., Kihara, M. and Macnab, R.M. (2004) Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery. *J Bacteriol*, **186**, 7586-7592.
- Ménard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. and Vasselon, T. (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell*, **7984**, 515-525.
- Ménard, R., Sansonetti, P.J. and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol*, **175**, 5899-5906.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C.Q., Al Sady, B., Clark, E.T. and Staskawicz, B.J. (2005) The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, **41**, 801-814.
- Michiels, T., Vanooteghem, J.-C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P. and Cornelis, G.R. (1991) Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **173**, 4994-5009.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Minamino, T., Ferris, H.U., Moriya, N., Kihara, M. and Namba, K. (2006) Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J Mol Biol*, **362**, 1148-1158.
- Minamino, T. and Macnab, R.M. (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol*, **181**, 1388-1394.
- Minamino, T. and MacNab, R.M. (2000a) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol*, **37**, 1494-1503.
- Minamino, T. and MacNab, R.M. (2000b) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol*, **35**, 1052-1064.
- Minamino, T. and Macnab, R.M. (2000c) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol*, **182**, 4906-4914.
- Minamino, T. and Namba, K. (2008) Distinct roles of the ATPase FliI and proton motive force in bacterial flagellar export. *Nature*, **451**, 485-488.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B.J. and Stall, R.E. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant-Microbe Interact*, **3**, 41-47.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa, C. (2006) *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem*, **281**, 599-607.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M. and Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol*, **359**, 466-477.
- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U. and Staskawicz, B.J. (2000) Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 13324-13329.
- Müller, S.A., Pozidis, C., Stone, R., Meesters, C., Chami, M., Engel, A., Economou, A. and Stahlberg, H. (2006) Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol*, **61**, 119-125.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D.A. and Keen, N.T. (1994) Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid*, **31**, 275-287.
- Neumayer, W., Groll, M., Lehmann, V., Antoneka, U., Kahler, S., Heesemann, J. and Wilharm, G. (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr Purif*, **35**, 237-247.
- Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J. and Saier, M.H. (2000) Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2**, 125-144.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, **10**, 1-6.

- Noël, L., Thieme, F., Gäbler, J., Büttner, D. and Bonas, U. (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, **185**, 7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U. (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*, **41**, 1271-1281.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U. (2002) Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.*, **184**, 1340-1348.
- O'Garro, L.W., Gibbs, H. and Newton, A. (1997) Mutation in the *avrBs1* avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* influences survival of the bacterium in soil and detached leaf tissue. *Phytopathology*, **87**, 960-966.
- Ohnishi, K., Fan, F., Schoenhals, G.J., Kihara, M. and Macnab, R.M. (1997) The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol*, **179**, 6092-6099.
- Page, A.L. and Parsot, C. (2002) Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol*, **46**, 1-11.
- Page, A.L., Sansonetti, P. and Parsot, C. (2002) Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol Microbiol*, **43**, 1533-1542.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. and Demers, B. (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, **56**, 1627-1635.
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 7-14.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D. and Hughes, K.T. (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature*, **451**, 489-492.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A. and Alfano, J.R. (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7652-7657.
- Phan, J., Austin, B.P. and Waugh, D.S. (2005) Crystal structure of the *Yersinia* type III secretion protein YscE. *Protein Sci*, **14**, 2759-2763.
- Phan, J., Tropea, J.E. and Waugh, D.S. (2004) Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 1591-1599.
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A.S., Engel, A., Panopoulos, N.J., Mansfield, J., Pugsley, A.P., Karamanou, S. and Economou, A. (2003) Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem*, **278**, 25816-25824.
- Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O. (2002) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the yopQ secretion signal. *J Bacteriol*, **184**, 3321-3328.
- Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O. (2003) *Yersinia* yopQ mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol*, **50**, 1189-1198.
- Riordan, K.E. and Schneewind, O. (2008) YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol*, **68**, 1485-1501.

- Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J. and Mudgett, M.B. (2004) A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16624-16629.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. and Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*, **318**, 645-648.
- Ronald, P.C., Salmeron, J.M., Carland, F.M. and Staskawicz, B.J. (1992) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bacteriol*, **174**, 1604-1611.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F. and Martin, G.B. (2007) A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, **448**, 370-374.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol*, **38**, 828-838.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. and Bonas, U. (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9368-9373.
- Rüssmann, H., Kubori, T., Sauer, J. and Galan, J.E. (2002) Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. *Mol Microbiol*, **46**, 769-779.
- Saijo-Hamano, Y., Minamino, T., Macnab, R.M. and Namba, K. (2004) Structural and functional analysis of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA, an integral membrane component of the type III flagellar protein export apparatus in *Salmonella*. *J Mol Biol*, **343**, 457-466.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Savvides, S.N., Yeo, H.J., Beck, M.R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R. and Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo J*, **22**, 1969-1980.
- Schechter, L.M., Roberts, K.A., Jamir, Y., Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a *Cya* translocation reporter. *J Bacteriol*, **186**, 543-555.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E. and Wolf-Watz, H. (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J Bacteriol*, **178**, 7227-7233.
- Schlumberger, M.C., Muller, A.J., Ehrbar, K., Winnen, B., Duss, I., Stecher, B. and Hardt, W.D. (2005) Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12548-12553.

- Schornack, S., Ballvora, A., Gurlebeck, D., Peart, J., Baulcombe, D., Ganal, M., Baker, B., Bonas, U. and Lahaye, T. (2004) The tomato resistance protein *Bs4* is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J*, **37**, 46-60.
- Schubot, F.D., Jackson, M.W., Penrose, K.J., Cherry, S., Tropea, J.E., Plano, G.V. and Waugh, D.S. (2005) Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J Mol Biol*, **346**, 1147-1161.
- Schuch, R. and Maurelli, A.T. (2001) MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J Bacteriol*, **183**, 6991-6998.
- Schulte, R. and Bonas, U. (1992) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J Bacteriol*, **174**, 815-823.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. and Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 11638-11643.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W. and Dixon, J.E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*, **109**, 575-588.
- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T. and Aizawa, S. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol*, **64**, 1404-1415.
- Silva-Herzog, E., Ferracci, F., Jackson, M.W., Joseph, S.S. and Plano, G.V. (2008) Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein. *Microbiology*, **154**, 593-607.
- Singer, A.U., Desveaux, D., Betts, L., Chang, J.H., Nimchuk, Z., Grant, S.R., Dangl, J.L. and Sondek, J. (2004) Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure*, **12**, 1669-1681.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Muller, S.A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A. and Cornelis, G.R. (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J*, **26**, 3015-3024.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. and Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 11998-12002.
- Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., Keen, N. and Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race0 and race1 of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *J Bacteriol*, **169**, 5789-5794.
- Stebbins, C.E. and Galan, J.E. (2001a) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, **414**, 77-81.
- Stebbins, C.E. and Galan, J.E. (2001b) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature*, **412**, 701-705.
- Stone, C.B., Johnson, D.L., Bulir, D.C., Gilchrist, J.D. and Mahony, J.B. (2008) Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydomydia pneumoniae*. *J Bacteriol*, **190**, 6580-6588.

- Subtil, A., Parsot, C. and Dautry-Varsat, A. (2001) Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol*, **39**, 792-800.
- Suzuki, H., Yonekura, K. and Namba, K. (2004) Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J Mol Biol*, **337**, 105-113.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. and Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol*, **46**, 13-23.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E. and Staskawicz, B.J. (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 14153-14158.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J*, **19**, 3876-3887.
- Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. and Kokkinidis, M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, **6**, 805-816.
- Thanassi, D.G. and Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 420-430.
- 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, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorholter, F.J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. and Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, **187**, 7254-7266.
- Thieme, F., Szczesny, R., Urban, A., Kirchner, O., Hause, G. and Bonas, U. (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 1250-1261.
- Thomas, J., Stafford, G.P. and Hughes, C. (2004) Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 3945-3950.
- Thomas, N.A., Deng, W., Puente, J.L., Frey, E.A., Yip, C.K., Strynadka, N.C. and Finlay, B.B. (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **57**, 1762-1779.
- Trame, C.B. and McKay, D.B. (2003) Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 389-392.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- Van't Slot, K.A.E. and Knogge, W. (2002) A dual role of microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews In Plant Sciences*, **21**, 229-271.
- Vauterin, L., Rademaker, J. and Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, **90**, 677-682.
- Veenendaal, A.K., van der Does, C. and Driessen, A.J. (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 81-95.

- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol*, **153**, 3-11.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Wattiau, P., Woestyn, S. and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, **20**, 255-262.
- Weber, E., Berger, C., Bonas, U. and Koebnik, R. (2007) Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 559-567.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005) The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J Bacteriol*, **187**, 2458-2468.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85-88.
- Wengelnik, K. and 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*. *J Bacteriol*, **178**, 3462-3469.
- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M. and Bonas, U. (1996a) Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J Bacteriol*, **178**, 1061-1069.
- Wengelnik, K., Rossier, O. and Bonas, U. (1999) Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol*, **181**, 6828-6831.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (1996b) HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant-Microbe Interact*, **9**, 704-712.
- Whalen, M.C., Wang, J.F., Carland, F.M., Heiskell, M.E., Dahlbeck, D., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Scott, J.W., Stall, R.E. and Staskawicz, B.J. (1993) Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant-Microbe Interact*, **6**, 616-627.
- Wiesand, U., Sorg, I., Amstutz, M., Wagner, S., van den Heuvel, J., Luhrs, T., Cornelis, G.R. and Heinz, D.W. (2008) Structure of the Type III Secretion Recognition Protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol*.
- Wilharm, G., Dittmann, S., Schmid, A. and Heesemann, J. (2007) On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol*, **297**, 27-36.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J. and Trulzsch, K. (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun*, **72**, 4004-4009.
- Williams, A.W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S.I., Kawagishi, I. and Macnab, R.M. (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **178**, 2960-2970.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol*, **176**, 1561-1569.

- Wood, S.E., Jin, J. and Lloyd, S.A. (2008) YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol*, **190**, 4252-4262.
- Wulff-Strobel, C.R., Williams, A.W. and Straley, S.C. (2002) LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol Microbiol*, **43**, 411-423.
- Yip, C.K., Kimbrough, T.G., Felise, H.B., Vuckovic, M., Thomas, N.A., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Finlay, B.B., Miller, S.I. and Strynadka, N.C. (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, **435**, 702-707.
- Yip, C.K. and Strynadka, N.C. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci*, **31**, 223-230.
- Young, B.M. and Young, G.M. (2002) YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **184**, 1324-1334.
- Young, G.M., Schmiel, D.H. and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6456-6461.
- Young, M.J., Takikawa, Y., Gardan, L. and Stead, D.E. (1992) Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **30**, 67-105.
- Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H.B., Nguyen, H.V., Miller, S.I., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C. (2008) Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature*, **453**, 124-127.
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B.B. and Strynadka, N.C. (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 131-137.
- Zenk, S.F., Stabat, D., Hodgkinson, J.L., Veenendaal, A.K., Johnson, S. and Blocker, A.J. (2007) Identification of minor inner-membrane components of the *Shigella* type III secretion system 'needle complex'. *Microbiology*, **153**, 2405-2415.
- Zhu, K., Gonzalez-Pedrajo, B. and Macnab, R.M. (2002) Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochemistry*, **41**, 9516-9524.
- Zhu, W.G., Magbanua, M.M. and White, F.F. (2000) Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*, **182**, 1844-1853.

6. Anhang

Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') ^a
RT-PCR-Analysen	
RT_hrcN_forward	CGTTACGGCAAGGTGGTCGAA
RT_hrcN_reverse	AGGCCATCCACGATCCGCACG
RT_hrpB2_forward	ATGACGCTCATTCTCTGTCC
RT_hrpB2_reverse	CACCAGCGTCTGCACGGCGTT
RT_16S-rRNA_forward	TACGCTAATACCGCATAACGAC
RT_16S-rRNA_reverse	TGGCACGAAGTTAGCCGGTG
Generierung von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>-Mutanten	
hrcN_upstream_ApaI_forward	TACTGGGCCCCTCGAACAGTGTGTG
hrcN_upstream_HindIII_reverse	TACTAAGCTTGAGCGTTGTCTCCAG
hrcN_downstream_HindIII_forward	TACTAAGCTTGAAGTGTGACCAGC
hrcN_downstream_BamHI_reverse	TACTGGATCCCAACGCGCCGAGCAA
hrcN_G175C_PstI_forward	TACTCTGCAGCAGGCGTCTGCAAGA
hrcL_upstream_ApaI_forward	TACTGGGCCCCCGCTGTCCACCTCGGTA
hrcL_upstream_HindIII_reverse	TACTAAGCTTAATCCAGGCCGATCGCATCG
hrcU_P24T_upstream_XbaI_forward	TACTTCTAGAATGCTCGGCGATGGTGCACGCCA TCGTT
hrcU_P24T_upstream_Eco91I_reverse	AGATGACGGTAACCTCCCCGTCCTTGC GCGCATCC CGCA
hrcU_P24T_downstream_Eco91I_forward	TACTGAGGTTACCGTCAGCCCGGACGTCACTGCAG CG
hrcU_P24T_downstream_SalI_reverse	AGATGTCGACCTAGCATGGCAGGGCTCCATGCCGT CGCCGT
hrcU_P265G_upstream_XbaI_forward	TACTTCTAGAGCGGGATGCGCGCAAGGACGCGGA AGTTCC
hrcU_P265G_KpnI_reverse	AGATGTAATGGGTACCGTTGACCACCATCACCTTG GCCTTGGC
hrcU_P265G_KpnI_forward	TACTGTCAACGGTACCCATTACGCAGTGGCGCTGC TGGCCTAC
hrcU_P265G_downstream_BamHI_reverse	AGATTGGATCCCGGTTTGC GCGGTGCCTCATCTG CGGTCA
hrcU_Y318D_upstream_XbaI_forward	TACTTCTAGACACATGCGCGCATTGATGACGATC
hrcU_Y318D_upstream_BclI_reverse	AACCTGATCAAGCGCACGCGCCAGTGG
hrcU_Y318D_downstream_BclI_forward	GCGCTTGATCAGGTTGAATTGGGCGAT
hrcU_Y318D_downstream_SalI_reverse	AGATGTCGACATCGCCGGCCGTCATGCCGTGGT

Anhang

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') ^a
Generierung von Expressionskonstrukten	
hrcN_EcoRI_forward	TACTGAATTCATGCTGGCTGAGACG
Strep_hrcN_EcoRI_forward	TACTGAATTCATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAA ACTGGCTGAGACGCC
hrcN_SacI_reverse	AGATGAGCTCCGCATCGTCGGTCAC
hrcN_XhoI_reverse	TACTCTCGAGTCACGCATCGTCGGT
hrcL_EcoRI_forward	TACTGAATTCATGCGTCTGTGGTTGAGGT
hrcL_SacI_reverse	AGATGAGCTCGCCAGCATCCGCCGGCT
hrcU_forward_entry	CACCATGTGCGGAAGAAAAAACCGA
hrcU_reverse_entry	GCATGGCAGGGCTCC
hrcU_EcoRI_forward	TACTGAATTCATGTGCGGAAGAAAAAACCGAGAAG
hrcU_Sall_reverse	AGATGTCGACCTAGCATGGCAGGGCTCCATCGCCG TCGCCGT
hrcU_XhoI_reverse	TACTCTCGAGCTAGCATGGCAGGGC
hrcU_255-357_EcoRI_forward	TACTGAATTCGCCAAGGCCAAGGTG
hpaA_EcoRI_forward	TACTGAATTCATGATCCGTGCGCATC
hpaA_XhoI_reverse	TACTCTCGAGTCATGGGCGAACCTC
hpaA_225-275_EcoRI_forward	TACTGAATTC ^c CCAGCGCTACGCAAT
hpaA_1-200_XhoI_reverse	TACTCTCGAGCTTGTCTGACGCGGTAG
hpaA_1-225_SacI_rev	AGATGAGCTCCACCGGCTCCA ^c ACTC
xopF1_EcoRI_forward	TACTGAATTCGTGAAACTCTCCAGC
xopF1_SacI_reverse	AGATGAGCTCTGCTCGCCCGCTCTGCCA

^a Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; die Strep-Epitop-kodierende Sequenz ist kursiv dargestellt.

Anhang 2: Aminosäuresequenzvergleich von HrcU, YscU und FlhB

HrcU_Xanthomonas	1	----MS SE KEKTEKPT E KKLRDARKD GE V P VS P DVTA AA V LF G ALL V M K S AGDY F S D H M R AL
YscU_Yersinia	1	----MS SE KEKTEKPT P KK I RDARKK G Q V AK S KEV V ST L I V ALS A M L M GL S D Y Y F H L S R L
FlhB_Salmonella	1	MA EE S D DD K TE A PT P H R L E K A RE E G O I P R S R E I T S L L L L V G V C I I W F G G E S L A R O L A G M
HrcU_Xanthomonas	57	T I G F D F SE H T R D A A I N R - A L G H I G I Q G L L L M L P E L A A C L V A G M A G G A F O T G L N A S L K P
YscU_Yersinia	57	M L I P A E Q S Y L P - F S O A S Y - V V D N V L L E F F Y L C F P L L T V A A L M A I A S H V V Q Y G F L I S C E A
FlhB_Salmonella	61	L S A G L H E D H R M V N D P N L I L G Q I L L L I K A A M A L L P L A G V V L V A L I S P V M L G L I F S G S
HrcU_Xanthomonas	116	V A P K F D S L N P A T G V K K L F S L R S L I N L L K L I I K A I L I G V V L V V G I R A L M P M I I G L A Y E T P L
YscU_Yersinia	115	I K P D I K K I N P I E G A K R I F S I K S L V E F L K S I L K V V L S L I W I I I K G N I V T L L Q L P T C G I E
FlhB_Salmonella	121	L O P K F S K L N P L P G I K R M F S A O T G A E L L K A V L K S T L V G O V T G F Y L W N H W Q M R L M A E S P I
HrcU_Xanthomonas	176	D V A Q L A W R T L G M L F A L G V L L F V L V G A A D W S V O R W L F I R D K R M S K D E K R E V K E S E G D P E I
YscU_Yersinia	175	C I T P L G Q I L R Q L M V I C T V G F V V I S I A D Y A F E Y Q Y I K E L K M S K D E I K R E Y K E M E G S P E I
FlhB_Salmonella	181	V A M G N A L D L V G L C A L L V V L G V I P M V C F D V F F Q I E S H L K K L R M S R O D I R D E F K E S E G D P H V
HrcU_Xanthomonas	236	K D K R K E F A K E L V F G D P R E R V A K A K V V V N P T H Y A V A L A Y E P D D F G L P Q V V A K G V D D G A L E
YscU_Yersinia	235	K S K R R Q F H Q E I Q S G N M R E N V K R S S V V A N P T H I A I G L I Y K R G E T P L P I V T F K Y T D A Q V O T
FlhB_Salmonella	241	K G K I R O M Q R A A A Q R R M E D V P K A D V I V I N P T H Y S V A L Q Y D E N K M S A P K V V A K A G L I A R
HrcU_Xanthomonas	296	L R A F A H N Q G I P I V A N P E L A R A L Y Q V E L G D - A I P E P L E T V A V V L R W V D E L G R D H G D G A
YscU_Yersinia	295	V R K I A E E E G V P I L Q R I E L A R A L Y W D A L V D H Y I P A E Q I E A T A E V L R W L E R O N I E K Q H S E M L
FlhB_Salmonella	301	I R E I C A E H R V P T L E A P E L A R A L Y R H A E I G O Q I P C Q L M A A V A E V L A V W Q L K R W R L A G Q R
HrcU_Xanthomonas	355	L P C -----
YscU_Yersinia	355	-----
FlhB_Salmonella	361	P P Q P E N L P V P E A L D F M N E K N T D G

Aminosäuresequenzvergleich zwischen HrcU von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 („accession number“ CAJ22057), YscU von *Y. enterocolitica* („accession number“ AAD16831) und FlhB von *S. enterica* („accession number“ CAD05665) (CLUSTAL W; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Aminosäurereste mit ähnlichen chemischen Eigenschaften sind grau unterlegt. Das NPTH-Aminosäuremotiv, welches proteolytisch gespalten wird, ist rot umrandet. Das LARXLY-Motiv ist blau umrandet. Aminosäurereste, die in dieser Arbeit mutiert wurden, sind mit einem grünen Stern gekennzeichnet (P24T, P265G, Y318D).

Anhang 3: Aminosäuresequenzvergleich von HpaC und HpaP

HpaC	1	MRKPPLRHVRILPVSGALQRPAAPATPARSALRSSFLQLRQLRSLAQLALPCMVLPPQCD
HpaP	1	-MTQAVRLWRPQPVD-----PAPTRRRRTPLRT-----PGPHDALPYVPPP-----
HpaC	61	EDRPGPDAEEGFTTEAHDVSPVQTDPPRLRIEGTKHQEFSQGNDDGAVGROIATEWIRTQRA
HpaP	41	RPEPPEPVEDDFEPEPRQDTPASDPPEARTDASPPQPAADFDASLHTAAIASRLVRTCSE
HpaC	121	HMA----IDHIALRVAEFCNAQPVRSAG-SWEAWLAIDQEVVAQTTLFLRLSPDQLSLRF
HpaP	101	IGAGETMTEHLARLLSQFCASQAIRSGGECWEISLDLDPKILPETRLTLRLSPHTLSLRF
		* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HpaC	176	NTSSPDAREVLWCGKQRLEAALTSTLSSTLQISTEVV
HpaP	161	EAGHPRSRHLLSEHGDTLRQRTHALLRQQVDVELELW
		* * * *

Der C-terminale Bereich von HpaC enthält eine vorhergesagte T3S4-Domäne. Aminosäuresequenzvergleich zwischen HpaC von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 („accession number“ CAJ22055) und HpaP von *R. solanacearum* („accession number“ CAB58249) (CLUSTAL W; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Aminosäurereste mit ähnlichen chemischen Eigenschaften sind grau unterlegt. Der blaue Balken deutet die vorhergesagte T3S4-Domäne an. Sterne zeigen Aminosäurereste an, die in HpaP und Proteinen mit T3S4-Domänen konserviert sind (Agrain *et al.*, 2005).

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulla Bonas und Dr. Daniela Büttner für die Überlassung des interessanten Themas, für ihre Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Problemen und für ihr reges Interesse am Voranschreiten dieser Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Arbeitsgruppe Pflanzengenetik bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die erhaltene Unterstützung, bei Cornelius, Frank und Robert außerdem für ihre Hilfe bei Computerarbeiten. Matthias, Carola, Angelika und Bianca danke ich für ihre ausgezeichnete technische Assistenz, meinen Hiwis und Praktikanten Nadine, Maria und Thomas für die Unterstützung meiner Arbeit.

Außerdem sei an dieser Stelle noch Daniela für die freundliche Bereitstellung von Bakterienstämmen und Plasmiden sowie für ihr fleißiges, ausdauerndes und konstruktives Korrekturlesen gedankt.

Last but not least, möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle/Saale, 29.12.2008

Christian Lorenz

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Christian Lorenz
Geburtsort: Wolfen
Geburtsdatum: 31.03.1981
Wohnanschrift: Ratswall 38, 06749 Bitterfeld
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

1987 - 1991 Polytechnische Oberschule „Adolph Diesterweg“ Bitterfeld
1991 - 1999 Walther-Rathenau-Gymnasium Bitterfeld
1999 - 2000 Wehrdienst in Braunschweig
2000 - 2005 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit am Institut für Genetik in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von Dr. Daniela Büttner
Thema: Analyse des Einflusses von HpaC auf den Typ III-abhängigen Proteinexport in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
Abschluss: Diplom-Biologe

11/2005-12/2008 Promotionsarbeit am Institut für Biologie, Bereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von Dr. Daniela Büttner
Thema: Funktionelle Analyse der konservierten Komponenten HrcN und HrcU des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Halle/Saale, den 29.12.2008