

Kontrolle der Typ III-abhängigen Proteinsekretion im
pflanzenpathogenen Bakterium *Xanthomonas campestris* Pathovar
vesicatoria

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr. rer. nat. Daniela Büttner

geb. am 4. August 1974 in Leverkusen

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Petra Dersch
3. Prof. Dr. Jürgen Heesemann

Halle (Saale), 11. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien.....	1
1.2 Das pflanzenpathogene Bakterium <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> besitzt alle Typen bekannter Proteinsekretionssysteme.....	3
1.3 Das T3S-System von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor.....	4
1.3.1 Das T3S-System wird vom <i>hrp</i> -Gencluster kodiert	4
1.3.2 Aufbau des Sekretionsapparates.....	5
1.3.3 Substrate des T3S-Systems.....	6
2. Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse	7
2.1 Identifizierung möglicher Kontrollproteine des T3S-Systems.....	7
2.2 HpaC ist ein „Switch“-Protein des T3S-Systems.....	7
2.2.1 HpaC reguliert die Substratspezifität des T3S-Systems	7
2.2.2 Ein Vergleich – HpaC und T3S4-Proteine tierpathogener Bakterien	9
2.3 T3S-Chaperone in <i>Xanthomonas</i> – ein Chaperon für alle Effektorproteine?	11
2.3.1 Identifizierung der potentiellen T3S-Chaperongene <i>hpaD</i> , <i>hpaI</i> und <i>hpaB</i>	11
2.3.2 HpaB ist ein T3S-Chaperon mit einer breiten Substratspezifität für Effektorproteine	12
2.3.3 Effektorproteine unterscheiden sich im Grad ihrer HpaB-abhängigen Translokation.....	12
2.3.4 Funktion von T3S-Chaperonen bei der Effektorproteintranslokation	14
2.4 HpaA – ein Effektorprotein mit Kontrollfunktion	15
2.4.1 HpaA ist für die effiziente Typ III-abhängige Proteinsekretion essentiell	15
2.4.2 Identifizierung funktionaler Proteinregionen in HpaA	15
2.5 Die ATPase HrcN ist der Energielieferant des T3S-Systems	18
2.5.1 HrcN hydrolysiert ATP und energetisiert das T3S-System	18
2.5.2 HrcN wird durch das konservierte HrcL-Protein stabilisiert.....	18
2.5.3 Untersuchungen zur Funktion der protonenmotorischen Kraft während der Typ III-abhängigen Proteinsekretion	19
2.5.4 Die ATPase ist für die Aktivität des T3S-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> essentiell	20
2.6 Das konservierte HrcU-Protein ist am Wechsel der Substratspezifität beteiligt	21
2.6.1 HrcU wird proteolytisch gespalten	21
2.6.2 HrcU interagiert mit der ATPase HrcN und dem T3S-Chaperon HpaB	21
2.6.3 Eine Punktmutation in HrcU revertiert den Phänotyp einer <i>hpaC</i> -Deletionsmutante	22
2.6.4 Mögliche Funktionsmechanismen von HrcU und homologen Proteinen.....	23
3. Zusammenfassung und Ausblick	25
4. Literatur	27

5. Anhang	33
5.1 Der Habilitationsschrift zugrunde liegende Publikationen (2003 – 2009)	33
5.2 Gesamtverzeichnis der Publikationen.....	36
5.3 Lebenslauf.....	38
5.4 Danksagung.....	40
5.5 Eidesstattliche Erklärung.....	41

1. Einleitung

1.1 Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien grenzen sich von ihrer Umgebung durch eine innere und eine äußere Membran ab, die durch das Periplasma getrennt sind. Viele bakterielle Proteine müssen über beide Membranen transportiert werden, um an essentiellen Prozessen wie z.B. Nährstoffaufnahme, Fortbewegung, interzelluläre Kommunikation, Anheftung der Bakterien an Oberflächen oder Interaktion mit Wirtszellen teilzunehmen. Der gezielte Proteintransport in das extrazelluläre Milieu, der im folgenden als „Sekretion“ bezeichnet wird, erfordert die Anwesenheit spezialisierter Proteinsekretionssysteme. Nur in seltenen Fällen kann der Proteintransport über die äußere Membran auch über Vesikel erfolgen (Mashburn-Warren & Whiteley, 2006). Gram-negative Bakterien besitzen mindestens sechs Typen von Proteinsekretionssystemen, welche als Typ I - Typ VI-Sekretionssysteme bezeichnet werden (Abbildung 1). Die Sekretionssysteme unterscheiden sich u. a. in ihrer Abhängigkeit vom Sec-System, welches den Proteintransport über die innere Membran vermittelt, und werden im folgenden kurz beschrieben. Für eine genaue Erläuterung der Sekretionssysteme sei auf die zitierten Übersichtsartikel verwiesen.

Typ I-Sekretionssysteme (T1S-Systeme) sind Heterotrimere und sekretieren u. a. Proteasen, Lipasen und Toxine direkt in das extrazelluläre Milieu (Gerlach & Hensel, 2007). Typ II-Sekretionssysteme (T2S-Systeme) sind wesentlich komplexer aufgebaut und transportieren u. a. Toxine und extrazelluläre Enzyme wie beispielsweise Cellulasen, Proteasen oder Glucanasen. Der Transport dieser Proteine über die innere Membran wird durch das Sec-System vermittelt (Nunn, 1999; Sandkvist, 2001). Typ III-Sekretionssysteme (T3S-Systeme) sind evolutionär mit dem bakteriellen Flagellumapparat verwandt und werden daher in „Translokations-assoziierte“ und „flagelläre“ T3S-Systeme unterteilt (Desvaux et al, 2006; Minamino & Namba, 2004; Abbildung 1). Beide Systeme bestehen aus einem membranständigen Sekretionsapparat, der bei flagellären T3S-Systemen mit einem extrazellulären „Haken“ assoziiert ist, welcher in das Flagellumfilament mündet und in erster Linie als Motilitätsfaktor dient (Minamino & Namba, 2004). Der Sekretionsapparat von Translokations-assoziierten T3S-Systemen ist dagegen mit einer extrazellulären Pilus- (bei pflanzenpathogenen Bakterien) oder „Nadel“-Struktur (bei tierpathogenen Bakterien) verbunden, welche vermutlich als Proteintransportkanal zur Wirtszelle dient (Ghosh, 2004; Abbildung 1). Translokations-assoziierte T3S-Systeme translozieren Effektorproteine direkt in das Cytosol eukaryotischer Zellen und sind der thematische Fokus dieser Arbeit. Sie wurden als essentielle Pathogenitätsfaktoren der meisten Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert.

Typ IV-Sekretionssysteme (T4S-Systeme) sind evolutionär mit bakteriellen Konjugationssystemen verwandt und vermitteln sowohl den Transfer von genetischem

Material als auch den Transport von Proteinen und/oder DNA-Proteinkomplexen in pro- oder eukaryotische Zielzellen (Backert & Meyer, 2006; Christie, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien wurden T4S-Systeme in T4AS-Systeme, welche Ähnlichkeit mit dem VirB/VirD4-System von *Agrobacterium tumefaciens* aufweisen, und T4BS-Systeme unterteilt. Prototypischer Vertreter von T4BS-Systemen ist das Icm/Dot-System von *Legionella pneumophila*, welches für das Überleben der Bakterien in Makrophagen essentiell ist (Backert & Meyer, 2006; Ninio & Roy, 2007). Die genaue Funktion von T4BS-Systemen ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Der Begriff „Typ V-Sekretionssysteme“ (T5S-Systeme) bezeichnet verschiedene verwandte Sekretionssysteme, zu denen Autotransporter, „Zwei-Partner-Systeme“ und oligomere Autotransporter der Oca-Familie gehören (Thanassi et al, 2005). Alle T5S-Systeme sind abhängig vom Sec-System für den Proteintransport über die innere Membran.

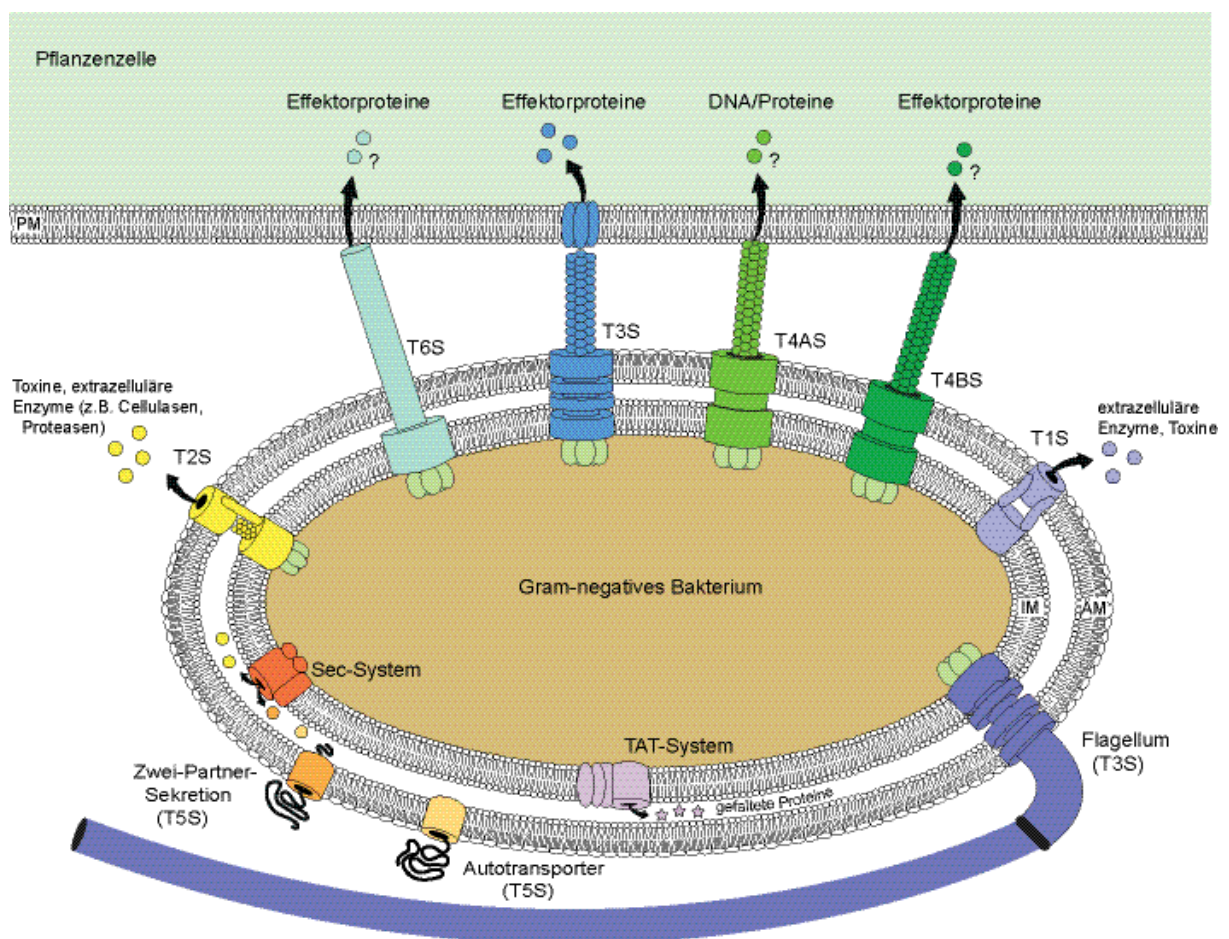


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Proteinsekretionssystemen in Gram-negativen Bakterien.

Dargestellt sind T1S- bis T6S-Systeme von Gram-negativen Bakterien und ihre mögliche Interaktion mit eukaryotischen Wirtszellen. T2S- und T5S-Substrate werden mit Hilfe des Sec-Systems über die innere Membran sekretiert. Alternativ zum Sec-System kann der Proteintransport über die innere Membran auch mit Hilfe des TAT („twin-arginine translocation“)-Systems erfolgen, welches gefaltete Proteine sekretiert, die ein spezifisches N-terminales Sekretionssignal bestehend aus zwei Argininresten enthalten (Voulhoux et al, 2001). T3S-, T4AS-, T4BS- und T6S-Systeme translozieren DNA und/oder Proteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle und sind mit extrazellulären filamentösen Strukturen (Pili) assoziiert. „Chaperone-usher“-Systeme sind nicht dargestellt. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PM, Plasmamembran der Wirtszelle.

Typ VI-Sekretionssysteme (T6S-Systeme) wurden erstmals 2006 als Virulenzfaktoren identifiziert und translozieren bakterielle Proteine in Wirtszellen (Filloux et al, 2008; Pukatzki et al, 2007; Wu et al, 2008). Noch keiner Kategorie von Sekretionssystemen zugeordnet sind die „Chaperone usher“-Systeme, die an der Ausbildung von extrazellulären Typ 1-Pili und Fimbrien beteiligt sind (Thanassi et al, 2005).

Die Charakterisierung von Proteinsekretionssystemen hat in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem durch die Analyse molekularer Pathogenitätsmechanismen Gram-negativer Bakterien signifikante Fortschritte erzielt. Viele sekretierte Proteine wie beispielsweise Adhäsine, Enzyme, Effektorproteine und Toxine spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion Gram-negativer pathogener Bakterien mit ihren Wirtsorganismen. Die meisten Pathogene nutzen vermutlich eine Kombination aus unterschiedlichen Sekretionssystemen, um ihre Wirtsorganismen erfolgreich zu infizieren (Preston et al, 2005).

1.2 Das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* besitzt alle Typen bekannter Proteinsekretionssysteme

Proteinsekretionssysteme werden derzeit in einer Reihe von Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien untersucht. Einer der Modellorganismen zur Analyse von Proteinsekretionssystemen und sekretierten Virulenzfaktoren ist das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, welches der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen ist. *X. campestris* Pathovar (pv.) *vesicatoria* führt vor allem in Anbaugebieten mit feucht-warmem Klima (z. B. Südamerika) zu wirtschaftlich bedeutenden Ernteaussfällen. Während der natürlichen Infektion dringt *X. campestris* pv. *vesicatoria* über Oberflächenöffnungen wie Wunden oder Stomata in die Pflanze ein und vermehrt sich lokal im Interzellularraum. Dies führt zur Entstehung von Krankheitssymptomen, sogenannten wässrigen Läsionen, die später nekrotisch werden (Chan & Goodwin, 1999).

Die Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit seinen Wirtspflanzen wird entscheidend durch ein T3S-System bestimmt, welches mehr als 20 Effektorproteine in die pflanzliche Zelle transloziert. Wie die Analyse der 5,17 Megabasen großen Genomsequenz zeigte, besitzt *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 jedoch Komponenten von allen in Gram-negativen Bakterien bekannten Sekretionssystemen, darunter zwei T2S- (Xcs- und Xps-T2S-System), zwei T4S- und zwei T6S-Systeme (Thieme et al, 2005). Eines der zwei T4S-Systeme weist Homologie zu dem in *L. pneumophila* identifizierten Icm/Dot-System auf. Es konnte bisher jedoch kein Einfluss dieses Sekretionssystems auf die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* nachgewiesen werden (D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Mutantanalysen in *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 zeigten, dass neben dem T3S-System auch eines der zwei T2S-Systeme nachweisbar an der Wirt-Pathogen-

Interaktion beteiligt ist. Das Xps-T2S-System sekretiert vor allem Proteasen, ist dagegen für die Sekretion von Cellulasen und Amylasen nicht essentiell (D. Büttner, V. Cogež und U. Bonas, unveröffentlichte Daten).

1.3 Das T3S-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor

1.3.1 Das T3S-System wird vom *hrp*-Gencluster kodiert

Das T3S-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird von einem chromosomalen *hrp* („*hypersensitive response and pathogenicity*“)-Gencluster kodiert, welches 25 Gene enthält, die in acht Transkriptionseinheiten organisiert sind (Bonas et al, 1991; Büttner & Bonas, 2002a; Büttner et al, 2007; Fenselau et al, 1992; Fenselau & Bonas, 1995; Rossier et al, 2000; Weber et al, 2007; Wengelnik et al, 1996a; Abbildung 2). Elf Gene sind in tier- und/oder pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und werden daher als *hrc* („*hrp conserved*“)-Gene bezeichnet. Sie kodieren vermutlich die Grundbausteine des membranständigen Sekretionsapparates (He, 1998).

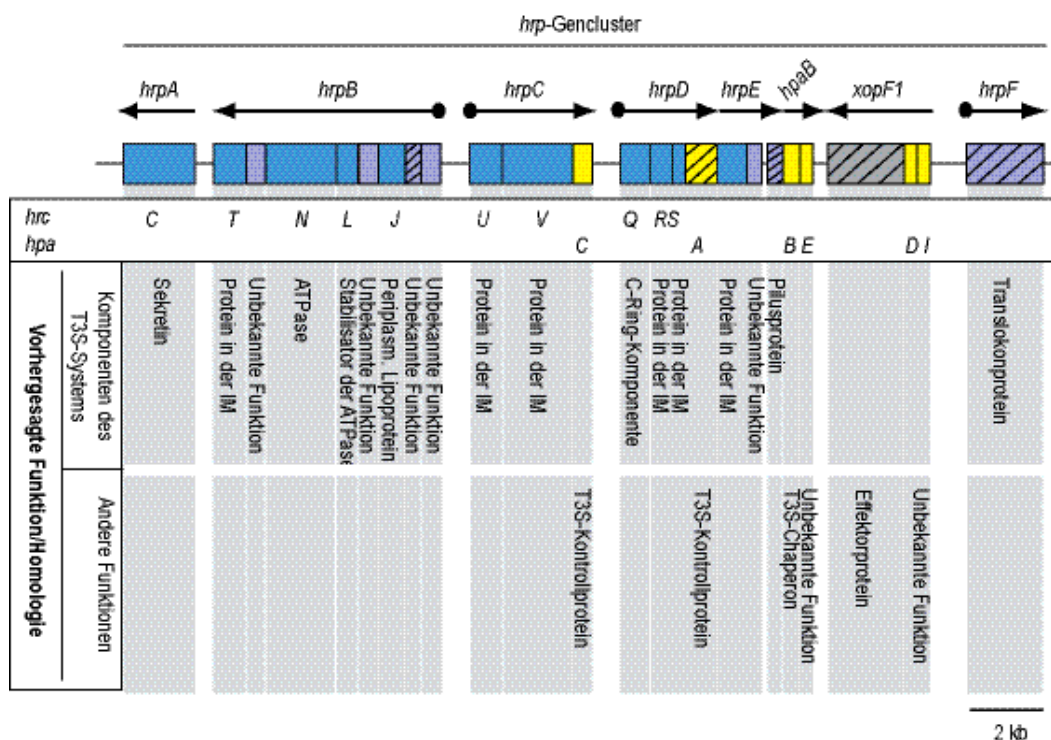


Abbildung 2: Organisation des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Dargestellt ist das *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 (GenBank-Nummer AM039952). *hrpA*-*hrpF*, *hpaB* und *xopF1* bezeichnen die acht Transkriptionseinheiten des *hrp*-Genclusters. Gene sind als Boxen dargestellt, Pfeile zeigen die Richtung der Transkription an und Punkte PIP-Boxen (PIP, „*plant inducible promoter*“). Die PIP-Box ist ein konserviertes Promotorelement, das als Bindestelle für den Transkriptionsaktivator HrpX dient (Koebnik et al, 2006). Schraffierte Boxen verweisen auf sekretierte Genprodukte. Gene, die konservierte Komponenten des Sekretionsapparates kodieren, sind in blau, Gene, die nicht-konservierte Komponenten kodieren, in lila dargestellt. Gelbe Boxen bezeichnen Gene, die für die Wirt-Pathogen-Interaktion nicht essentiell sind. Die bekannten/vorhergesagten Funktionen und Homologien der einzelnen Genprodukte sind angegeben.

Im Gegensatz zu *hrc*- und nicht-konservierten *hrp*-Genen tragen sechs Gene des *hrp*-Genclusters in unterschiedlichem Maße zur bakteriellen Pathogenität bei, sind jedoch nicht essentiell für die Wirt-Pathogen-Interaktion. Sie wurden daher als *hpa* („*hrp*-associated“)-Gene bezeichnet und sind vermutlich an der Kontrolle der Typ III-abhängigen Proteinsekretion beteiligt (Büttner et al, 2004; Büttner et al, 2006; Huguet et al, 1998; Lorenz et al, 2008a; Lorenz et al, 2008b; Noël et al, 2002; Abbildung 2).

Die Expression der *hrp*-Gene erfolgt nicht konstitutiv, sondern nur wenn sich das Bakterium in der Pflanze befindet oder in einem speziellen Minimalmedium kultiviert wird. Die *hrp*-Genexpression wird durch zwei bisher bekannte regulatorische Proteine, HrpG und HrpX, kontrolliert, die außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert sind. HrpG ist ein Transkriptionsaktivator der OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Systemen und aktiviert – in den meisten Fällen über den AraC-ähnlichen Transkriptionsaktivator HrpX – die Expression eines genomweiten Regulons, welches u. a. *hrp*- und Effektorgene umfasst (Noël et al, 2001; Wengelnik & Bonas, 1996; Wengelnik et al, 1996b).

1.3.2 Aufbau des Sekretionsapparates

Elektronenmikroskopische Analysen von T3S-Systemen tierpathogener Bakterien zeigten, dass der T3S-Apparat aus je zwei Ringkomplexen in der inneren und äußeren Membran besteht und mit einer cytoplasmatischen ATPase assoziiert ist (Yip & Strynadka, 2006). Der Ringkomplex in der äußeren Membran ist aus einem Mitglied der Proteinfamilie der Sekretine aufgebaut, welche oligomere Transmembrankanäle bilden (Thanassi & Hultgren, 2000). Der Proteinkomplex in der inneren Membran besteht aus einem periplasmatischen Lipoprotein sowie mehreren Transmembranproteinen (Yip & Strynadka, 2006).

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurden sechs Hrc-Proteine (HrcV, HrcU, HrcR, HrcS, HrcT und HrcD) identifiziert, die Transmembranhelices besitzen und in die innere bakterielle Membran inserieren (Berger, 2005; Abbildung 3). HrcV und HrcU enthalten C-terminale cytoplasmatische Domänen, die möglicherweise an der Erkennung von T3S-Substraten beteiligt sind. HrcQ, HrcL und die vorhergesagte ATPase HrcN besitzen keine vorhergesagten Transmembranhelices und sind vermutlich im Cytoplasma lokalisiert (Berger, 2005; Fenselau & Bonas, 1995; Abbildung 3). Der membranständige Sekretionsapparat ist extrazellulär mit einem Pilus assoziiert, der direkt oder indirekt mit dem T3S-Translokon in der Wirtszellmembran in Verbindung steht (Weber et al, 2005). Das T3S-Translokon ist ein postulierter kanalförmiger Proteinkomplex, der die Translokation von Effektorproteinen in das Cytosol der Wirtszelle ermöglicht (Büttner & Bonas, 2002b; Büttner et al, 2002).

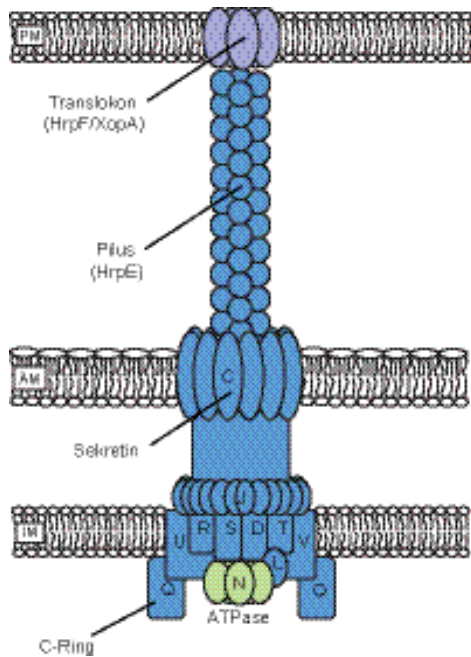


Abbildung 3: Schematische Darstellung des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Der membranständige Sekretionsapparat besteht aus zwei Ringkomplexen, die in die äußere und innere Membran inserieren, und ist mit einer cytoplasmatischen ATPase assoziiert. Buchstaben verweisen auf die Namen von einzelnen Hrc-Proteinen (z. B. C für HrcC), die am Aufbau des T3S-Systems beteiligt sind. HrcQ ist vermutlich Bestandteil des vorhergesagten cytoplasmatischen C-Ringes, der mit dem Sekretionsapparat assoziiert. Hauptkomponente des extrazellulären Pilus ist das sekretierte HrpE-Protein. Das vorhergesagte kanalförmige Translokon, das in die Wirtszellmembran inseriert, wird vermutlich von HrpF und XopA aufgebaut. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PM, Plasmamembran der pflanzlichen Wirtszelle.

1.3.3 Substrate des T3S-Systems

Substrate des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* werden in zwei Klassen unterteilt: (a) extrazelluläre Komponenten des Sekretionsapparates, z. B. das Pilusprotein HrpE und das Translokonprotein HrpF, sowie (b) mehr als 20 Effektorproteine (Xops, „*Xanthomonas* outer proteins“ oder Avr, Avirulenzproteine), die in die Wirtszelle transloziert werden (Büttner et al, 2002; Gürlebeck et al, 2006; Weber et al, 2005). Effektorproteine interferieren mit zellulären Prozessen des Wirtes, wie beispielsweise Abwehrreaktionen, zugunsten des Pathogens (Block et al, 2008; da Cunha et al, 2007). Die ersten bekannten Typ III-Effektorproteine pflanzenpathogener Bakterien wurden jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, in resistenten Pflanzen, welche korrespondierende Resistenzgene besitzen, eine Abwehrreaktion zu induzieren, die oft mit einer hypersensitiven Reaktion (HR) einhergeht. Die HR ist ein schneller programmierter Zelltod an der Infektionsstelle, der die weitere Vermehrung des Pathogens verhindert (Jones & Dangl, 2006). Aus historischen Gründen bezeichnet man Effektorproteine, die die Abwehr in resistenten Pflanzen induzieren, als Avr-Proteine. Die primäre Funktion von Effektorproteinen liegt jedoch in der Unterstützung der bakteriellen Virulenz (Grant et al, 2006; Gürlebeck et al, 2006).

Die Typ III-abhängige Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen wird in den meisten Fällen durch ein nicht-konserviertes Signal im N-terminalen Proteinbereich vermittelt (Ghosh, 2004; Lloyd et al, 2001). Da die vollständige Assemblierung des T3S-Systems Voraussetzung für die Translokation von Effektorproteinen ist, werden die extrazellulären Komponenten des T3S-Systems wahrscheinlich zeitlich vor Effektorproteinen sekretiert.

2. Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse

2.1 Identifizierung möglicher Kontrollproteine des T3S-Systems

Zu Beginn meiner Arbeiten war ungeklärt, auf welche Weise die Sekretion verschiedener T3S-Substrate in *X. campestris* pv. *vesicatoria* reguliert wird. In Vorarbeiten wurden als mögliche Kontrollproteine des T3S-Systems die Produkte von *hpa*-Genen identifiziert, die im *hrp*-Gencluster kodiert sind (Büttner et al, 2004; Büttner et al, 2006; Huguet et al, 1998; Abbildung 2). Datenbankanalysen zeigten, dass HpaA und HpaE ausschließlich Homologie zu Proteinen aus Subspezies von *Xanthomonas* aufweisen. Dagegen wurden HpaB-, HpaC- und HpaH-homologe Proteine auch in Subspezies der pflanzenpathogenen Bakterien *Burkholderia* und *Ralstonia solanacearum* identifiziert. Mit Ausnahme von HpaH, welches benachbart zum *hrp*-Gencluster kodiert ist und homolog zu lytischen Transglykosylasen ist, weist kein Hpa-Protein Sequenzähnlichkeit zu Proteinen mit bekannter Funktion auf.

Zu Beginn meiner Arbeiten war die genaue Wirkungsweise von Hpa-Proteinen unbekannt und sollte durch genetische und biochemische Methoden aufgeklärt werden. Insbesondere sollte analysiert werden, ob und auf welche Weise Hpa-Proteine an der Regulation der Typ III-abhängigen Proteinsekretion beteiligt sind. Durch die seit 2003 durchgeführten Untersuchungen wurden die Funktionen von HpaA, HpaB und HpaC während der Typ III-abhängigen Proteinsekretion charakterisiert. So zeigten die Ergebnisse von Mutantanalysen, Protein-Protein-Interaktionsstudien und Sekretions- bzw. Translokationstests, dass HpaA, HpaB und HpaC differentiell an der Kontrolle der Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen beteiligt sind und vermutlich eine zeitliche Koordination der Typ III-abhängigen Proteinsekretion ermöglichen. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die Kontrolle der Substratspezifität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* nicht nur durch Hpa-Proteine, sondern auch durch konservierte Komponenten des Sekretionsapparates wie HrcN und HrcU reguliert wird. Auf die Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen (Publikationen 1-12, s. Anhang), wird im Text verwiesen.

2.2 HpaC ist ein „Switch“-Protein des T3S-Systems

2.2.1 HpaC reguliert die Substratspezifität des T3S-Systems

HpaC von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist ein cytoplasmatisches Protein, das im *hrpC*-Operon des *hrp*-Genclusters kodiert ist (Abbildung 2) und zur Ausbildung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen (anfälligen) Pflanzen und zur Induktion der HR in resistenten Pflanzen beiträgt (O. Rossier und U. Bonas; Publikation 4). *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass HpaC die Sekretion von Effektorproteinen und postulierten Komponenten des Translokons wie XopA und HrpF fördert (Publikation 4). Dagegen inhibiert HpaC die effiziente Sekretion des Pathogenitätsfaktors HrpB2 (Publikation 7). HrpB2 ist für

die Assemblierung des extrazellulären Pilus und damit für die Sekretion aller bekannten T3S-Substrate einschließlich des Pilusproteins HrpE essentiell und wird vermutlich als eines der ersten Proteine vom T3S-System sekretiert (Rossier et al, 2000; Weber et al, 2005). Die Funktion von HrpB2 ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise wird HrpB2 in den extrazellulären Pilus eingebaut (Abbildung 4A) oder bildet einen Proteinkomplex an der Spitze des Pilus (Abbildung 4B). Alternativ könnte es sich bei HrpB2 jedoch auch um einen Bestandteil des membranständigen Sekretionsapparates handeln (s. unten und Abbildung 4C).

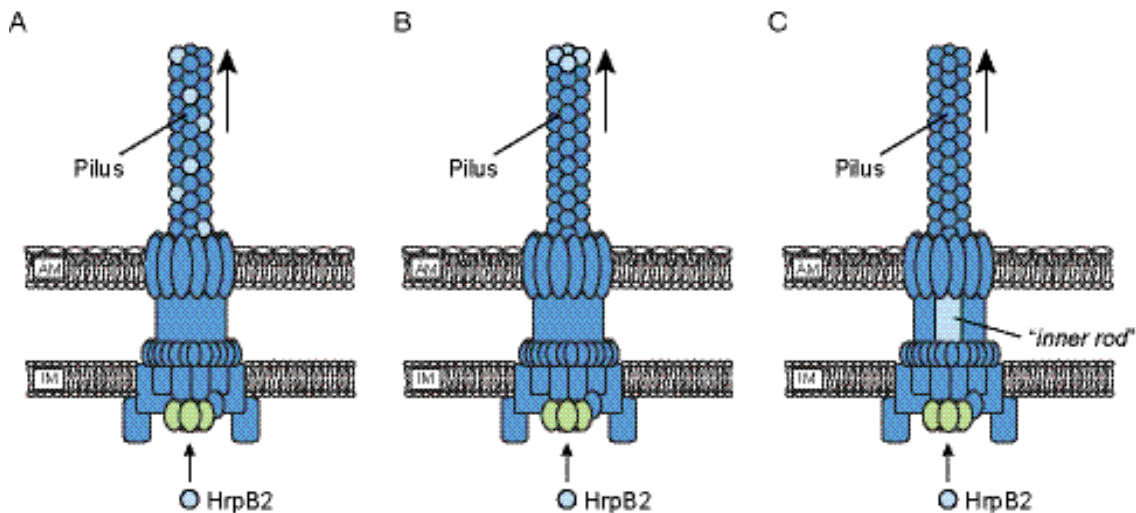


Abbildung 4: Mögliche Funktionen des sekretierten Pathogenitätsfaktors HrpB2.

(A) HrpB2 wird vom T3S-System sekretiert und in den extrazellulären Pilus eingebaut. (B) HrpB2 bildet einen Proteinkomplex an der Spitze des Pilus, der die Pilusstruktur stabilisiert. (C) HrpB2 ist eine Komponente der postulierten „inner rod“-Struktur, die für die Pilusassemblierung essentiell ist. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PM, Plasmamembran der Wirtszelle.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Sekretionsanalysen mit Wildtypstämmen und *hpaC*-Deletionsmutanten ließen vermuten, dass HpaC einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems induziert, indem es die Sekretion von HrpB2 inhibiert, die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen dagegen fördert (Publikation 7). Proteine mit einem ähnlichen Einfluss auf die Substratspezifität des T3S-Systems wurden bereits in tierpathogenen Bakterien identifiziert und werden als T3S-„Switch“-Proteine (T3S4, „type III secretion substrate specificity switch“-Proteine) bezeichnet (Agrain et al, 2005). Bekannte Beispiele sind YscP des translokationsassoziierten T3S-Systems von *Yersinia*-Subspezies und FliK des flagellären T3S-Systems von *Salmonella*-Subspezies (Cornelis et al, 2006). T3S4-Proteine besitzen wenig Sequenzhomologie auf Aminosäureebene, enthalten jedoch eine strukturell konservierte Domäne im C-terminalen Proteinbereich, die als T3S4-Domäne bezeichnet wird und vermutlich den Wechsel der T3S-Substratspezifität vermittelt. Sequenzvergleiche zeigten, dass die T3S4-Domäne von Proteinen tierpathogener Bakterien geringfügige Sequenzhomologie zu dem C-terminalen Proteinbereich von HrpP von *P. syringae* aufweist sowie zu HpaP, einem zu HpaC homologen Protein des

pflanzenpathogenen Bakteriums *R. solanacearum* (Agrain et al, 2005; Morello & Collmer, 2009). Die meisten konservierten Aminosäuren dieser Domäne sind auch in HpaC von *X. campestris* pv. *vesicatoria* vorhanden oder sind durch Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften ersetzt (Publikation 7). Dies deutet auf eine mögliche Funktion von HpaP und HpaC als T3S4-Proteine hin. Es war jedoch unbekannt, ob auch pflanzenpathogene Bakterien einen Wechsel der Substratspezifität ähnlich wie tierpathogene Bakterien mit Hilfe von T3S4-Proteinen induzieren.

Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass die postulierte T3S4-Domäne von HpaC mit der C-terminalen Domäne des konservierten HrcU-Proteins interagiert, welches ein Mitglied der FlhB/YscU-Proteinfamilie ist (Publikation 7). HpaC bindet nur an die C-terminale Domäne von HrcU, nicht dagegen an das vollständige HrcU-Protein (Publikation 7). Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von HpaC von einer bestimmten Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU begünstigt wird, die im Kontext des vollständigen HrcU-Proteins verändert ist. Neben der C-terminalen Domäne von HrcU interagiert HpaC auch mit sekretierten Proteinen wie Effektorproteinen und HrpB2 (Publikationen 4 und 7). Es wurde daher postuliert, dass HpaC T3S-Substrate an den Sekretionsapparat heranführt. Im Fall von HrpB2 ist die Interaktion mit HpaC jedoch vermutlich für die Sekretion des Proteins nicht förderlich. Da HrpB2 ähnlich wie HpaC an die C-terminale Domäne von HrcU bindet, ist es denkbar, dass HpaC die effiziente Sekretion von HrpB2 verhindert, indem es die Bindestelle für HrpB2 in der C-terminalen Domäne von HrcU blockiert (Publikation 7). Interessanterweise wurde auch für T3S4-Proteine von tierpathogenen Bakterien eine Interaktion mit der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Mitgliedern der FlhB/YscU-Proteinfamilie nachgewiesen (Botteaux et al, 2008; Minamino et al, 2006; Minamino et al, 2004; s. 2.2.2).

2.2.2 Ein Vergleich – HpaC und T3S4-Proteine tierpathogener Bakterien

HpaC von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist das erste bekannte Kontrollprotein eines pflanzenpathogenen Bakteriums, das einen Wechsel der T3S-Substratspezifität induziert und möglicherweise vergleichbar zu T3S4-Proteinen tierpathogener Bakterien agiert (Publikationen 7 und 12). T3S4-Proteine von tierpathogenen Bakterien sind am Wechsel der T3S-Substratspezifität von Nadel- zu Translokon- und Effektorproteinen beteiligt (Agrain et al, 2005; Magdalena et al, 2002). Der Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems wird dabei vermutlich durch die Interaktion von T3S4-Proteinen mit der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne eines Mitglieds der FlhB/YscU-Proteinfamilie induziert. So zeigten Protein-Protein-Interaktionsstudien, dass die T3S4-Domäne von FliK aus *Salmonella* mit der C-terminalen Domäne von FlhB interagiert (Minamino et al, 2006; Minamino et al, 2004). Ähnlich zu FliK interagiert auch das T3S4-Protein Spa32 aus *Shigella flexneri* mit dem zu FlhB homologen Protein Spa40 (Botteaux et al, 2008). Mitglieder der konservierten FlhB/YscU-Proteinfamilie inserieren als Komponenten des T3S-Systems in die innere

bakterielle Membran und besitzen neben vier vorhergesagten Transmembranhelices eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, die proteolytisch abgespalten wird und möglicherweise an der Substraterkennung beteiligt ist (Ghosh, 2004; s. 2.6). Es wurde daher postuliert, dass T3S4-Proteine durch die Interaktion mit YscU/FlhB oder homologen Proteinen eine Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne dieser Proteine und damit einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems induzieren (Cornelis et al, 2006; Minamino & MacNab, 2000). Die Tatsache, dass HpaC mit der C-terminalen Domäne des zu FlhB/YscU homologen HrcU-Proteins interagiert und dass diese Interaktion von einer bestimmten Konformation der HrcU-Domäne abhängig zu sein scheint, deutet auf eine Funktionsweise von HpaC ähnlich der von T3S4-Proteinen hin.

Interessanterweise werden in T3S4-Mutanten von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Salmonella typhimurium* die Proteine YscI und PrgJ vergleichbar zu HrpB2 in der *hpaC*-Mutante von *X. campestris* pv. *vesicatoria* verstärkt sekretiert (Marlovits et al, 2006; Wood et al, 2008). YscI und PrgJ sind Komponenten einer inneren Struktur des T3S-Systems, die als „inner rod“ bezeichnet wird. Da die gesteigerte Sekretion von YscI und PrgJ vermutlich die Ausbildung der „inner rod“-Struktur beeinträchtigt, wurde postuliert, dass T3S4-Proteine die Assemblierung des „inner rod“ kontrollieren (Marlovits et al, 2006; Wood et al, 2008). Die Ergebnisse von Analysen in *Y. pseudotuberculosis* deuten darauf hin, dass die Ausbildung des „inner rod“ das Signal für den Wechsel der T3S-Substratspezifität ist (Wood et al, 2008). Es bleibt zu klären, ob auch HrpB2 an der Ausbildung einer „inner rod“-Struktur beteiligt ist (Abbildung 4C). „Inner rod“-Proteine wurden bislang in tierpathogenen Bakterien identifiziert, weisen jedoch keine signifikante Homologie zu Proteinen pflanzenpathogener Bakterien auf (Pallen et al, 2005).

Die in tierpathogenen Bakterien bekannten T3S4-Proteine induzieren nicht nur einen Wechsel der T3S-Substratspezifität, sondern sind auch an der Längenkontrolle der mit dem T3S-System assoziierten Nadel beteiligt (Cornelis et al, 2006). Durch Analyse von Insertions- und Deletionsmutanten des T3S4-Proteins YscP wurde gezeigt, dass die Länge von YscP mit der Länge der Nadel korreliert (Journet et al, 2003; Wagner et al, 2009). Einem häufig zitierten Modell zufolge agiert YscP als „molekulares Lineal“, indem der N-terminale Proteinbereich von YscP mit der wachsenden Nadel interagiert, während der C-terminale Bereich mit YscU assoziiert. Sobald YscP eine gestreckte Konformation erreicht, wird ein Wechsel der Substratspezifität initiiert (Cornelis et al, 2006). Dieses Modell trifft jedoch vermutlich nicht auf alle T3S4-Proteine zu und berücksichtigt nicht die postulierte regulatorische Funktion der Assemblierung des „inner rod“, die durch T3S4-Proteine kontrolliert wird (Botteaux et al, 2008; Wood et al, 2008).

Im Gegensatz zu Nadelkomponenten von tierpathogenen Bakterien wird die Sekretion des Pilusproteins HrpE von *X. campestris* pv. *vesicatoria* nicht durch das T3S4-Protein HpaC kontrolliert (Publikation 7). Der T3S-Pilus erreicht eine Länge von bis zu 2 µm und

durchspannt vermutlich die pflanzliche Zellwand. Da HpaC im Gegensatz zu bekannten T3S4-Proteinen tierpathogener Bakterien nicht nachweisbar sekretiert wird und der Pilus zu lang ist, um von einem gestreckten Proteinmolekül überspannt zu werden, agiert HpaC vermutlich nicht als „molekulares Lineal“ und ist damit ein T3S4-Protein, das nicht an der Kontrolle der Piluslänge beteiligt ist.

2.3 T3S-Chaperone in *Xanthomonas* – ein Chaperon für alle Effektorproteine?

2.3.1 Identifizierung der potentiellen T3S-Chaperongene *hpaD*, *hpaI* und *hpaB*

Die effiziente Sekretion von T3S-Substraten tier- und pflanzenpathogener Bakterien erfordert häufig die Anwesenheit spezialisierter Chaperone, die an ihre jeweiligen Substrate binden und vermutlich zur Erkennung dieser Proteine durch den Sekretionsapparat beitragen (Feldman & Cornelis, 2003). T3S-Chaperone wurden in den letzten Jahren sowohl für tier- als auch für pflanzenpathogene Bakterien beschrieben. Sie sind meist kleine und Leucinreiche Proteine mit einem niedrigen isoelektrischen Punkt und weisen untereinander kaum Sequenzhomologien auf. Viele T3S-Chaperone interagieren im bakteriellen Zytosol spezifisch entweder mit Translokon- oder mit Effektorproteinen und tragen zur Stabilität und/oder Sekretion ihrer jeweiligen Interaktionspartner bei (Feldman & Cornelis, 2003). Die meisten bekannten T3S-Chaperone binden als Dimere an den N-terminalen oder zentralen Proteinbereich ihrer Interaktionspartner (Ghosh, 2004; Wilharm et al, 2007). Strukturanalysen zeigten, dass sich die Chaperonbindestelle des Effektors dabei in gestreckter Konformation um das Chaperon-Dimer windet. Dies erleichtert möglicherweise die Entfaltung des Effektors und/oder stellt ein dreidimensionales Signal zur Erkennung des Effektors durch das T3S-System dar (Birtalan et al, 2002; Lilic et al, 2006; Rodgers et al, 2008). Spezifische T3S-Chaperone sind meist in Nachbarschaft zu ihren jeweiligen Substraten kodiert (Feldman & Cornelis, 2003; Parsot et al, 2003).

Im Genom von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 wurden vier potentielle T3S-Chaperongene identifiziert, von denen drei (*hpaD*, *hpaI* und *hpaB*) im *hrp*-Gencluster lokalisiert sind (Publikationen 2, 3 und 5). *hpaD* und *hpaI* sind in der Region zwischen *hpaB* und *hrpF* neben dem Effektorgen *xopF1* lokalisiert und werden zusammen mit *xopF1* von einem gemeinsamen Promotor transkribiert (Abbildung 2; Publikation 5). Es sollte daher getestet werden, ob HpaD und HpaI als T3S-Chaperone des Effektorproteins XopF1 agieren. Da jedoch kein Einfluss von HpaD und HpaI auf die *in vitro*-Sekretion von XopF1 nachgewiesen wurde, kann bislang nicht von einer klassischen Chaperonfunktion dieser Proteine ausgegangen werden (Publikation 5).

2.3.2 HpaB ist ein T3S-Chaperon mit einer breiten Substratspezifität für Effektorproteine

Das potentielle T3S-Chaperon HpaB ist neben dem Pilusgen *hrpE* kodiert, wird jedoch nicht vom gleichen Promoter wie *hrpE* transkribiert (Weber et al, 2007; Abbildung 2). HpaB ist für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell, *hpaB*-Mutanten sind jedoch noch in der Lage, in resistenten Pflanzen eine partielle HR zu induzieren. Die Translokation von Effektorproteinen ist daher in Abwesenheit von HpaB vermutlich nicht vollständig inhibiert (Publikation 2). *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass HpaB spezifisch an der Sekretion von Effektorproteinen, nicht jedoch an der Sekretion der Translokationsproteine beteiligt ist (Publikation 2). Eine ähnliche Beteiligung an der Typ III-abhängigen Proteinsekretion wurde bereits für T3S-Chaperone von tier- und pflanzenpathogenen Bakterien beschrieben, die spezifisch die Sekretion von Effektorproteinen fördern (Parsot et al, 2003). HpaB interagiert mit verschiedenen Effektorproteinen, die untereinander keine Sequenzhomologie aufweisen und fördert die Sekretion aller bislang getesteten Effektorproteine (Publikation 2). Dies deutet darauf hin, dass HpaB als generelles T3S-Chaperon mit einer breiten Substratspezifität agiert (Publikationen 2 und 4; D. Büttner, J. Stuttmann, U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Da HpaB neben Effektorproteinen auch mit konservierten Komponenten des T3S-Systems an der inneren Membran wie HrcU, HrcV und HrcN interagiert, vermittelt es vermutlich den Transport von Effektorproteinen zum Sekretionsapparat (Publikationen 4, 7 und 8).

2.3.3 Effektorproteine unterscheiden sich im Grad ihrer HpaB-abhängigen Translokation

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in vitro*-Sekretionsanalysen konnte in Translokationstests gezeigt werden, dass HpaB auch entscheidend an der *in vivo*-Translokation von Effektorproteinen beteiligt ist. Dazu wurde ein Derivat des Effektorproteins AvrBs3, AvrBs3 Δ 2, als Reporter verwendet, welches im N-terminalen Sekretions- und Translokationssignal deletiert ist. AvrBs3 Δ 2 wird nur in Fusion mit einem funktionalen Sekretions- und Translokationssignal von *X. campestris* pv. *vesicatoria* in die Wirtszelle transloziert und induziert in diesem Fall in Paprikapflanzen, die das korrespondierende Resistenzgen *Bs3* besitzen, die HR (Szurek et al, 2002; Publikationen 1, 9 und 10). In Abwesenheit von HpaB werden einige Effektorproteine noch in die Pflanzenzelle transloziert, wenn auch mit im Vergleich zum Wildtyp-Stamm verringerter Effizienz. Die Translokation anderer Effektorproteine ist dagegen in einer *hpaB*-Deletionsmutante nicht mehr nachweisbar (Publikation 4; Tabelle 1). Wir haben Effektorproteine von *X. campestris* pv. *vesicatoria* daher in zwei Klassen unterteilt: Klasse A-Effektoren werden in Abwesenheit von HpaB nicht mehr nachweisbar transloziert, während Klasse B-Effektoren auch in der *hpaB*-Mutante noch transloziert werden können (Tabelle 1). Es bleibt zu klären, ob die Unterschiede in der Translokationseffizienz auf Unterschiede im N-terminalen Sekretions-

bzw. Translokationssignal von Klasse A- und Klasse B-Effektoren oder auf Unterschiede in ihrer Affinität zu HpaB zurückzuführen sind.

Mutantenanalysen zeigten, dass nicht nur HpaB, sondern auch die postulierte lytische Transglykosylase HpaH, welche benachbart zum *hrp*-Gencluster kodiert ist (Abbildung 2), einen differentiellen Einfluss auf die Sekretion und Translokation verschiedener Effektorproteine ausübt (Publikation 5). Lytische Transglykosylasen sind periplasmatische Proteine, welche zur Assemblierung von makromolekularen Transportsystemen beitragen (Koraimann, 2003). Die Analyse einer *hpaH*-Deletionsmutante von *X. campestris* pv. *vesicatoria* zeigte, dass die Sekretion bzw. Translokation von Klasse A-Effektoren in Abwesenheit von HpaH signifikant reduziert ist, während die Translokation von Klasse B-Effektoren nicht beeinträchtigt ist (Publikation 5; Tabelle 1). Hinweise auf eine differentielle Beteiligung potentieller lytischer Transglykosylasen an der Effektorproteintranslokation wurden in einer nachfolgenden Publikation auch für das pflanzenpathogene Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* beschrieben (Oh et al, 2007; Publikation 12). Die genaue Funktion lytischer Transglykosylasen während der Typ III-abhängigen Proteinsekretion und –translokation wurde in pflanzenpathogenen Bakterien bislang jedoch nicht charakterisiert.

Tabelle 1: Einfluss von HpaB und HpaH auf die Translokation von Effektorproteinen.				
Effektor¹	Homologie/Charakteristika	Translokation² in		
		WT	$\Delta hpaB$	$\Delta hpaH$
Klasse A				
XopJ	Protease/Acetyltransferase ⁴	+	-	(+)
XopF1	Unbekannt ⁵	+	-	(+)
XopE1	Transglutaminase, Myristoylierungsmotiv ⁶	+	-	n. a.
XopE2	Transglutaminase, Myristoylierungsmotiv ⁶	+	-	n. a.
HpaA	T3S-Kontrollprotein und Typ III-Effektor ⁷	+	-	n. a.
Klasse B				
AvrBs3 ³	Transkriptionsfaktor ⁸	+	(+)	+
XopC	Unbekannt ⁹	+	(+)	+
XopI	F-Box-Protein ¹⁰	+	(+)	n. a.
XopH	Vorhergesagte Tyrosin-Phosphatase ¹⁰	+	(+)	n. a.

¹Klasse A-Effektoren werden von einer *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hpaB*-Deletionsmutante nicht mehr nachweisbar transloziert. Klasse B-Effektoren können auch in Abwesenheit von HpaB noch transloziert werden, wenngleich mit reduzierter Effizienz.
²Es wurden Fusionsproteine zwischen N-terminalen Bereichen der Effektorproteine und dem AvrBs3 Δ 2-Reporter (s. Text) analysiert. Fusionsproteine wurden in *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hpaB*-Wildtyp- (Wildtyp, WT), *hpaB*-mutanten ($\Delta hpaB$) und *hpaH* ($\Delta hpaH$)-mutanten Stämmen exprimiert und die Bakterien in AvrBs3-responsive Paprikapflanzen inokuliert. +, AvrBs3-spezifische HR; -, keine sichtbare HR; (+), reduzierte AvrBs3-spezifische HR; n. a., nicht analysiert.
³AvrBs3 kommt nicht in *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 vor.
Referenzen: ⁴Publikationen 1 und 4; ⁵Publikation 5; ⁶Thieme et al (2007); ⁷Publikation 6, Huguet et al (1998); ⁸Bonas et al (1989); Kay et al (2007); Marois et al (2002); ⁹Publikationen 1 und 9; ¹⁰D. Büttner, J. Stuttmann, A. Krüger und U. Bonas, unveröffentlichte Daten.

2.3.4 Funktion von T3S-Chaperonen bei der Effektorproteintranslokation

T3S-Chaperone wurden entsprechend ihrer Substratspezifität in mehrere Klassen eingeteilt: Klasse IA-Chaperone binden spezifisch an ein oder mehrere homologe Effektoren, während Klasse IB-Chaperone mit verschiedenen Effektorproteinen interagieren, die untereinander keine Sequenzhomologie aufweisen. Klasse II-Chaperone sind dagegen spezifisch für Translokonproteine (Parsot et al, 2003). Da HpaB von *X. campestris* pv. *vesicatoria* die Sekretion und Translokation aller bislang getesteten Effektorproteine fördert, ist es das erste bekannte Klasse IB-Chaperon eines pflanzenpathogenen Bakteriums (Publikationen 2, 4 und 11). Ähnlich zu anderen T3S-Chaperonen führt HpaB Effektorproteine vermutlich an den Sekretionsapparat heran, indem es mit konservierten Komponenten des T3S-Systems an der inneren Membran interagiert (Publikationen 4, 7 und 8). In pflanzenpathogenen Bakterien wurden durch vergleichende Sequenzanalysen HpaB-homologe Proteine in Subspezies von *Xanthomonas* und *R. solanacearum* identifiziert. Beide Bakterienspezies wurden aufgrund von Ähnlichkeiten in der Organisation ihrer *hrp*-Gencluster und der Regulation der *hrp*-Gene als Gruppe II der pflanzenpathogenen Bakterien zusammengefasst (Alfano & Collmer, 1996). Subspezies von *P. syringae* und *Erwinia amylovora* dagegen wurden der Gruppe I zugeordnet (Alfano & Collmer, 1996). Da *P. syringae*- und *E. amylovora*-Subspezies keine HpaB-homologen Proteine, dafür aber spezifische Klasse IA-T3S-Chaperone besitzen, ist es denkbar, dass die Translokation von Effektorproteinen in Gruppe II-Pathogenen durch das generelle Klasse IB-T3S-Chaperon HpaB kontrolliert wird, während Gruppe I-Pathogene spezifische Klasse IA-T3S-Chaperone besitzen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass Klasse IA-T3S-Chaperone bisher nur in *P. syringae* und Subspezies von *Erwinia* identifiziert wurden. In *X. oryzae* pv. *oryzae* dagegen konnte ähnlich wie in *X. campestris* pv. *vesicatoria* gezeigt werden, dass die Translokation verschiedener Effektorproteine durch HpaB vermittelt wird (Furutani et al, 2009).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Translokation von Effektorproteinen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* in ihrer HpaB-Abhängigkeit unterscheidet (Publikation 4). Da HpaB ein essentieller Pathogenitätsfaktor ist, werden Klasse A-Effektoren möglicherweise bevorzugt vor Klasse B-Effektoren transloziert. Bislang ist jedoch unklar, ob die Translokation von Effektorproteinen in pflanzenpathogenen Bakterien zeitlich reguliert wird. In tierpathogenen Bakterien gibt es bereits Hinweise auf eine zeitliche Regulation der Translokation von Effektorproteinen. So wurden in *Salmonella*- und *Yersinia*-Subspezies T3S-Kontrollproteine identifiziert, die spezifisch zur Translokation bestimmter Effektorproteine beitragen (Coombes et al, 2004; Deng et al, 2004; Iriarte et al, 1998; Sundberg & Forsberg, 2003). Zudem wurde nachgewiesen, dass translozierte Effektorproteine von *Salmonella* in der Wirtszelle entgegengesetzte Aktivitäten aufweisen und damit vermutlich nicht gleichzeitig transloziert werden (Van Engelenburg & Palmer, 2008). Tatsächlich wird beispielsweise SipA, welches Veränderungen in Aktin-Filamenten

induziert, signifikant früher transloziert als SptP, welches die von SipA induzierte Modifizierung der Aktin-Filamenten wieder aufhebt (Winnen et al, 2008). Eine zeitliche Regulation der Translokation wurde auch für Effektorproteine von enteropathogenen *Escherichia coli* beschrieben (Mills et al, 2008). Es wurde postuliert, dass die Bindung an T3S-Chaperone die Erkennung von Effektorproteinen durch den Sekretionsapparat fördert. Effektorproteine ohne korrespondierendes T3S-Chaperon werden daher vermutlich zeitlich verzögert sekretiert (Boyd et al, 2000; Winnen et al, 2008).

2.4 HpaA – ein Effektorprotein mit Kontrollfunktion

2.4.1 HpaA ist für die effiziente Typ III-abhängige Proteinsekretion essentiell

Neben HpaB und HpaC haben wir HpaA als drittes Kontrollprotein des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* identifiziert. HpaA ist im *hrpD*-Operon des *hrp*-Genclusters kodiert und trägt zur Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit anfälligen und resistenten Pflanzen bei (Huguet et al, 1998). *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass HpaA für die effiziente Sekretion von Pilus-, Translokation- und Effektorproteinen essentiell ist und zudem selbst vom T3S-System sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert wird (Publikation 6). Die Anwesenheit von zwei funktionalen Kernlokalisierungssequenzen in HpaA deutet auf eine Proteinfunktion im pflanzlichen Zellkern hin (Huguet et al, 1998). Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde eine Kernlokalisierung für ein HpaA-GFP („*green fluorescent protein*“)-Fusionsprotein nach *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer nachgewiesen (Publikation 6). Die Akkumulation von HpaA-GFP im pflanzlichen Zellkern wird in Anwesenheit eines Kernexportsignals (NES, „*nuclear exclusion signal*“) in HpaA verhindert. Da ein HpaA-NES-Fusionsprotein den Phänotyp einer *hpaA*-Deletionsmutante hinsichtlich der Typ III-abhängigen Proteinsekretion und der bakteriellen Pathogenität komplementiert, ist die Translokation von HpaA für die Virulenzfunktion des Proteins jedoch nicht essentiell (Publikation 6).

2.4.2 Identifizierung funktionaler Proteinregionen in HpaA

Für die molekulare Charakterisierung von HpaA wurde die Bedeutung N- und C-terminaler Proteinregionen untersucht. Die Analyse von HpaA-Deletionsderivaten und Reporterkonstrukten zeigte, dass die N-terminalen 71 Aminosäuren von HpaA ein funktionales Sekretions- und Translokationssignal enthalten (Publikation 6). Ein HpaA-Derivat deletiert in den N-terminalen 71 Aminosäuren wird nicht mehr sekretiert und kann den Phänotyp einer *hpaA*-Deletionsmutante bezüglich der Sekretion und Translokation von Effektorproteinen nicht komplementieren. Die Sekretion von Pilus- und Translokationproteinen dagegen erfolgt auch in Abwesenheit des N-terminalen Proteinbereiches von HpaA

(Abbildung 5, Publikation 6). Dies deutet darauf hin, dass die Sekretion von HpaA für die Sekretion der extrazellulären Komponenten des T3S-Systems nicht erforderlich ist.

Interessanterweise kann der N-terminale Proteinbereich von HpaA durch das T3S-Signal des postulierten Translokonproteins XopA funktional ersetzt werden (Abbildung 5, Publikation 6). Der N-terminale Proteinbereich von XopA enthält ein Sekretionssignal, welches in Wildtyp-Stämmen die Sekretion, nicht jedoch die Translokation von XopA ermöglicht (Publikationen 2 und 6). Unsere Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass die Anwesenheit eines funktionalen T3S-Signals, nicht jedoch der N-terminale Proteinbereich von HpaA *per se* entscheidend für die Beteiligung von HpaA am Transport von Effektorproteinen ist.

HpaA interagiert ähnlich wie andere Effektorproteine mit dem globalen T3S-Chaperon HpaB. Die HpaB-Bindestelle ist in den C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA lokalisiert (Publikation 6). Dies ist ungewöhnlich, da die meisten T3S-Chaperone an N-terminale oder zentrale Bereiche von Effektorproteinen binden (Parsot et al, 2003). Da die Deletion der C-terminalen 50 Aminosäuren von HpaA zum Verlust der Proteinfunktion führt, trägt die Interaktion zwischen HpaA und HpaB möglicherweise entscheidend zur HpaA-vermittelten Kontrolle der Typ III-abhängigen Proteinsekretion bei (Abbildung 5, Publikation 6). Die Bindung von HpaA an HpaB verhindert dabei vermutlich eine inhibitorische Wirkung von frei vorliegendem HpaB auf die Aktivität des T3S-Systems (Publikationen 2 und 6).

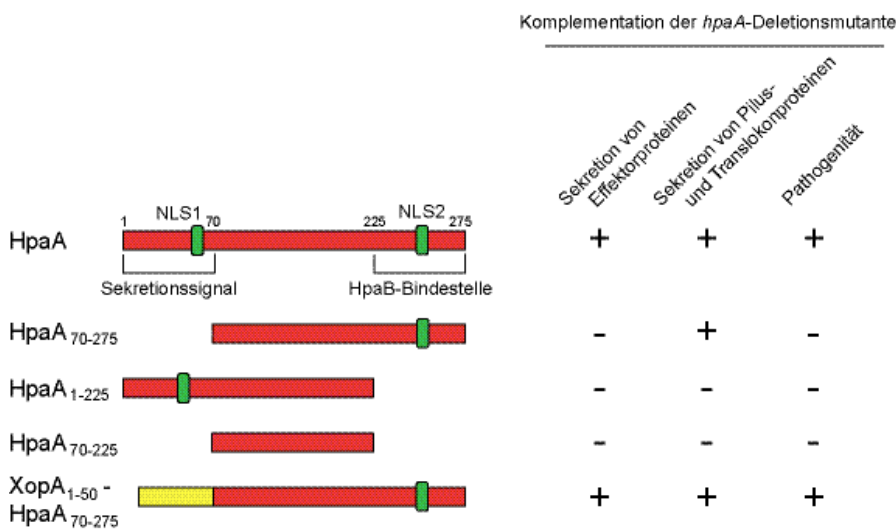


Abbildung 5 Charakterisierung von HpaA-Deletionsderivaten.

HpaA besitzt zwei funktionale NLS sowie ein N-terminales Sekretionssignal und eine C-terminale HpaB-Bindestelle. Generierte HpaA-Deletionsderivate sind schematisch dargestellt. Zahlen verweisen auf Aminosäurepositionen. Angegeben ist die Fähigkeit der HpaA-Derivate, den Phänotyp einer HpaA-Deletionsmutante bezüglich der Sekretion von Effektorproteinen, der Sekretion von Pilus- (HrpE) und Translokonproteinen (HrpF, XopA) bzw. der bakteriellen Pathogenität zu komplementieren. +, Komplementation; -, keine Komplementation.

HpaA wird vermutlich nach Aufbau des Sekretionsapparates sekretiert und ermöglicht damit die Freisetzung von HpaB und so die effiziente Sekretion und Translokation von weiteren Effektorproteinen (Abbildung 6). HpaA ist daher wahrscheinlich eines der ersten Proteine, die

nach Assemblierung des T3S-Systems in die Pflanzenzelle transloziert werden, wobei seine Funktion in der Pflanzenzelle noch unbekannt ist. Es bleibt zu klären, ob HpaA die pflanzliche Genexpression beeinflusst. Man kann jedoch nicht ausschliessen, dass die Translokation von HpaA nur erfolgt, um das Protein aus dem bakteriellen Cytoplasma zu entfernen. Eine Translokation von Proteinen ohne offensichtliche Effektorfunktion wurde bereits in *P. syringae* für die postulierte Pektatlyase HrpW1 und die T3S-Kontrollproteine HrpP und HrpJ nachgewiesen (Fu et al, 2006; Guttman et al, 2002; Morello & Collmer, 2009; Publikation 12).

HpaA ist das einzige bekannte T3S-Kontrollprotein, das als sekretierter Regulator eines T3S-Chaperons agiert und dadurch die Sekretion und Translokation von Effektorproteinen kontrolliert. Interessanterweise wird in tierpathogenen Bakterien durch ähnliche Mechanismen die Expression T3S-System-assoziiierter Gene reguliert. So aktivieren beispielsweise die T3S-Chaperone IpgC von *S. flexneri* und SicA von *Salmonella*-Subspezies einen Transkriptionsaktivator, sobald ihr jeweiliger Interaktionspartner sekretiert wird und damit nicht mehr in der Bakterienzelle verfügbar ist (Darwin & Miller, 2001; Parsot et al, 2005).

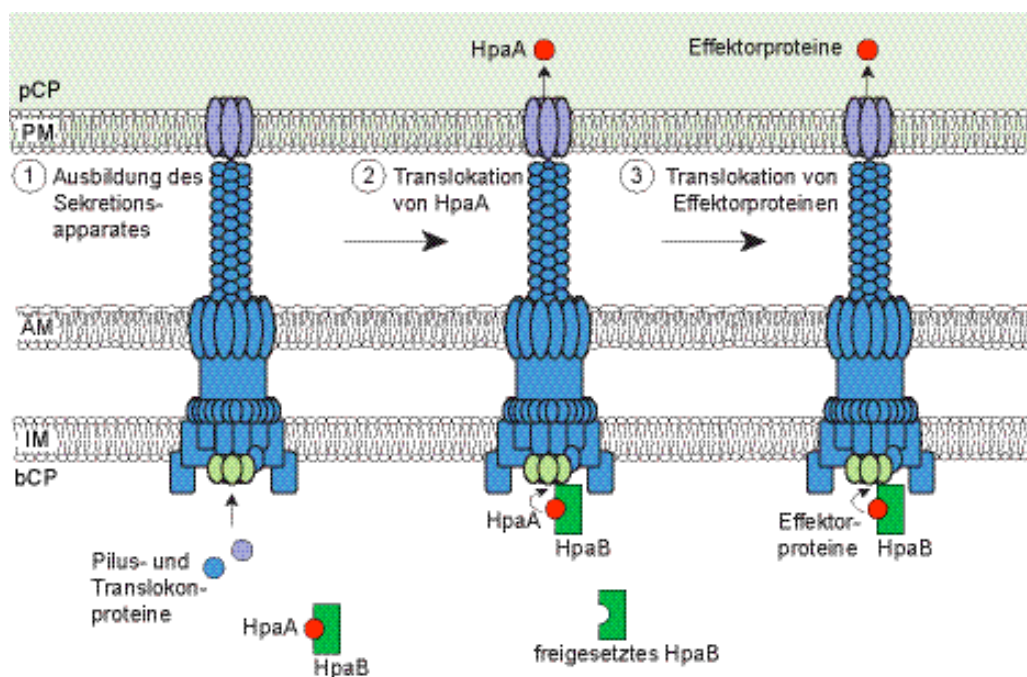


Abbildung 6 Vereinfachtes Modell zur Funktion von HpaA und HpaB während der T3S.

Nach Aktivierung des Sekretionsapparates werden zunächst Pilus- und Translokonproteine sekretiert. Die Bindung von HpaA an HpaB verhindert zu diesem Zeitpunkt die Sekretion von Effektorproteinen. Die anschließende Sekretion von HpaA führt zur Freisetzung von HpaB und ermöglicht damit die Sekretion und Translokation von Effektorproteinen. HpaB interagiert mit der ATPase des T3S-Systems, HrcN, welche HpaB-gebundene Effektorproteine vom Chaperon ablöst (s. 2.5). HpaC ist in diesem Modell nicht dargestellt. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PM, Plasmamembran der Wirtszelle; bCP, bakterielles Cytoplasma; pCP, pflanzliches Cytoplasma.

2.5 Die ATPase HrcN ist der Energielieferant des T3S-Systems

2.5.1 HrcN hydrolysiert ATP und energetisiert das T3S-System

Neben der Charakterisierung der Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC konnten wir eine Beteiligung von konservierten Komponenten des Sekretionsapparates an der Kontrolle der Typ III-abhängigen Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* nachweisen. Die Analyse von nicht-polaren Deletionsmutanten in Genen des *hrpB*-Operons zeigte, dass die ATPase HrcN essentiell für die *in vitro*-Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen sowie für die bakterielle Pathogenität ist (Publikation 8). HrcN weist Homologie zur β -Untereinheit von F_0F_1 -ATPasen auf und besitzt die für ATPasen charakteristischen Walker-Boxen A und B, die die ATP-Bindung und Hydrolyse ermöglichen (Fenselau & Bonas, 1995; Ghosh, 2004; Walker et al, 1982; Zarivach et al, 2007). Essentiell für die durch HrcN katalysierte ATP-Hydrolyse ist ein konservierter Glycinrest in der Walker-Box A. Der Austausch des Glycinrestes gegen einen Cysteinrest führt zum vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität von HrcN (Publikation 8). Das mutierte HrcN-Derivat HrcN_{G175C} kann zudem den Phänotyp einer *X. campestris* pv. *vesicatoria hrcN*-Deletionsmutante nicht mehr komplementieren. Dies deutet darauf hin, dass die HrcN-vermittelte ATP-Hydrolyse für die Typ III-abhängige Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell ist (Publikation 8).

Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcN mit dem T3S-Chaperon HpaB interagiert und einen trimeren Komplex mit dem Effektorprotein XopF1 in Gegenwart von ATP dissoziiert (Publikation 8). Ähnliche Beobachtungen wurden für die ATPase InvC von *S. enterica* beschrieben und deuten darauf hin, dass die mit dem T3S-System assoziierten ATPasen an der Freisetzung Chaperon-gebundener Effektorproteine beteiligt sind (Akeda & Galan, 2005).

2.5.2 HrcN wird durch das konservierte HrcL-Protein stabilisiert

Die Ergebnisse von Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcN nicht nur mit sich selbst und HpaB, sondern auch mit dem konservierten HrcL-Protein interagiert. HrcL ist homolog zu Mitgliedern der YscL/FliH-Familie bekannter negativer Regulatoren von T3S-assoziierten ATPasen tierpathogener Bakterien. Ein möglicher Einfluss von HrcL auf die ATPase-Aktivität von HrcN konnte jedoch bislang nicht untersucht werden, da HrcL in *E. coli* nicht stabil synthetisiert wird. Analysen in *X. campestris* pv. *vesicatoria* zeigten jedoch, dass HrcL entscheidend zur Proteinstabilität von HrcN beiträgt (Publikation 8).

Interessanterweise führt die Überexpression von *hrcL* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* zu einer signifikanten Reduktion der bakteriellen Pathogenität. Da dieser negative Effekt durch simultane Überexpression von *hrcN* aufgehoben werden kann, ist das Verhältnis von HrcN zu HrcL offenbar entscheidend für die Pathogenität (Publikation 8). Ähnliche Ergebnisse wurden für die zu HrcN und HrcL homologen Proteine FliI und FliH von *S. enterica*

beschrieben. Es wurde daher postuliert, dass erhöhte Mengen des Regulators FliH mit der ATPase um Bindestellen am Sekretionsapparat konkurrieren (Minamino & MacNab, 2000). Die Ergebnisse biochemischer Analysen in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien deuten darauf hin, dass die ATPasen hexamere oder dodecamere Ringstrukturen bilden, die mit dem T3S-System assoziiert sind (Müller et al, 2006; Pozidis et al, 2003; Zarivach et al, 2007). In *X. campestris* pv. *vesicatoria* konnten wir durch Fraktionierungsanalysen zeigen, dass die Membranassoziation von HrcN und HrcL unter sekretionsinduzierenden Bedingungen verstärkt ist (Fenselau & Bonas, 1995; Publikation 8). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir für das T3S-Chaperon HpaB und den postulierten Regulator der ATPase, HrcL (Publikation 8). Dies lässt vermuten, dass ein Komplex bestehend aus ATPase, HrcL und den cytoplasmatischen Kontrollproteinen HpaB und HpaC bei Aktivierung des T3S-Systems an den Sekretionsapparat bindet.

2.5.3 Untersuchungen zur Funktion der protonenmotorischen Kraft während der Typ III-abhängigen Proteinsekretion

ATPasen der konservierten YscN/FliI-Proteinfamilie wurden lange Zeit als essentielle Komponenten des T3S-Systems angesehen. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise darauf, dass die Typ III-abhängige Proteinsekretion in Abwesenheit der ATPase von der protonenmotorischen Kraft (PMK) getrieben werden kann. So wurde für das flagelläre T3S-System von *Salmonella* nachgewiesen, dass die Typ III-abhängige Proteinsekretion bei gleichzeitiger Abwesenheit der ATPase FliI und ihres negativen Regulators FliH nicht vollständig inhibiert ist (Minamino & Namba, 2008; Paul et al, 2008). Es wurde daher postuliert, dass die ATPase zwar die Assoziation von T3S-Substraten mit dem Sekretionsapparat fördert, der Transport der Proteine durch den Sekretionskanal dagegen durch die PMK ermöglicht wird (Akedo & Galan, 2005; Minamino & Namba, 2008; Paul et al, 2008; Wilharm et al, 2004). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass die Typ III-abhängige Proteinsekretion in tierpathogenen Bakterien in Gegenwart des Protonophors Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon (CCCP), welches den Protonengradient an der inneren Membran zerstört, signifikant reduziert ist (Minamino & Namba, 2008; Paul et al, 2008; Wilharm et al, 2004).

Mit Hilfe von Sekretionsanalysen konnten wir nachweisen, dass auch in *X. campestris* pv. *vesicatoria* die Aktivität des T3S-Systems nach Zugabe von CCCP signifikant reduziert ist. Jedoch übt CCCP einen generellen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *X. campestris* pv. *vesicatoria* unter sekretionsinduzierenden Bedingungen aus, so dass anhand dieser Experimente nicht zwangsläufig auf einen Einfluss der PMK auf die Typ III-abhängige Proteinsekretion geschlossen werden kann (Publikation 8). Im Gegensatz zum flagellären T3S-System von *Salmonella* führt die gleichzeitige Abwesenheit von HrcN und HrcL in *X. campestris* pv. *vesicatoria* jedoch zu einem vollständigen Verlust der Typ III-abhängigen

Proteinsekretion (Publikation 8). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es daher keine experimentellen Hinweise darauf, dass die Typ III-abhängige Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* auch unabhängig von der ATPase HrcN erfolgen kann.

2.5.4 Die ATPase ist für die Aktivität des T3S-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell

Die mit dem T3S-System assoziierten ATPasen sind meist entscheidend an der Typ III-abhängigen Proteinsekretion beteiligt. Für die ATPasen InvC von *S. enterica* und HrcN von *X. campestris* pv. *vesicatoria* konnte eine ATP-abhängige Dissoziation von Chaperon-Effektorkomplexen nachgewiesen werden (Akeda & Galan, 2005; Publikation 8). InvC ermöglicht zudem die Entfaltung von Effektorproteinen und damit vermutlich den Eintritt dieser Proteine in den Sekretionskanal (Akeda & Galan, 2005). Da der innere Kanal des T3S-Systems mit einem Durchmesser von 2 nm zu eng für den Transport gefalteter Proteine ist, müssen T3S-Substrate vor der Passage durch den Sekretionsapparat zumindestens partiell entfaltet werden (Yip & Strynadka, 2006). Es wurde daher postuliert, dass die T3S-System-assoziierten ATPasen vergleichbar zu AAA⁺-ATPasen (AAA, „ATPase associated with a variety of cellular activities“) agieren, die oft an der Deassemblierung von Proteinkomplexen beteiligt sind. AAA⁺-ATPasen ermöglichen die Entfaltung und den gleichzeitigen Transport von Proteinen durch die von ihnen gebildeten hexameren Ringstrukturen (Sauer et al, 2004). In zukünftigen Experimenten soll auch für HrcN von *X. campestris* pv. *vesicatoria* eine mögliche Beteiligung an der Entfaltung von Effektorproteinen analysiert werden.

HrcN von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist nicht nur für die Sekretion von Effektorproteinen, sondern auch für die Sekretion von Pilus- und Translokonproteinen essentiell, die unabhängig von HpaB sekretiert werden. Korrespondierende T3S-Chaperone dieser Proteine sind bislang nicht bekannt. Es ist daher anzunehmen, dass die Funktion der ATPase HrcN über die Freisetzung HpaB-gebundener Effektorproteine hinausgeht (Publikation 8). Im Gegensatz zum flagellären T3S-System von *Salmonella* gibt es in *X. campestris* pv. *vesicatoria* bislang keine Hinweise auf eine ATPase-unabhängige Typ III-abhängige Proteinsekretion (s. 2.5.3). Es bleibt zu klären, ob sich die Beteiligung der ATPase an der Typ III-abhängigen Proteinsekretion in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien unterscheidet. *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist jedoch derzeit das einzige pflanzenpathogene Bakterium, in dem der Beitrag der ATPase zur Typ III-abhängigen Proteinsekretion analysiert wurde.

2.6 Das konservierte HrcU-Protein ist am Wechsel der Substratspezifität beteiligt

2.6.1 HrcU wird proteolytisch gespalten

HrcU ist eine konservierte Komponente des T3S-Systems in der inneren Membran und ist für die Typ III-abhängige Proteinsekretion essentiell (Weber et al, 2005; C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten; Abbildung 3). Durch Topologiestudien wurden vier Transmembranhelices und eine cytoplasmatische Domäne in HrcU vorhergesagt (Berger, 2005). HrcU weist damit eine ähnliche Struktur wie homologe Proteine von tierpathogenen Bakterien auf, die zur konservierten FlhB/YscU-Proteinfamilie gehören. Die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Mitgliedern dieser Proteinfamilie wird autokatalytisch an einem konservierten NPTH (Asparagin-Prolin-Threonin-Histidin)-Aminosäuremotiv gespalten, das für die Proteinfunktion essentiell ist (Deane et al, 2008; Ferris et al, 2005; Fraser et al, 2003; Lavander et al, 2002; Riordan & Schneewind, 2008; Sorg et al, 2007; Wiesand et al, 2009; Zarivach et al, 2008).

Analog zur Situation in tierpathogenen Bakterien wird auch HrcU aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* proteolytisch gespalten (Publikation 7). Der Austausch des konservierten Prolinrestes des NPTH-Motivs von HrcU an Aminosäureposition 265 gegen einen Glycinrest führt zu einer signifikanten Reduktion der proteolytischen Spaltung *in vitro*. Die Punktmutation P265G in HrcU resultiert zudem in einem vollständigen Verlust der bakteriellen Pathogenität (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Dies deutet darauf hin, dass das NPTH-Motiv und damit möglicherweise die Proteolyse von HrcU für die Wirt-Pathogen-Interaktion essentiell ist.

2.6.2 HrcU interagiert mit der ATPase HrcN und dem T3S-Chaperon HpaB

In vitro-Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcU von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit der ATPase HrcN und dem postulierten Regulator der ATPase, HrcL, interagiert. HrcL bindet präferentiell an den N-terminalen Proteinbereich von HrcU, wohingegen HrcN mit der C-terminalen Domäne interagiert. Eine Interaktion zwischen HrcN und dem vollständigen HrcU-Protein konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Publikation 8; Tabelle 2). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen HrcU und HrcN von einer bestimmten Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU abhängig ist, die im Kontext des vollständigen HrcU-Proteins geändert ist. Ähnliches wurde bereits für die Interaktion zwischen HrcU und HpaC beobachtet (s. 2.2; Tabelle 2; Publikation 7).

Die Interaktion zwischen HrcN und der C-terminalen Domäne von HrcU liefert eine mögliche Erklärung für die Membranassoziation der ATPase HrcN, die vor allem unter sekretionsinduzierenden Bedingungen beobachtet wurde (s. 2.5). Es ist denkbar, dass die Aktivierung des T3S-Systems zu einer Konformationsänderung der C-terminalen Domäne

von HrcU führt, die die Anlagerung des ATPase-Komplexes an den Sekretionsapparat begünstigt. Da die Membranassoziation von HrcN und HrcL in einer *hrcU*-Deletionsmutante jedoch nicht beeinträchtigt ist, sind möglicherweise zusätzliche Komponenten des T3S-Systems an der Rekrutierung der ATPase beteiligt (Publikation 8).

Neben HrcN und HrcL interagiert HrcU auch mit dem generellen T3S-Chaperon HpaB, welches ähnlich wie HrcL bevorzugt an den N-terminalen membranständigen Proteinbereich von HrcU bindet, nicht dagegen an die C-terminale Domäne, welche die Bindestelle für HrcN enthält (s. oben; Tabelle 2; Publikation 8). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HrcU mit einem Proteinkomplex bestehend aus der ATPase HrcN, HrcL und dem T3S-Chaperon HpaB assoziiert.

Tabelle 2: Interaktion von HrcU mit konservierten und nicht-konservierten Kontrollproteinen des T3S-Systems.		
Interaktionspartner	Interaktion¹ mit	
	HrcU	HrcU₂₅₅₋₃₅₇
HrcN	-	+
HrcL	+	-
HpaB	+	-
HpaC	-	+

¹ Nachweis mittels GST-„pull-down“-Analysen (Publikationen 7 und 8). +, Interaktion; -, keine nachweisbare Interaktion. HrcU₂₅₅₋₃₅₇ entspricht der C-terminalen Domäne von HrcU.

2.6.3 Eine Punktmutation in HrcU revertiert den Phänotyp einer *hpaC*-Deletionsmutante

Mitglieder der FlhB/YscU-Proteinfamilie von tierpathogenen Bakterien sind vermutlich an dem durch T3S4-Proteine induzierten Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems beteiligt (Cornelis et al, 2006; Ferris & Minamino, 2006). So wurde postuliert, dass die Bindung von T3S4-Proteinen an die C-terminale Domäne von HrcU-homologen Proteinen zu einer Konformationsänderung in dieser Domäne führt und damit die Erkennung von T3S-Substraten durch den Sekretionsapparat beeinflusst (Cornelis et al, 2006; Minamino & Macnab, 2000; s. 2.2). Hinweise darauf lieferte u. a. die Beobachtung, dass FlhB von *Salmonella*-Subspezies mit Substraten des flagellären Sekretionssystems interagiert (Minamino & Macnab, 2000; Minamino & MacNab, 2000). Zudem deuten auch die Ergebnisse von genetischen Analysen auf eine Beteiligung von FlhB an dem durch das T3S4-Protein FliK induzierten Wechsel der Substratspezifität hin. So zeigten Mutantenanalysen, dass der Phänotyp einer *fliK*-Deletionsmutante durch Einführung von Mutationen in die C-terminale Domäne von FlhB revertiert werden kann (Kutsukake et al, 1994; Williams et al, 1996). Die Einführung von äquivalenten Mutationen in die C-terminale Domäne des zu FlhB homologen Proteins YscU von *Yersinia*-Subspezies führt ebenfalls zu einer Suppression des Phänotyps von T3S4-Mutanten (Edqvist et al, 2003).

Interessanterweise konnten wir zeigen, dass auch der Phänotyp einer *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hpaC*-Deletionsmutante durch die Einführung einer Punktmutation in den C-terminalen Proteinbereich von HrcU (Austausch des konservierten Tyrosinrestes an Position 318 gegen einen Aspartatrest) aufgehoben wird (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Dies deutet darauf hin, dass die Translokation von Effektorproteinen auch in Abwesenheit von HpaC effizient erfolgen kann und vermutlich durch die C-terminale Domäne von HrcU kontrolliert wird (Abbildung 7). Der Aminosäurerest Y318 liegt in einem konservierten LARXLY-Aminosäuremotiv, dessen Mutation auch in den HrcU-homologen Proteinen FlhB und YscU den Wechsel der T3S-Substratspezifität in Abwesenheit eines T3S4-Protein erlaubt (Edqvist et al, 2003; Williams et al, 1996).

2.6.4 Mögliche Funktionsmechanismen von HrcU und homologen Proteinen

Die Beteiligung von Mitgliedern der FlhB/YscU-Proteinfamilie an der Kontrolle der T3S-Substratspezifität ist in den letzten Jahren intensiv in Translokations-assoziierten und flagellären T3S-Systemen von tierpathogenen Bakterien untersucht worden. Das wissenschaftliche Interesse an der Funktion dieser Proteine während der Typ III-abhängigen Proteinsekretion wird durch die Veröffentlichung der Kristallstrukturen von vier Mitgliedern dieser Proteinfamilie im letzten Jahr verdeutlicht (Deane et al, 2008; Lountos et al, 2009; Wiesand et al, 2009; Zarivach et al, 2008). Die Strukturanalysen zeigten, dass die C-terminalen cytoplasmatischen Domänen der HrcU-homologen Proteine EscU, SpaS, YscU und FlhB trotz geringer Sequenzidentitäten (ca. 30%) auf Aminosäureebene strukturell konserviert sind. Die Proteolyse am konservierten NPTH-Motiv erfolgt nach Cyclisierung des konservierten Asparaginrestes und resultiert in zwei Proteinfragmenten, die miteinander assoziieren und eine ähnliche Faltung wie das ungespaltene Protein aufweisen (Ferris et al, 2005; Lountos et al, 2009; Minamino & Macnab, 2000; Wiesand et al, 2009; Zarivach et al, 2008). Lediglich im NPTH-Motiv führt die proteolytische Spaltung zu signifikanten Veränderungen der Proteinstruktur, die möglicherweise einen Einfluss auf die Substratspezifität des T3S-Systems ausüben (Björnfot et al, 2009; Deane et al, 2008; Lountos et al, 2009; Minamino & Macnab, 2000; Wiesand et al, 2009; Zarivach et al, 2008). Das NPTH-Motiv bildet eine Schleife zwischen zwei β -Faltblättern, deren Aminosäurereste über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und vermutlich die Proteolyse beeinflussen (Deane et al, 2008; Lountos et al, 2009). Punktmutationen, die die Prozessierung von YscU, FlhB und homologen Proteinen verhindern, liegen daher im NPTH-Motiv oder in den umliegenden Aminosäuren, zu denen auch das konservierte LARXLY-Motiv gehört (Deane et al, 2008; Lountos et al, 2009; Wiesand et al, 2009; Zarivach et al, 2008). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wird die Proteolyse von HrcU nicht nur durch Mutation des konservierten Prolinrestes des NPTH-Motivs, sondern auch durch Einführung der Y318D-Mutation (Mutation im LARXLY-Motiv) signifikant reduziert (Abbildung

7). Da die Punktmutation Y318D in HrcU die bakterielle Pathogenität jedoch nicht beeinträchtigt, ist die Spaltung von HrcU *per se* vermutlich nicht essentiell für die Funktion von HrcU bei der Typ III-abhängigen Proteinsekretion (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Mutationen im LARXLY-Motiv führen möglicherweise zu einer veränderten Positionierung der NPTH-Schleife und induzieren damit eine Proteinkonformation, welche die Proteinstruktur bei Wechsel der Substratspezifität simuliert. Dies könnte eine effiziente Typ III-abhängige Proteinsekretion verschiedener T3S-Substrate auch in Abwesenheit des T3S4-Proteins HpaC ermöglichen (Abbildung 7).

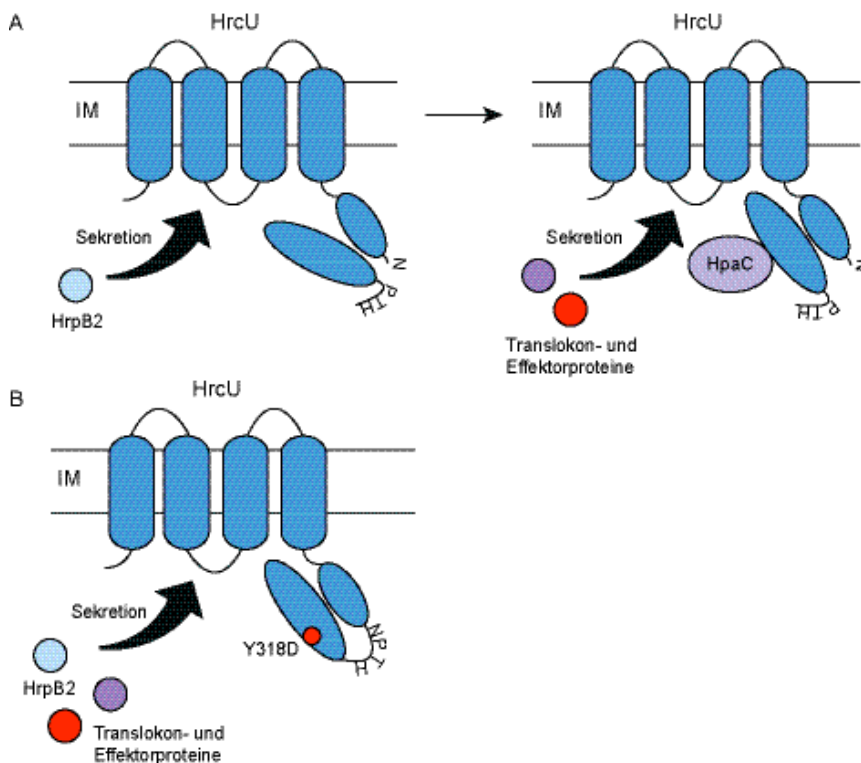


Abbildung 7: Postulierte Funktion von HrcU beim HpaC-abhängigen Wechsel der T3S-Substratspezifität.

(A) HrcU besitzt vier Transmembranhelices und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, die am konservierten NPTH-Aminosäuremotiv proteolytisch gespalten wird. Die Proteolyse führt vermutlich zu einer veränderten Orientierung der PTH-Schleife, die essentiell für die Typ III-abhängige Proteinsekretion ist. Das T3S4-Protein HpaC interagiert mit der C-terminalen Domäne von HrcU und inhibiert die Sekretion von HrpB2. HpaC induziert möglicherweise eine Veränderung der Proteinkonformation der C-terminalen HrcU-Domäne und ermöglicht so die effiziente Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen.

(B) Einfluss der Y318D-Mutation auf die Funktion von HrcU. Die Y318D-Mutation führt zu einer signifikanten Reduktion der Proteolyse von HrcU und induziert vermutlich eine Proteinkonformation, die eine effiziente Sekretion von HrpB2, Translokon- und Effektorproteinen in Abwesenheit von HpaC ermöglicht.

Für das HrcU-homologe Protein YscU von *Yersinia*-Subspezies wurde postuliert, dass der durch T3S4-Proteine induzierte Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems durch die Bildung der „inner rod“-Struktur kontrolliert wird (Wood et al, 2008; s. 2.2.2). So konnte gezeigt werden, dass die Y317D-Mutation in YscU nicht nur den Phänotyp einer T3S4-

Mutante revertiert, sondern auch die verstärkte Sekretion des „*inner rod*“-Proteins YscI supprimiert, die in T3S4-Mutanten auftritt (Wood et al, 2008). Dies deutet darauf hin, dass T3S4-Proteine durch Kontrolle der Bildung des „*inner rod*“ den Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems induzieren. Interessanterweise ermöglicht die äquivalente Y318D-Mutation in HrcU von *X. campestris* pv. *vesicatoria* zwar ebenfalls den Wechsel der Substratspezifität in Abwesenheit des T3S4-Proteins HpaC, hebt jedoch nicht die verstärkte Sekretion von HrpB2 in der *hpaC*-Deletionsmutante auf (C. Lorenz und D. Büttner, unveröffentlichte Daten). Dies lässt darauf schließen, dass der Phänotyp der *hpaC*-Deletionsmutante nicht auf die erhöhte HrpB2-Sekretion zurückzuführen ist. Es bleibt zu klären, ob HrpB2 ähnlich wie YscI als Komponente einer „*inner rod*“-Struktur am Aufbau des Sekretionsapparates beteiligt ist (s. 2.2).

3. Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von genetischen, biochemischen und molekularbiologischen Methoden zeigen, dass die Typ III-abhängige Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* durch mindestens drei Kontrollproteine, HpaA, HpaB und HpaC, reguliert wird. HpaC ist das erste bekannte T3S4-Protein eines pflanzenpathogenen Bakteriums und induziert den Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems von der Sekretion des Pathogenitätsfaktors HrpB2 zur Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen. Der HpaC-induzierte Wechsel der T3S-Substratspezifität erfolgt vermutlich mit Hilfe der C-terminalen Domäne von HrcU, einem Mitglied der FlhB/YscU-Familie konservierter Komponenten des T3S-Systems, das ähnlich wie homologe Proteine von tierpathogenen Bakterien proteolytisch gespalten wird.

Da der Aufbau des Sekretionsapparates Voraussetzung für die Translokation von Effektorproteinen ist, erfolgt die von HpaC geförderte Sekretion von Translokonproteinen wahrscheinlich vor der Sekretion von Effektorproteinen. Die effiziente Sekretion und Translokation von Effektorproteinen wird in *X. campestris* pv. *vesicatoria* nicht nur durch HpaC, sondern vor allem durch das generelle T3S-Chaperon HpaB vermittelt, welches Effektorproteine an das T3S-System heranführt. HpaB interagiert mit der mit dem Sekretionsapparat assoziierten ATPase HrcN, welche HpaB-Effektorproteinkomplexe dissoziiert und damit die Voraussetzung für den Eintritt der Effektorproteine in den inneren Kanal des Sekretionsapparates schafft. Die Chaperonaktivität von HpaB wird vermutlich durch den translozierten Regulator HpaA kontrolliert, der an HpaB bindet und damit die effiziente Sekretion von extrazellulären Komponenten des Sekretionsapparates ermöglicht. Nach Aufbau des Pilus und des Translokons führt die Sekretion und Translokation von HpaA

zur Freisetzung des Chaperons HpaB und ist damit Voraussetzung für die HpaB-abhängige Sekretion und Translokation von Effektorproteinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals das Zusammenspiel von Kontrollproteinen und konservierten Komponenten des T3S-Systems bei der Regulation der Typ III-abhängigen Proteinsekretion in einem pflanzenpathogenen Bakterium beschrieben. Die aus den Forschungsergebnissen resultierenden Publikationen haben damit entscheidend zum Verständnis der Kontrolle der Typ III-abhängigen Proteinsekretion in pflanzenpathogenen Bakterien beigetragen und zudem wichtige Unterschiede zu Regulationsmechanismen tierpathogener Bakterien offenbart. Die differentielle Beteiligung von HpaA, HpaB und HpaC an der Sekretion verschiedener T3S-Substrate von *X. campestris* pv. *vesicatoria* lässt zudem darauf schließen, dass die Sekretion von Komponenten des Sekretionsapparates und Effektorproteinen in pflanzenpathogenen Bakterien zeitlich reguliert erfolgt. In zukünftigen Forschungsarbeiten sollen daher die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, die dieser postulierten zeitlichen Regulation der Typ III-abhängigen Proteinsekretion zugrundeliegen. So soll beispielsweise der Einfluss des Sekretions- und Translokationssignals sowie der HpaB-Bindestelle auf die Sekretion von Effektorproteinen untersucht werden. Zudem soll analysiert werden, ob die Substraterkennung durch konservierte Komponenten des T3S-Systems wie beispielsweise HrcU vermittelt wird. Ein weiterer Fokus zukünftiger Arbeiten ist die Charakterisierung des HpaC/HrcU-vermittelten Wechsels der Substratspezifität.

4. Literatur

- Agrain C, Callebaut I, Journet L, Sorg I, Paroz C, Mota LJ, Cornelis GR (2005) Characterization of a type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **56**: 54-67
- Akeda Y, Galan JE (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915
- Alfano JR, Collmer A (1996) Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698
- Backert S, Meyer TF (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217
- Berger C (2005) Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Promotion, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P (2002) Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**: 971-980
- Björnftot AC, Lavander M, Forsberg A, Wolf-Watz H (2009) Auto-proteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *J Bacteriol* **in press**.
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 396-403
- Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, Stall RE (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 RE, 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 CA, Boekema EJ, 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* **70**: 1515-1528
- Boyd AP, Lambermont I, Cornelis GR (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
- Büttner D, Bonas U (2002a) Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**: 5313-5322
- Büttner D, Bonas U (2002b) Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* **10**: 186-192
- Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, 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, 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 Microbiol* **59**: 513-527
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **184**: 2389-2398
- Büttner D, Noël L, Stuttmann J, 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
- Chan JWYF, Goodwin PH (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Advances* **17**: 489-508
- Christie PJ (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* **40**: 294-305

- Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB (2004) Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**: 49804-49815
- Cornelis GR, Agrain C, Sorg I (2006) Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **9**: 201-206
- da Cunha L, Sreerekha M-V, Mackey D (2007) Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr Op Plant Biol* **10**: 349-357
- Darwin KH, Miller VL (2001) Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J* **20**: 1850-1862
- Deane JE, Graham SC, Mitchell EP, Flot D, Johnson S, Lea SM (2008) Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol* **69**: 267-276
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3597-3602
- Desvaux M, Hebraud M, Henderson IR, Pallen MJ (2006) Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol* **14**: 157-160
- Edqvist PJ, Olsson J, Lavander M, Sundberg L, Forsberg A, Wolf-Watz H, Lloyd SA (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**: 2259-2266
- Feldman MF, Cornelis GR (2003) The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 151-158
- Fenselau S, Balbo I, 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, 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 HU, Furukawa Y, Minamino T, Kroetz MB, Kihara M, Namba K, Macnab RM (2005) FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem* **280**: 41236-41242
- Ferris HU, Minamino T (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol* **14**: 519-526
- Filloux A, Hachani A, Bleves S (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiol* **154**: 1570-1583
- Fraser GM, Hirano T, Ferris HU, Devgan LL, Kihara M, Macnab RM (2003) Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**: 1043-1057
- Fu ZQ, Guo M, Alfano JR (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
- Furutani A, Takaoka M, Sanada H, Noguchi Y, Oku T, Tsuno K, Ochiai H, Tsuge S (2009) Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 96-106
- Gerlach RG, Hensel M (2007) Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**: 401-415
- Ghosh P (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl J (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449
- Gürlebeck D, Thieme F, Bonas U (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* **163**: 233-255

- Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, Ranall MV, Kettler G, Greenberg JT (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**: 1722-1726
- He SY (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 363-392
- Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, 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
- Iriarte M, Sory MP, Boland A, Boyd AP, Mills SD, Lambermont I, Cornelis GR (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* **17**: 1907-1918
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648-651
- Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, 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
- Koraimann G (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2371-2388
- Kutsukake K, Minamino T, Yokoseki T (1994) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 7625-7629
- Lavander M, Sundberg L, Edqvist PJ, Lloyd SA, Wolf-Watz H, Forsberg A (2002) Proteolytic cleavage of the FliB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol* **184**: 4500-4509
- Lilic M, Vujanac M, Stebbins CE (2006) A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell* **3**: 653-664
- Lloyd SA, Forsberg A, Wolf-Watz H, Francis MS (2001) Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol* **9**: 367-371
- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, 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, Büttner D (2008b) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* **4**: e1000094
- Lountos GT, Austin BP, Nallamsetty S, Waugh DS (2009) Atomic resolution structure of the cytoplasmic domain of *Yersinia pestis* YscU, a regulatory switch involved in type III secretion. *Protein Sci* **18**: 467-474
- Magdalena J, Hachani A, Chamekh M, Jouihri N, Gounon P, Blocker A, Allaoui A (2002) Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretin of *Shigella flexneri* from needle components to lpa proteins. *J Bacteriol* **184**: 3433-3441
- Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galan JE (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**: 637-640
- Marois E, Van den Ackerveken G, 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
- Mashburn-Warren L, Whiteley M (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* **61**: 839-846
- Mills E, Baruch K, Charpentier X, Kobi S, Rosenshine I (2008) Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host Microbe* **3**: 104-113
- Minamino T, Ferris HU, Moriya N, Kihara M, 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, Macnab RM (2000) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* **182**: 4906-4914
- Minamino T, MacNab RM (2000) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**: 1052-1064
- Minamino T, Namba K (2004) Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 5-17
- Minamino T, Namba K (2008) Distinct roles of the ATPase FliI and proton motive force in bacterial flagellar export. *Nature* **451**: 485-488
- Minamino T, Saijo-Hamano Y, Furukawa Y, Gonzalez-Pedrajo B, Macnab RM, Namba K (2004) Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *J Mol Biol* **341**: 491-502
- Morello JE, Collmer A (2009) *Pseudomonas syringae* HrpP is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate switching protein. *J Bacteriol* **191**: 3120-3131
- Müller SA, Pozidis C, Stone R, Meesters C, Chami M, Engel A, Economou A, Stahlberg H (2006) Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol* **61**: 119-125
- Ninio S, Roy CR (2007) Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol* **15**: 372-380
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, 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, 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
- Nunn D (1999) Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologues? *Trends Cell Biol* **9**: 402-408
- Oh HS, Kvitko BH, Morello JE, Collmer A (2007) *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* **189**: 8277-8289
- Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* **5**: 9
- Parsot C, Ageron E, Penno C, Mavris M, Jamoussi K, d'Hauteville H, Sansonetti P, 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, Page AL (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, Hughes KT (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**: 489-492
- Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, Panopoulos NJ, Mansfield J, Pugsley AP, Karamanou S, Economou A (2003) Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem* **278**: 25816-25824
- Preston GM, Studholme DJ, Caldelari I (2005) Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 331-360
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508-15513
- Riordan KE, Schneewind O (2008) YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol* **68**: 1485-1501
- Rodgers L, Gamez A, Riek R, Ghosh P (2008) The type III secretion chaperone SycE promotes a localized disorder-to-order transition in the natively unfolded effector YopE. *J Biol Chem* **283**: 20857-20863
- Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* **38**: 828-838

- Sandkvist M (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**: 271-283
- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**: 9-18
- Sorg I, Wagner S, Amstutz M, Muller SA, Broz P, Lussi Y, Engel A, Cornelis GR (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J* **26**: 3015-3024
- Sundberg L, Forsberg A (2003) TyeA of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in regulation of Yop expression and is required for polarized translocation of Yop effectors. *Cell Microbiol* **5**: 187-202
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**: 13-23
- Thanassi DG, Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430
- Thanassi DG, Stathopoulos C, Karkal A, Li H (2005) Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria. *Mol Membr Biol* **22**: 63-72
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klößgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**: 7254-7266
- Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G, 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
- Van Engelenburg SB, Palmer AE (2008) Quantification of real-time *Salmonella* effector type III secretion kinetics reveals differential secretion rates for SopE2 and SptP. *Chem Biol* **15**: 619-628
- Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux A (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**: 6735-6741
- Wagner S, Sorg I, Degiacomi M, Journet L, Dal Peraro M, Cornelis GR (2009) The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the *Yersinia* injectisome. *Mol Microbiol* **71**: 692-701
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (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
- Weber E, Berger C, Bonas U, 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 TK, Bonas U, 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
- Wengelnik K, Bonas U (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **178**: 3462-3469
- Wengelnik K, Marie C, Russel M, 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, Van den Ackerveken G, 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

- Wiesand U, Sorg I, Amstutz M, Wagner S, van den Heuvel J, Luhrs T, Cornelis GR, Heinz DW (2009) Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol* **385**: 854-866
- Wilharm G, Dittmann S, Schmid A, 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, 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 AW, Yamaguchi S, Togashi F, Aizawa SI, Kawagishi I, Macnab RM (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2960-2970
- Winnen B, Schlumberger MC, Sturm A, Schupbach K, Siebenmann S, Jenny P, Hardt WD (2008) Hierarchical effector protein transport by the *Salmonella Typhimurium* SPI-1 type III secretion system. *PLoS ONE* **3**: e2178
- Wood S, Jin J, Lloyd SA (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
- Wu HY, Chung PC, Shih HW, Wen SR, Lai EM (2008) Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **190**: 2841-2850
- Yip CK, Strynadka NC (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *TIBS* **31**: 223-230
- Zarivach R, Deng W, Vuckovic M, Felise HB, Nguyen HV, Miller SI, Finlay BB, Strynadka NC (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 BB, Strynadka NC (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 131-137

5. Anhang

5.1 Der Habilitationsschrift zugrunde liegende Veröffentlichungen (2003 - 2009)

Originalartikel in Fachzeitschriften

Publikation 1:

Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U (2003) Identification and characterization of XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **185**: 7092-7102

Publikation 2:

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

Publikation 3:

Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klöggen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* **187**: 7254-7266

Publikation 4:

Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **59**: 513-527

Publikation 5:

Büttner D, Noël L, Stuttmann J, 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

Publikation 6:

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

Publikation 7:

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

Publikation 8:

Lorenz C, Büttner D (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **191**: 1414-1428

Übersichtsartikel

Publikation 9:

Büttner D, Noël L, Thieme F, Bonas U (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J. Biotechnol.* **106**: 203-214

Publikation 10:

Büttner D, Bonas U (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Op. Pl. Biol.* **6**: 312-219

Publikation 11:

Büttner D, Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 193-200

Publikation 12:

Büttner D and He SH. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol*:
in press

Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen zur Habilitationsthematik

Publikation 1

In dieser Arbeit war ich an der Konzipierung der Experimente sowie zu einem großen Teil an der Verfassung des Textes beteiligt.

Publikation 2

Diese Publikation beruht auf Experimenten, die von mir konzipiert und zu einem großen Teil von mir durchgeführt wurden. Das Manuskript wurde von Prof. Dr. U. Bonas und mir erstellt.

Publikation 3

Bei dieser Veröffentlichung war ich an der Annotierung des Genoms von *X. campestris* pv. *vesicatoria* beteiligt.

Publikationen 4 - 6

Diese Publikationen beruhen auf Experimenten, die von mir konzipiert und zu einem großen Teil von mir durchgeführt wurden. Die Manuskripte wurden von Prof. Dr. U. Bonas und mir erstellt.

Publikation 7

Die Veröffentlichung beruht auf Experimenten, die hauptsächlich von mir und C. Lorenz konzipiert und durchgeführt wurden. Das Manuskript wurde von mir erstellt.

Publikation 8

Bei dieser Publikation war ich wesentlich an der Planung der Experimente beteiligt und habe das Manuskript erstellt.

Publikationen 9 – 11

Ich habe einen großen Teil des Textes zu diesen Publikationen verfasst.

Publikation 12

Der Text dieser Publikation wurde zu gleichen Teilen von Prof. Dr. Sheng Yang He und mir verfasst.

5.2 Gesamtverzeichnis der Publikationen

Originalartikel in Fachzeitschriften

- Ehltling J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich E, Kombrink E (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionary divergent classes in angiosperms. *Plant J.* **19**: 9-20
- Stuible H, Büttner D, Ehltling J, Hahlbrock K, Kombrink E (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett.* **184**: 2389-2398
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **10**: 186-192
- Noël L, Thieme F, Gäbler J, Büttner D, Bonas U (2003) Identification and characterization of XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **185**: 7092-7102
- Büttner D, Gürlebeck D, Noël L, Bonas U (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**: 755-768
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klösgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* **187**: 7254-7266
- Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **59**: 513-527
- Büttner D, Noël L, Stuttmann J, 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
- Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, Büttner D (2008) 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, Büttner D. (2008) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Path.* **4**: e1000094
- Lorenz C, Büttner D (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **191**: 1414-1428

Übersichtsartikel

- Bonas U, Ballvora A, Büttner D, Hahn K, Lahaye T, Marois E, Nennstiel D, Noël L, Pierre M, Szurek B, Van den Ackerveken G, Rossier R (2000) Hrp type III secretion-mediated signaling between *Xanthomonas* and the plant. In: Biology of Plant Microbe Interactions, Vol. 2, IS-MPMI, St. Paul, MN
- Bonas U, Van den Ackerveken G, Büttner D, Hahn K, Marois E, Nennstiel D, Noël L, Rossier O, Szurek B (2000) How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Mol Plant Pathol* **1**: 73-76
- Lahaye T, Szurek B, Marois E, Schornack S, Jordan T, Büttner D, Escolar L, Thieme F, Noël L, Bonas U (2002) Role of type III effector proteins from *Xanthomonas* in the interaction with the plant. In: Biology of Plant Microbe Interactions, Vol. 3, IS-MPMI, St. Paul, MN; S.A. Leong, C. Allen, and E.W. Triplett, eds., p. 135-140
- Büttner D, Bonas U (2002) Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* **21**: 5313-5322
- Büttner D, Bonas U (2002) Port of entry – the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**: 2389-2398
- Büttner D, Bonas U (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Op. Pl. Biol.* **6**: 312-219
- Büttner D, Noël L, Thieme F, Bonas U (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J. Biotechnol.* **106**: 203-214
- Büttner D, Thieme F, Noël L, Weber E, Bonas U (2004) Type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In *Biology of Plant-Microbe Interactions* Vol. 4, pp 123-126
- Büttner D, Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 193-200
- Büttner D and He SH. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol*: **in press**

Patente

- Büttner D, Bonas U (2004) Bacterial system for protein transport in eukaryotic cells. Patent WO/2005/085417

5.3 Lebenslauf

Dr. Daniela Büttner
Weidenplan 13 06108 Halle (Saale)
Tel.: (0345) 3881539
E-Mail: daniela.buettner@genetik.uni-halle.de

geboren am 4. August 1974
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1980 - 1993 Katholische Grundschule und Geschwister-Scholl-Gymnasium
Pulheim, Abschluss: Abitur, Note 1,3

Promotion und Studium

10/1993 – 8/1998 Biologie-Studium an der Universität zu Köln, Schwerpunkte:
Biochemie, Botanik und Genetik, Abschluß Diplom,
Note: sehr gut

11/1997 – 8/1998 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in
Köln, Abteilung Prof. Dr. Klaus Hahlbrock. Thema der Arbeit:
Charakterisierung zweier 4-Cumarat:CoA-Ligasen aus *Arabidopsis*
thaliana. Note: sehr gut

11/1998 – 10/2002 Promotion am Institutsbereich Genetik, Martin-Luther-Universität
(MLU) Halle-Wittenberg, Abteilung Prof. Dr. Ulla Bonas
Thema der Arbeit: Funktionelle Charakterisierung der Region von
hrpE bis *hrpF* in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
Gesamtnote „summa cum laude“

Beruflicher Werdegang

11/2002 – 4/2003 Postdoc am Institut für Genetik, MLU Halle-Wittenberg, Abteilung
Prof. Dr. Ulla Bonas

5/2003 – heute Gruppenleiterin am Institut für Genetik, MLU Halle-Wittenberg,
Abteilung Prof. Dr. Ulla Bonas

Förderungen und Urkunden

11/1998 – 3/1999 Stipendium der Graduiertenförderung der MLU Halle-Wittenberg

4/1999 – 3/2001 Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie

7/2003 Luther-Urkunde der MLU Halle-Wittenberg

Lehrtätigkeit

Art der Lehre Veranstaltung

Grundlehre Grundpraktikum Genetik für Biologen und Biochemiker

Seminar zur Grundvorlesung Genetik

Molekulares Querschnittspraktikum Genetik

Vorlesungen im Rahmen der „Grundvorlesung Genetik“

Hauptfachlehre Fortgeschrittenenpraktikum Genetik

Begleitendes Seminar zum Fortgeschrittenenpraktikum Genetik

Seminar „Biomembranen: Molekulare Aspekte des Stoff- und Informationstransfers“

Vorlesungen im Rahmen folgender Vorlesungsreihen:

- „Molekulare Phytopathologie“
- „Molekulargenetik der Pflanzen“
- „Pflanzenbiotechnologie im neuen Jahrtausend“

Diplomanden Steve Schulz

Maria Hofmann

Christian Lorenz

Johannes Stuttmann

Claudia Schramm

Doktoranden Christian Lorenz

Steve Schulz

Drittmittelprojekte

Teilprojekt B6 („Identifizierung und Analyse von Kontrollproteinen des bakteriellen Typ III-Sekretionssystems“) im SFB 648 („Molekulare Mechanismen der Informationsverarbeitung in Pflanzen“) – 1 Doktorand und Sachmittel

DFG-Einzelprojekt (BU2145/1-1, „Funktionelle Charakterisierung des Pathogenitätsfaktors HrpB2 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*“) - 1 Doktorand und Sachmittel

5.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas bedanken, die es mir ermöglicht hat, in diesem Forschungsgebiet in ihrer Arbeitsgruppe tätig zu sein und mich in meinem wissenschaftlichen Werdegang stets unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Johannes Stuttmann, Maria Hofmann, Steve Schulz und Christian Lorenz) für ihre engagierte Mitarbeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Matthias Jordan gebührt mein ausdrücklicher Dank für seine tatkräftige Hilfe bei der Durchführung vieler Experimente. Zudem möchte ich Dr. habil. Jens Boch, Dr. Doreen Gürlebeck, Dr. Thomas Lahaye, Dr. Frank Thieme, Dr. Robert Szczesny und Cornelius Schubert für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Ich möchte mich auch ganz besonders bei meinen Kooperationspartnern Dr. Dr. Gerd Hause und Dr. Angelika Schierhorn bedanken sowie bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bonas für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Teile der Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziert, der ich herzlich für die Unterstützung danken möchte.

5.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität einen Antrag auf eine Habilitation eingereicht.

Halle (Saale), den 10.6.2009

Daniela Büttner