

**„Analyse von Exportsignalen von Typ-III- und Typ-IV-  
Sekretionssubstraten aus  
*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*“**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Felix Scheibner

geb. am 14.01.1988 in Leipzig

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. Daniela Büttner
2. Prof. Dr. Gary Sawers
3. Prof. Dr. Karsten Niehaus

Verteidigung: 01. November 2016

## **Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert**

**Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A. K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M. and Büttner, D.** 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. J Bacteriol **197**:2879-2893.

**Scheibner, F., Schulz, S., Hausner, J., Marillonnet, S. and Büttner, D.** 2016. Type III-dependent translocation of HrpB2 by a non-pathogenic *hpaABC* mutant of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas*. Appl Environ Microbiol doi:**10.1128/AEM.00537-16**.

## Zusammenfassung

Das Gram-negative pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate. Für einen erfolgreichen Befall des Wirtes nutzt *Xcv* Proteinsekretionssysteme, die bakterielle Proteine (Nicht-Effektoren) in das extrazelluläre Milieu sekretieren oder direkt in das Cytoplasma von Wirtszellen translozieren (Effektoren). Von den insgesamt sechs Sekretionssystemen in *Xcv* ist das Typ-III-Sekretions (T3S)-System essentiell für die Pathogenität. Die Translokation von Effektoren ist von einem Translokon abhängig. Das Translokon besteht in der Regel aus einem Proteinkomplex, welcher vermutlich in die Wirtszellmembran inseriert und dadurch den gerichteten Transport von bakteriellen Proteinen ermöglicht. Die vom T3S-System translozierten Effektoren manipulieren Wirtszellprozesse zum Vorteil des Bakteriums. Proteine, die über das T3S-System transportiert werden, benötigen in der Regel ein N-terminales T3S- und Translokationssignal. Neben den Exportsignalen wird die Sekretion und Translokation von Proteinen durch T3S-assoziierte Kontrollproteine reguliert. Drei Gene, welche Kontrollproteine in *Xcv* kodieren, sind im chromosomalen *hrp*-Gencluster („hypersensitive response and pathogenicity“) kodiert. Für die Hpa („*hrp*-associated“)-Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC konnte bereits in früheren Studien ein positiver Einfluss auf die T3S und Translokation nachgewiesen werden.

T3S- und Translokationssignale in Proteinen von *Xcv* sind noch weitestgehend unerforscht. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung Typ-III-abhängiger Exportsignale mit Hilfe von *in vitro*-Sekretionsstudien und Reporter-basierten *in vivo*-Translokationsstudien. Die Analyse von sekretierten Komponenten des T3S-Systems sowie eines Effektorproteins zeigte, dass T3S- und Translokationssignale innerhalb der N-terminalen 10 - 40 Aminosäuren lokalisiert sind. Zudem wurde in dieser Arbeit der Einfluss der drei Hpa-Proteine auf die Translokation von Proteinen weiter analysiert. Die Deletion der Gene *hpaA*, *hpaB* und *hpaC* führte zum Pathogenitätsverlust von *Xcv*, was vermutlich auf eine reduzierte Translokation von Effektorproteinen zurückzuführen ist. Jedoch wurden Fusionsproteine, bestehend aus dem Translokationssignal eines Nicht-Effektors und einem Effektorprotein, in Abwesenheit der Kontrollproteine effizient transloziert, was durch *in vivo*-Translokationsstudien nachgewiesen werden konnte.

Bisher galt die Translokation von Effektoren durch *Xcv* als Translokon-abhängig. Mittels eines sensitiven Nachweisverfahrens, welches auf einem Virus-induzierten Reportersystem basiert, wurde erstmals eine partiell Translokon-unabhängige Translokation eines Effektorproteins durch *Xcv* gezeigt.

Neben dem T3S-System besitzt *Xcv* zwei putative Typ-IV-Sekretions (T4S)-Systeme, die möglicherweise Proteine und/oder DNA in Wirtszellen transportieren können. *Xcv* ist das erste bekannte Pflanzenpathogen, das neben einem VirB/VirD4-ähnlichen T4S-System ein Dot/Icm („defect in organelle trafficking/intracellular multiplication“)-ähnliches T4S-System besitzt. Der Einfluss beider T4S-Systeme auf die Pathogenität von *Xcv* ist bislang unbekannt. Infektions- und Komplementationsstudien mit T4S-Mutanten haben gezeigt, dass die Virulenz von *Xcv* sowohl durch das VirB/VirD4-ähnliche als auch das Dot/Icm-ähnliche T4S-System beeinflusst wird. Durch eine Kombination von bioinformatischen Vorhersagen und anschließender experimenteller Verifizierung wurden Kandidatenproteine in *Xcv* identifiziert, welche möglicherweise über das VirB4/VirD4-ähnliche T4S-System transloziert werden.

## Summary

The Gram-negative plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of the bacterial spot disease on pepper and tomato plants. For a successful infection the bacterium employs protein secretion systems, which secrete bacterial proteins (non-effectors) into the extracellular milieu or translocate proteins (effectors) directly into the host cell. Essential for pathogenicity is the type III secretion (T3S) system, which is one out of six secretion systems in *Xcv*. The delivery of effector proteins depends on a bacterial translocon, a protein complex, which presumably inserts into the host plasma membrane. Effector proteins manipulate host cellular pathways to the benefit of the pathogen. In many cases N-terminal T3S and translocation signals are important for export of proteins through the T3S system. Beside export signals, the secretion and translocation of proteins is regulated by type III-associated control proteins. Three control genes are encoded in the chromosomal *hrp* gene cluster (“hypersensitive response and pathogenicity”). In previous studies it was shown that the Hpa (“*hrp*-associated”) control proteins HpaA, HpaB and HpaC from *Xcv* contribute to T3S and/or translocation.

The precise localization of T3S and translocation signals in proteins of *Xcv* is largely not known. Therefore, the aim of this study was the identification of type III-dependent export signals using *in vitro* secretion assays and reporter-based *in vivo* translocation assays. The analysis of secreted type III-components and one effector protein revealed that secretion and translocation signals are located within the N-terminal 10 - 40 amino acids. In addition, an inhibitory influence of Hpa proteins on translocation was further investigated. The deletion of *hpaA*, *hpaB* and *hpaC* in *Xcv* leads to a loss of pathogenicity, which might be a result of a reduced translocation of effector proteins. However, fusion proteins between the translocation signal of a non-effector and an effector protein were efficiently translocated in the absence of control proteins.

So far, translocation of effector proteins by *Xcv* was described to be translocon-dependent. By use of a sensitive translocation assay, which was based on a virus-induced reporter system, a partial translocon-independent translocation of an effector protein from *Xcv* has been demonstrated for the first time.

Beside the T3S system, *Xcv* contains two putative type IV secretion (T4S) systems. T4S systems are sophisticated molecular nanomachines which can deliver DNA and/or proteins into host cells. *Xcv* is the only known plant-pathogenic bacterium, which contains a VirB/D4-like and an Dot/Icm-like (“defect in organelle trafficking/intracellular multiplication”) T4S system. The role of both T4S systems has not yet been studied in *Xcv*. Mutation and complementation studies revealed a virulence function for the VirB/VirD4-like as well as the Dot/Icm-like T4S system from *Xcv*. Furthermore, a combination of bioinformatic tools and experimental validation lead to the identification of putative T4S substrates in *Xcv*. The identified substrates were presumably transported via the VirB/VirD4 T4S system.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	II
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	III
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	IX
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Virulenzfaktoren – „Key player“ für eine erfolgreiche bakterielle Infektion.....	1
1.2 Das Typ-III-Sekretionssystem.....	3
1.2.1 Die Architektur von T3S-Systemen.....	3
1.2.2 Die Rekrutierung von T3S-Substraten.....	7
1.3 Typ-IV-Sekretionssysteme - „Multitasking-fähige“ Nanomaschinen in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.....	10
1.3.1 Die Architektur von T4S-Systemen.....	11
1.3.1.1 Der Aufbau des T4AS-Systems von <i>Agrobacterium</i> .....	11
1.3.1.2 Der Aufbau des T4BS-Systems von <i>Legionella</i> .....	14
1.3.2 Erkennung und Unterscheidung von Substraten des T4S-Systems.....	16
1.4 Das phytopathogene Bakterium <i>Xanthomonas</i> .....	18
1.4.1 Der Modellorganismus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	18
1.4.2 Effektorproteine von <i>Xcv</i> .....	19
1.4.3 <i>Xcv</i> kodiert ein T3S- und zwei putative T4S-Systeme.....	20
1.4.4 Achtung Kontrolle: Checkpoints in der T3S und Translokation.....	23
1.5 Zielstellung.....	27
<b>2. Material und Methoden</b> .....	28
2.1. Material.....	28
2.1.1 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.2 Medien und Antibiotika.....	28
2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	29
2.1.4 Oligonukleotide.....	29
2.1.5 Pflanzenmaterial.....	29
2.1.6 Antikörper.....	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	30
2.2.1.2 DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	30
2.2.1.3 „Primer-annealing“-Protokoll.....	31
2.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.1.5 „Blunt end“-Klonierung.....	32
2.2.1.6 „Golden Gate“-Klonierung.....	32

2.2.1.7 Erstellung von Expressionskonstrukten und Deletionsmutanten .....	33
2.2.1.8 Transformation von <i>E. coli</i> .....	41
2.2.1.9 Triparentale Konjugation.....	41
2.2.1.10 Elektroporation von <i>Xcv</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	42
2.2.1.11 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte transiente Proteinexpression <i>in planta</i> .....	42
2.2.1.12 Quantitative und Semiquantitative RT-PCR-Analysen .....	43
2.2.2 Biochemische Methoden .....	44
2.2.2.1 Protein-Extraktion aus <i>Xcv</i> .....	44
2.2.2.2 SDS-PAGE .....	45
2.2.2.3 Western-Blot.....	45
2.2.3 <i>In vitro</i> -Sekretionsanalysen .....	46
2.2.4 Infiltration von Bakterien in Paprika- bzw. Tabakblätter .....	46
2.2.5 <i>In planta</i> Wachstumskurven .....	46
2.2.6 <i>In silico</i> -Analysen zur Identifizierung potentieller T4S-Substrate in <i>Xcv</i> mittels S4TE ..	47
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1 Analyse von T3S- und Translokationssignalen ausgewählter Substrate des T3S-Systems von <i>Xcv</i> unter Verwendung des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters.....	50
3.1.1 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in AvrBs3 .....	50
3.1.2 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in XopA.....	54
3.1.3 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in HrpB2 .....	57
3.1.4 Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 vermitteln die Translokation eines „designer“-TALE in die Nicht-Wirtspflanze <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	60
3.2 AvrBs1 $\Delta$ N58 als alternativer Reporter zur Analyse von T3S- und Translokationssignalen .....	64
3.2.1 Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 vermitteln die Translokation des AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporters .....	65
3.2.2. Die N-terminalen 25 Aminosäuren von XopA vermitteln die Translokation des AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporters .....	67
3.2.3 Das T3S- und Translokationssignal von HrpB2 ist notwendig und hinreichend für die Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 .....	68
3.3 Translokation von Proteinen ohne Translokonprotein .....	70
3.3.1 Translokon-unabhängige Translokation von TAL-Effektoren in Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen von <i>Xcv</i> .....	70
3.3.2 Nachweis der Translokon-unabhängigen Translokation von AvrBs3 mittels Transkriptanalysen von <i>UPA20</i> und <i>Bs3</i> .....	73
3.4 Die putativen T4S-Systeme von <i>Xcv</i> .....	76
3.4.1 Der Einfluss des T4AS-Systems auf die Virulenz von <i>Xanthomonas</i> .....	76
3.4.2 Der Einfluss des T4BS-Systems auf die Virulenz von <i>Xanthomonas</i> .....	79
3.5 Erste Hinweise auf T4S-Substrate in <i>Xanthomonas</i> ? .....	82
3.5.1 <i>In silico</i> -Analysen mittels des Vorhersageprogrammes S4TE identifizieren putative T4S-Substrate in <i>Xcv</i> .....	84
3.5.2 Ein neues Reportersystem zur Untersuchung potentieller T4S-Substrate in <i>Xcv</i> .....	85

---

<b>4. Diskussion</b> .....	91
4.1 Identifizierung von minimalen T3S- und Translokationssignalen in den T3S-Substraten AvrBs3, XopA und HrpB2 .....	91
4.1.1 Die N-Terminalen Bereiche von AvrBs3, XopA und HrpB2 weisen nur teilweise vermeintlich typische Eigenschaften von T3S-Signalen auf .....	93
4.1.2 Erkennung von T3S-Substraten mit Hilfe des T3S-Signals .....	95
4.1.3 Der AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter eignet sich nicht zur Identifizierung von minimalen Translokationssignalen in T3S-Substraten .....	98
4.1.4 Vor- und Nachteile verschiedener Reporterproteine zur Analyse der Proteinsekretion und -translokation .....	100
4.1.5 <i>Xanthomonas</i> außer Kontrolle: Eine Möglichkeit zur Analyse individueller Effektorproteine? .....	103
4.2 Die Translokation von Proteinen ohne das Translokonprotein HrpF .....	103
4.3.1 Das T4S-System von <i>Xanthomonas</i> : ein weiterer Virulenzfaktor? .....	106
4.3.2 Die Identifizierung von T4S-Substraten in <i>Xanthomonas</i> .....	109
4.3.3 Potentielle T4S-Substrate von <i>Xanthomonas</i> können durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in <i>N. benthamiana</i> transloziert werden .....	110
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	113
<b>5. Anhang</b> .....	134
<b>Lebenslauf</b> .....	150
<b>Danksagung</b> .....	151
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	152

## Abkürzungsverzeichnis

3x c-Myc	dreifache c-Myc-Aminosäuresequenz	OMC	„outer membrane complex“: äußerer Membrankomplex
ATP	Adenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Avr	Avirulenz	PCR	„polymerase chain reaction“
ÄM	äußere Membran	pv.	Pathovar
C	Carboxy	rpm	„revolutions per minute“
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat	qRT	quantitative reverse Transkriptase PCR
cDNA	„complementary“ DNA	R	Resistenz
Cya	Adenylatcyclase-Domäne	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	reverse Transkriptase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	S4TE	„Searching algorithm for type-IV secretion system effectors“
dTALE	„designer“ TALE	Sct	„secretion and cellular translocation“
dot/icm	„defect in organelle trafficking/ intracellular multiplication“	SDS	„Sodiumdodecylsulfat“
ECW	„Early Californian Wonder“	Sec	„secretory pathway“
Flg	„flagellum“	spp.	„species“, Arten
fT3S-System	flagelläres T3S-System	T2S	Typ-II-Sekretion
GE	Gesamtzellextrakt	T3	Typ-III
GFP	grün fluoreszierendes Protein	T3S	Typ-III-Sekretion
Hpa	„ <i>hrp</i> -associated“	T3S4	„T3S substrate specificity switch“
HR	hypersensitive Reaktion	T4S	Typ-IV-Sekretion
Hrp	„hypersensitive response and pathogenicity“	T4AS	Typ-IVA-Sekretion
Hrc	„ <i>hrp</i> -conserved“	T4BS	Typ-IVB-Sekretion
IM	innere Membran	T4CS	Typ-IVC-Sekretion
IMC	„inner membrane complex“: innerer Membrankomplex	TAE	Tris-Acetat-EDTA
Kb	Kilobasenpaare	TALE	„Transcription activator-like effector“
KBE	koloniebildende Einheiten	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
kDa	Kilodalton	TBE	„Tris-buffered EDTA“
NYG	„Nitrogen Yeast Glycerol“	TBST	„Tris-buffered saline“
MA	Minimalmedium	TMV	Tabakmosaikvirus
mRNA	„messenger“ RNA	u. a.	unter anderem
N	Amino	UPA	„upregulated by AvrBs3“
n. a.	nicht analysiert	ÜS	Überstand
NLS	„nuclear localisation signal“	UV	Ultraviolett
NTP	Nukleotidtriphosphat	<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
		Xop	„ <i>Xanthomonas</i> outer protein“
		Yop	„ <i>Yersinia</i> outer protein“
		Ysc	„Yop secretion“



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Aufbaus von Translokations-assoziierten T3S-Systemen.....	7
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Aufbaus von T4AS- und T4BS-Systemen.....	16
Abbildung 1.3 Bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen verursacht durch <i>Xcv</i> .....	19
Abbildung 1.4 T3-Kontrollproteine koordinieren den Export von T3S-Substraten.....	26
Abbildung 2.1 Prinzip der „Golden-Gate“-Klonierung.....	33
Abbildung 2.2 Schematische Darstellung zur Erstellung von Reporterkonstrukten für die Analyse von T3S- und Translokationssignalen ausgewählter T3S-Substrate.....	34
Abbildung 2.3 Schematische Übersicht über die Erstellung von dTALE-2ΔN-Konstrukten. ...	37
Abbildung 2.4 Schematische Übersicht über die Erstellung von Reporterkonstrukten für die Analyse von Translokationssignalen ausgewählter T4S-Substrate.....	38
Abbildung 3.1.1 Schematische Darstellung des TAL-Effektors AvrBs3.....	51
Abbildung 3.1.2 Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 vermitteln die Sekretion von AvrBs3Δ2.....	51
Abbildung 3.1.3 Identifizierung eines T3S- und Translokationssignals in AvrBs3.....	53
Abbildung 3.1.4 Schematische Darstellung des T3S-Signals (SS) und Translokationssignals (TS) in XopA. ....	54
Abbildung 3.1.5 <i>In vitro</i> -Sekretionsanalysen mit verschiedenen XopA-AvrBs3Δ2-Derivaten.....	55
Abbildung 3.1.6 Die Aminosäuren 2 - 5 von XopA sind entbehrlich für die <i>hpaB</i> -abhängige Translokation von XopA-AvrBs3Δ2. ....	56
Abbildung 3.1.7 Schematische Darstellung des T3S-Signals (SS) und Translokationssignals (TS) von HrpB2.....	57
Abbildung 3.1.8 Translokations- und Sekretionsanalysen mit verschiedenen <i>hrpB2</i> -Derivaten in translationaler Fusion mit dem <i>avrBs3Δ2</i> -Reporter.....	58
Abbildung 3.1.9 HpaA, HpaB und HpaC beeinflussen den Export von HrpB2-AvrBs3Δ2-Fusionsproteinen.....	59
Abbildung 3.1.10 Der „designer“ TAL-Effektor dTALE-2 als Reporter zur Analyse der Proteintranslokation.....	61
Abbildung 3.1.11 Die <i>hpaABC</i> -Mutante transloziert HrpB2 <sub>1-40</sub> -dTALE-2ΔN in die Nicht-Wirtspflanze <i>N. benthamiana</i> . ....	62
Abbildung 3.2.1 AvrBs1, jedoch nicht AvrBs1ΔN58 komplementiert eine <i>avrBs1</i> -Mutante. ...	65
Abbildung 3.2.2 Translokationsanalysen mit AvrBs3-AvrBs1ΔN58-Derivaten.....	66
Abbildung 3.2.3 Translokationsanalysen mit XopA-AvrBs1ΔN58-Derivaten.....	68
Abbildung 3.2.4 Translokations- und Sekretionsanalysen mit verschiedenen <i>hrpB2</i> - Derivaten in translationaler Fusion mit dem <i>avrBs1ΔN58</i> -Reporter.....	69
Abbildung 3.3.1 Die Translokation von dTALE-2 ist partiell unabhängig vom putativen Translokonprotein HrpF und XopA, jedoch abhängig vom T3S-System.....	71

---

Abbildung 3.3.2 Die Translokation von AvrBs3 ist vermutlich partiell unabhängig von den putativen Translokonproteinen HrpF und XopA. ....	72
Abbildung 3.3.3 qRT- und RT-PCR-Analysen zeigen einen Anstieg im Transkriptgehalt von <i>UPA20</i> und <i>Bs3</i> nach Infiltration einer <i>hrpF</i> -Mutante, welche <i>avrBs3</i> exprimiert. ....	75
Abbildung 3.4.1 Phänotypische Analyse von Stämmen mit Deletionen in Genen des T4AS-Systems. ....	77
Abbildung 3.4.2 Die Deletion von <i>virB4</i> hat keinen signifikanten Einfluss auf das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Paprikapflanzen. ....	78
Abbildung 3.4.3 <i>lcmE</i> sowie <i>DotC</i> und/oder <i>DotB</i> haben einen Einfluss auf die Virulenz von <i>Xcv</i> . ....	80
Abbildung 3.4.4 Einfluss von <i>lcmE</i> und <i>DotCB</i> auf das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Paprikapflanzen. ....	81
Abbildung 3.5.1 Das T4BS-System von <i>Xcv</i> hat vermutlich keinen Einfluss auf die Sekretion ausgewählter T2S-Substrate. ....	84
Abbildung 3.5.2 C-terminale Bereiche putativer T4S-Substrate von <i>Xcv</i> vermitteln die Translokation von dTALE-2 durch <i>A. tumefaciens</i> in <i>gfp</i> -transgene <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen. ....	88
Abbildung 3.5.3 dTALE-2-Fusionsproteine werden über <i>A. tumefaciens</i> , nicht aber über die <i>Xcv</i> -Stämme 85-10 $\Delta$ <i>hrp</i> und 75-3 $\Delta$ <i>hrcV<sub>c</sub></i> in <i>gfp</i> -transgene <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen transloziert. ....	90
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der für den Export wichtiger Regionen in AvrBs3, XopA und HrpB2. ....	93
Abbildung 4.2 Der Einfluss des T3S- und Translokationssignals sowie der Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC auf den Export von T3S-Substraten. ....	98
Abbildung 4.2 Vor- und Nachteile von verschiedenen Reporterproteinen zur Analyse von Translokationssignalen. ....	102

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 <i>hrp</i> -Gene und deren mögliche Funktion in <i>Xcv</i> .	23
Tabelle 2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	28
Tabelle 2.2 Medienzusammensetzung	29
Tabelle 2.3 Antibiotika	29
Tabelle 2.4 Wachstumsbedingungen für <i>C. annuum</i> und <i>N. benthamiana</i>	30
Tabelle 2.5 Verwendete Antikörper	30
Tabelle 2.6 PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen	31
Tabelle 2.7 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die „blunt end“-Klonierung	32
Tabelle 2.8 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die „Golden Gate“-Klonierung	33
Tabelle 2.9 Reaktionsansatz und Bedingungen der qRT-PCR und RT-PCR	44
Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (10 %)	45
Tabelle 3.1 Zusammenfassung der Sekretions- und Translokationsanalysen	63
Tabelle 3.2 Eigenschaften der untersuchten T2S-Substrate	83
Tabelle 3.3 Ausgewählte, durch S4TE vorhergesagte T4S-Substrate in <i>Xcv</i>	86
Tabelle 5.1 Bakterienstämme	134
Tabelle 5.2 Verwendete Plasmide	135
Tabelle 5.3 Verwendete Oligonukleotide	138
Tabelle 5.4 Durch S4TE vorhergesagte T4S-Substrate in <i>Xcv</i> .	140

# 1. Einleitung

## 1.1 Virulenzfaktoren – „Key player“ für eine erfolgreiche bakterielle Infektion

Die Interaktion zwischen pathogenen Bakterien und Pflanzen ist eines der komplexesten Phänomene der Biologie. Neben abiotischen Faktoren kann die Ursache von Pflanzenkrankheiten einer Vielzahl von verschiedenen pathogenen Phytobakterien zugrunde liegen, die in unterschiedlichsten Wirtspflanzen ein unzählig breites Spektrum an Krankheitssymptomen auslösen können. Dabei nutzen Bakterien vielfältige Strategien, um mit dem Wirtsorganismus zu interagieren und diesen zu manipulieren. Der Apoplast ist dabei in den meisten Fällen das erste „Schlachtfeld“ und bildet somit eine Schnittstelle im Kampf von Phytopathogen und Pflanze. Pflanzen besitzen die Möglichkeit über spezifische Rezeptoren mikrobielle Strukturen von Bakterien zu erkennen und auf den bakteriellen Angriff mit einer Abwehrreaktion zu reagieren (Dodds und Rathjen 2010). Aus der Sicht des Pathogens erfolgt die Interaktion mit dem Wirt über sogenannte Virulenzfaktoren, die an die bakterielle Zelloberfläche oder über die bakterielle Zellhülle in das extrazelluläre Milieu transportiert werden. Zum Beispiel helfen oberflächenexponierte Adhäsine dem Bakterium sich in frühen Phasen der Infektion an die Pflanzenzelle anzuheften (Rojas *et al.*, 2002, Smit *et al.*, 1992). Extrazelluläre Polysachharide (EPS) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Virulenz von phytopathogenen Bakterien (Chithrashree und Srinivas 2016). Beispielsweise hat die Produktion von EPS einen positiven Einfluss auf die Fortbewegung des vaskulären Pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Xylemgefäßen von Reispflanzen (Watabe *et al.*, 1993). Das EPS Xanthan schützt Bakterien aber auch vor Umweltbelastungen, wie Austrocknung oder Toxinen aufgrund seiner hohen hydratisierenden, anionischen Beschaffenheit (Büttner und Bonas 2010). Zellwand-abbauende Enzyme und bakterielle Toxine stellen weitere wichtige Virulenzfaktoren in pflanzenpathogenen Bakterien dar. So fördert beispielsweise der Export von Zellwand-abbauenden Cellulasen, Xylanasen, Polygalcturonasen und Amylasen die Virulenz des Bakteriums (Faulkner und Robatzek 2012, Hamann 2012, Solé *et al.*, 2015). Phytotoxine, wie beispielsweise Coronatine, Syringopeptide und Syringomycine wurden vorallem in *Pseudomonas* spp. untersucht (Bender *et al.*, 1999). Das Toxin Coronatin ermöglicht beispielsweise die aktive Öffnung von Stomata, wodurch ein Eindringen der Bakterien in die Pflanze ermöglicht werden könnte (Melotto *et al.*, 2008).

Damit Virulenzfaktoren von Gram-negativen Bakterien über die innere und äußere bakterielle Membran transportiert werden können, benötigen diese Bakterien spezielle Proteinsekretionssysteme. In Gram-negativen Bakterien wurden bisher sechs verschiedene Sekretionssysteme beschrieben, die spezifische Virulenzfaktoren in das extrazelluläre Milieu sekretieren oder direkt in die Wirtszelle translozieren können (Chang *et al.*, 2014, Tseng *et al.*, 2009). Somit stellen die Proteinsekretionssysteme selbst auch einen Virulenzfaktor für pathogene Bakterien dar. Die Proteinsekretion vom bakteriellen Cytoplasma über die innere Membran erfolgt über das „general secretion“ (Sec)-System oder über das „twin arginine translocation“ (Tat)-System (Natale *et al.*, 2008). Damit Proteine über das Sec-System transportiert werden können, weisen die Substrate in ihrem N-terminalen Proteinbereich eine Signalsequenz, bestehend aus ca. 20 Aminosäuren auf, die während oder nach dem Sec-abhängigen Transport abgespalten werden (Natale *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2010). Im Gegensatz zum Sec-System transportiert das Tat-System gefaltete Proteine (Robinson und Bolhuis 2004). Substrate des Tat-Systems enthalten in ihrem N-terminalen Proteinbereich eine Signalsequenz aus einem paar („twin“) Argininen (S-R-R) (Müller 2005).

Die sechs Sekretionssysteme werden in Sec-abhängige und Sec-unabhängige Systeme eingeteilt. Im Fall der Sec-abhängigen Sekretion erfolgt der Transport spezifischer Substrate zunächst über die innere Bakterienmembran in das Periplasma. Von dort aus erfolgt die Sekretion über das Typ-II-Sekretions (T2S)-System oder das Typ-V-Sekretions (T5S)-System über die äußere Bakterienmembran. Die vom Sec-System unabhängige Sekretion von Substraten erfolgt unter anderem durch das Typ-I-Sekretions (T1S)-System. Die korrespondierenden Substrate verfügen in der Regel über ein C-terminales, nicht abspaltbares Signal, welches den spezifischen Transport über das T1S-System ermöglicht (Holland *et al.*, 2009, Linhartova *et al.*, 2010). Die bis hier beschriebenen Proteinsekretionssysteme ermöglichen die Sekretion von Substraten über die innere und/oder äußere bakterielle Membran. Translokationskompetente Sekretionssysteme, die ebenfalls unabhängig vom Sec-System arbeiten, sind zusätzlich in der Lage Proteine in andere prokaryotische oder eukaryotische Zellen zu translozieren. Zu diesen translokations-assoziierten Sekretionssystemen zählen das Typ-III-Sekretions (T3S)-, Typ-IV-Sekretions (T4S)- und Typ-VI-Sekretions (T6S)-System. Die meisten pathogenen Bakterien nutzen wahrscheinlich eine Kombination verschiedener Proteinsekretionssysteme, um ihre jeweilige Wirtszelle erfolgreich zu besiedeln.

## 1.2 Das Typ-III-Sekretionssystem

Generell werden Typ-III-Sekretions (T3S)-Systeme in Translokations-assoziierte T3S-Systeme und flagelläre T3S (fT3S)-Systeme eingeteilt. Beide Typen von T3S-Systemen sind sowohl evolutionär als auch strukturell miteinander verwandt (Tampakaki *et al.*, 2010). Das fT3S-System ist unter anderem für die Motilität des Bakteriums verantwortlich (Terashima *et al.*, 2008). Allerdings konnte für das fT3S-System gezeigt werden, dass es eine Vielzahl an weiteren Funktionen, wie beispielsweise die Adhäsion, Biofilmbildung und Sekretion von Virulenzfaktoren, übernimmt (Duan *et al.*, 2013).

Translokations-assoziierte T3S-Systeme sind essentiell für die Pathogenität einer Vielzahl von Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien und ermöglichen die Translokation von bakteriellen Proteinen (Effektoren) in eine eukaryotische Wirtszelle (Büttner 2012). Effektorproteine fördern das Überleben und die Vermehrung des Pathogens durch die Modellierung von Wirtszellprozessen (Escoll *et al.*, 2016). Seit nunmehr ca. 30 Jahren werden die Funktion und der Aufbau des T3S-Systems in verschiedenen Modelorganismen intensiv erforscht. T3S-Systeme werden unter anderem in tierpathogenen Bakterien der Gattung *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* und *Burkholderia* aber auch in pflanzenpathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas*, *Pseudomonas* und *Erwinia* untersucht.

### 1.2.1 Die Architektur von T3S-Systemen

Das T3S-System wird aus mehr als 20 Komponenten assembliert, von denen mindestens 15 Teil eines funktionalem Proteinkomplex sind (Diepold und Wagner 2014). Basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen sind mindestens neun Komponenten des Translokations-assoziierten und acht Komponenten des fT3S-Systems zwischen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien konserviert. Diese konservierten Kernkomponenten des T3S-Systems bilden vermutlich den Basalapparat aus, welcher die innere und äußere bakterielle Membran durchspannt und mit extrazellulären Strukturen verbunden ist (Abbildung 1.1) (Kubori *et al.*, 1998, Notti und Stebbins 2016, Schraidt und Marlovits 2011). Die im Folgenden verwendeten Proteinamen für translokations-assoziierte T3S-Systeme beziehen sich auf die Sct-Nomenklatur („secretion and cellular translocation“) (Hueck 1998).

### Die extrazellulären Strukturen des T3S-Systems

In FT3S-Systemen handelt es sich bei der extrazellulären Struktur um einen Haken, welcher mit einem bis zu 15 µm langen Filament verbunden ist (Terashima *et al.*, 2008, Yonekura *et al.*, 2003). Bei Translokations-assoziierten T3S-Systemen wird dagegen zwischen einer extrazellulären Nadel-Struktur (Tierpathogene) und einer Pilus-Struktur (Pflanzenpathogene) unterschieden (Abbildung 1.1). Die Nadellänge variiert zwischen verschiedenen tierpathogenen Bakterien von 40 - 80 nm, während der Pilus in pflanzenpathogenen Bakterien mit einer Länge von bis zu 2 µm deutlich länger ist (Büttner 2012). Die enorme Länge des Pilus ist vermutlich nötig, um die pflanzliche Zellwand zu durchdringen. Gebildet wird die Nadel durch die helikale Assemblierung des Proteins SctF, sodass eine Nadelstruktur mit einem Innendurchmesser von ca. 2,5 nm entsteht (Loquet *et al.*, 2012). Die hohe Ähnlichkeit des T3S-Apparates und der kanalartigen Nadelstruktur zu einer makroskopischen Spritze, ließen Grund zur Annahme, dass T3S-Systeme Effektoren direkt in die Wirtszelle injizieren können. Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahmen aktiver T3S-Systeme von *Salmonella* und *Shigella* haben gezeigt, dass entfaltete Substrate, mit ihrem N-terminalen Proteinbereich voran, durch das Nadelfilament transportiert werden (Dohlich *et al.*, 2014, Radics *et al.*, 2014).

Für die erfolgreiche Translokation von Effektorproteinen über die Wirtszellmembran wird weiterhin ein porenbildender Proteinkomplex, das sogenannte Translokon, benötigt (Abbildung 1.1). Das Translokon inseriert vermutlich in die Plasmamembran und ermöglicht so den Transport von Proteinen in das Cytoplasma der Wirtszelle (Büttner *et al.*, 2002, Mattei *et al.*, 2011, Mueller *et al.*, 2008). In tierpathogenen Bakterien wird das Translokon aus drei Proteinen aufgebaut. Dabei handelt es sich um zwei hydrophobe, membranüberspannende Translokatoren, welche vermutlich die Pore in der Plasmamembran bilden, sowie einem hydrophilen Partner („tip“-Komplex), welcher die Nadel mit dem Translokon verbindet (Blocker *et al.*, 2008, Diepold und Wagner 2014). Die Translokonproteine bilden einen hetero-oligomeren Proteinkomplex, welcher aus 6 - 8 Untereinheiten besteht und einen Innendurchmesser von 1,2 - 3,5 nm aufweist (Blocker *et al.*, 1999, Ide *et al.*, 2001, Luo und Donnenberg 2011, Montagner *et al.*, 2011, Schoehn *et al.*, 2003, Veenendaal *et al.*, 2007). Über das Translokon in pflanzenpathogenen Bakterien ist hingegen wenig bekannt. Potentielle Translokator-Proteine wurden bislang für das Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* und *Rhizobium* spp. NGR234 beschrieben (Büttner *et al.*, 2002, Marie *et al.*, 2003, Meyer *et al.*, 2006, Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005, Rossier *et al.*, 2000). Ein „tip“-Komplex konnte in T3S-Systemen pflanzenpathogener Bakterien bislang nicht identifiziert werden.

### Der Basalapparat von Translokations-assoziierten T3S-Systemen

Der Basalapparat bildet sowohl in der inneren Membran (IM) als auch in der äußeren Membran (ÄM) Ringstrukturen, die einen Transportkanal mit einem Durchmesser von etwa 2 - 3 nm umgeben (Abbildung 1.1) (Büttner 2012). Die ÄM-Ringe werden durch das Sekretin-Protein SctC gebildet, das aus 12 - 15 Untereinheiten besteht (Bergeron *et al.*, 2013, Blocker *et al.*, 2001, Kubori *et al.*, 1998, Schraidt und Marlovits 2011, Spreter *et al.*, 2009). Die Oligomerisierung der Sekretine und die Bildung eines Kanals in der ÄM ist von kleinen Lipoproteinen, den sogenannten Pilotinen abhängig (Burghout *et al.*, 2004, Crago und Koronakis 1998, Schuch und Maurelli 2001). So lokalisiert beispielsweise das Sekretin InvG von *Salmonella* spp. in Abwesenheit des entsprechenden Pilotins in die IM (Burghout *et al.*, 2004). Pilotine konnten bisher nur in tierpathogenen Bakterien nachgewiesen werden.

SctD und SctJ bilden vermutlich die IM-Ringe in Translokations-assoziierten T3S-Systemen (Kimbrough und Miller 2000, Kubori *et al.*, 1998, Schraidt *et al.*, 2010). Kryo-Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen lassen vermuten, dass die IM-Ringe SctD und SctJ aus jeweils 24 Molekülen bestehen (Schraidt und Marlovits 2011). Zusätzlich verbindet SctD, mit Hilfe seiner periplasmatischen Domäne, die ÄM-Ringe (SctC) und den IM-Ring (SctJ) miteinander (Diepold *et al.*, 2010, Ross und Plano 2011, Sanowar *et al.*, 2010, Schraidt *et al.*, 2010).

Für die stabile Verankerung zwischen Nadel/Pilus und dem Translokations-assoziierten Basalapparat ist vermutlich eine Struktur zuständig, die als „inner rod“ (innerer Stab) bezeichnet wird und aus mehreren Kopien eines Proteins (SctI) aufgebaut ist (Abbildung 1.1) (Marlovits *et al.*, 2004). In fT3S-Systemen besteht der „inner rod“ dagegen aus den Proteinen FlgB, FlgC, FlgF und FlgG, welche einen proximalen und einen distalen „rod“ bilden (Homma *et al.*, 1990). Es wird davon ausgegangen, dass durch die „inner rod“-Struktur ein Kanal im Inneren des Basalapparates ausgebildet wird und somit ein Transportweg für T3S-Substrate entsteht (Marlovits *et al.*, 2006, Marlovits *et al.*, 2004, Wood *et al.*, 2008). „Inner rod“-Proteine sind weiterhin, zusammen mit dem Nadellängen-Regulator SctP, vermutlich an der Kontrolle der Nadellänge beteiligt. Eine *Salmonella*-Mutante ohne den Nadellängen-Regulator SctP bildet keinen „inner rod“-Komplex, jedoch verlängerte Nadeln aus (Lefebvre und Galán 2014, Marlovits *et al.*, 2006). Es wurde daher angenommen, dass die Sekretion von SctI („inner rod“-Protein) und SctF (Nadel-Protein) zeitgleich stattfindet und die Fertigstellung des „inner rod“ das Nadelwachstum SctP-abhängig beendet (Galán *et al.*, 2014). Eine Sekretion von „inner rod“-Proteinen in das extrazelluläre Milieu konnte sowohl in tier- als auch pflanzenpathogenen Bakterien gezeigt werden und dient vermutlich der Ausbildung eines funktionalem T3S-Systems (Lefebvre und Galán 2014, Lorenz *et al.*, 2008a, Rossier *et al.*, 2000, Sal-Man *et al.*, 2012, Wood *et al.*, 2008).

In der inneren Membran ist der Basalapparat mit einem Exportapparat verbunden, welcher wahrscheinlich einen Exportkanal über die innere Membran ausbildet und essentiell für die T3-abhängige Sekretion ist (Diepold und Wagner 2014). Der Exportapparat ist ein Proteinkomplex

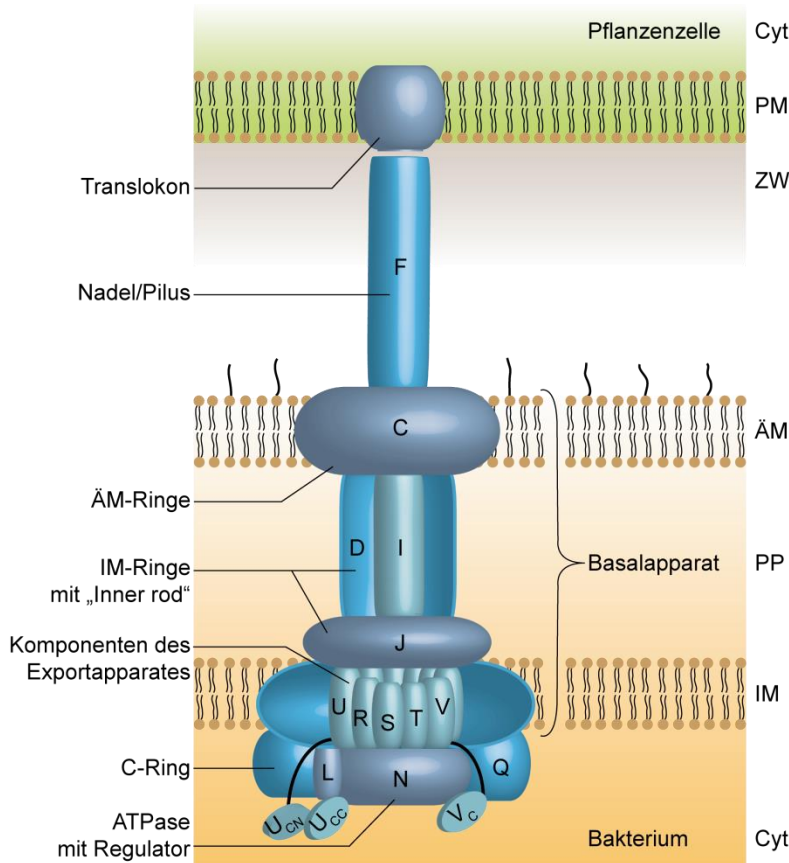


bestehend aus mindestens fünf Mitgliedern der SctR-, SctS-, SctT-, SctU- und SctV-Familie (Abbildung 1.1) (Diepold und Wagner 2014). Mitglieder der SctU- und SctV-Familie enthalten vier bzw. acht transmembrane Helices sowie eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, welche wahrscheinlich eine wichtige Bindestelle für T3S-Substrate darstellt (Allaoui *et al.*, 1994, Bange *et al.*, 2010, Berger *et al.*, 2010, Minamino *et al.*, 2012, Minamino und Macnab 2000, Minamino und MacNab 2000). Die C-terminale cytoplasmatische Domäne von SctU wird an einem konservierten NPTH-Motiv (Asparagin, Prolin, Threonin, Histidin), zwischen dem Asparagin und Prolin, vermutlich autokatalytisch gespalten (Allaoui *et al.*, 1994, Deane *et al.*, 2008, Lavander *et al.*, 2002, Minamino und Macnab 2000, Zarivach *et al.*, 2008). Durch die Spaltung in SctU kommt es zu einer veränderten Orientierung der PTH-Schleife, was möglicherweise eine Voraussetzung für die Interaktion mit T3S-Komponenten und/oder -Substraten darstellt (Deane *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009). Die Komponenten des Exportapparates interagieren mit dem vorhergesagten cytoplasmatischen C-Ring sowie dem ATPase-Komplex (Lee und Rietsch 2015). Die ATPase und der vorhergesagte C-Ring könnten somit vermutlich auch an der Substraterkennung beteiligt sein (Büttner 2012).

#### Die ATPase und der C-Ring von T3S-Systemen

Die ATPasen von flagellären und translokations-assoziierten T3S-Systemen weisen starke Sequenzhomologien zur  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase auf (Akeda und Galan 2004). SctN bildet die translokations-assoziierte T3S-ATPase (Abbildung 1.1), während FliI die ft3S-ATPase darstellt. Um ATP effizient hydrolysieren zu können, bilden wahrscheinlich SctN und FliI eine hexamere Struktur an der Cytoplasmaseite des Basalapparates aus (Notti und Stebbins 2016). Durch die Bereitstellung von Energie ermöglicht die ATPase die Entfaltung der Substrate und erlaubt so wahrscheinlich den Zugang und die Bindung von T3S-Substraten in den Sekretionskanal (Akeda und Galán 2005, Dohlich *et al.*, 2014, Radics *et al.*, 2014). Jedoch ist die ATPase vermutlich nicht der alleinige Energielieferant für das T3S-System. Sowohl für das ft3S-System (Minamino und Namba 2008, Paul *et al.*, 2008) als auch für das translokations-assoziierte T3S-System (Wilharm *et al.*, 2004) wird die „proton motiv force“ (protonenmotorische Kraft) als weitere Energiequelle für den T3-abhängigen Sekretionsprozess diskutiert.

Auf der cytoplasmatischen Seite von flagellären Basalapparaten konnte, mittels EM-Rekonstruktionen, eine Ringstruktur identifiziert werden, welche aus den Proteinen FliM, FliN und FliG besteht (Kawamoto *et al.*, 2013). Diese als C-Ring bezeichnete Struktur kommt vermutlich auch in translokations-assoziierten T3S-Systemen vor und wird durch die SctQ-Proteinfamilie repräsentiert (Abbildung 1.1) (Morita-Ishihara *et al.*, 2006). Biochemische und genetische Analysen haben gezeigt, dass SctQ eine Art Sortierungsplattform für T3S-Substrate bildet (Lara-Tejero *et al.*, 2011). SctQ-Proteine interagieren sowohl mit Komponenten des T3S-Apparates, aber auch mit Effektoren und stellen damit vermutlich eine generelle Bindestelle für T3S-Substrate dar (Lara-Tejero *et al.*, 2011, Lorenz *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Aufbaus von Translokations-assoziierten T3S-Systemen.** Der Basalapparat besteht aus zwei Ringstrukturen in der äußeren Membran (ÄM) und inneren Membran (IM). Die konservierten membrandurchspannenden Komponenten sind das Sekretin (SctC), die IM-Komponenten SctD und SctJ sowie der Exportapparat, welcher aus mindestens fünf Komponenten besteht (SctU, R, S, T, V). Die Ringstrukturen umgeben wahrscheinlich den putativen „inner rod“-Komplex (SctI). Der IM-Ring SctD und der Exportapparat sind in der Abbildung im Querschnitt dargestellt. Der IM-Ring und der Exportapparat sind mit dem putativen C-Ring (SctQ) und der ATPase (SctN) assoziiert. Weitere cytoplasmatische Komponenten sind der vorhergesagte Regulator (SctL) der ATPase und die cytoplasmatischen Domänen von SctU (SctU<sub>c</sub>) sowie SctV (SctV<sub>c</sub>), die vermutlich eine Bindestelle für T3S-Substrate darstellen. SctU<sub>c</sub> wird am konservierten NPTH-Motiv gespalten, was in den Spaltprodukten SctU<sub>cn</sub> und SctU<sub>cc</sub> resultiert. Extrazelluläre Strukturen des T3S-Systems sind die Nadel (tierpathogene Bakterien) bzw. der Pilus (pflanzenpathogene Bakterien) und werden durch die Komponente SctF gebildet. Die Länge der Nadel bzw. des Pilus variiert und dient als Transportkanal für sekretierte Proteine. Die Translokation von Effektorproteinen wird durch ein kanalbildendes Translokon, welches in die Wirtszellmembran inseriert ermöglicht. Die einzelnen Buchstaben stehen für die konservierten Komponenten des T3S-Systems und beziehen sich auf die Sct-Nomenklatur („secretion and cellular translocation“). Cyt: Cytoplasma; PM: Plasmamembran; ZW: Zellwand; ÄM: äußere Membran; PP: Periplasma; IM: innere Membran.

## 1.2.2 Die Rekrutierung von T3S-Substraten

Proteine, die über das T3S-System transportiert werden, können je nach ihrem Bestimmungsort in drei Gruppen eingeteilt werden: 1) Komponenten des T3S-Systems und 2) T3S-Substrate, die in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden (Nicht-Effektorproteine) sowie 3) T3S-Substrate, die direkt in die Wirtszelle transloziert werden (Effektorproteine). Die primäre Rolle von Effektoren besteht in der Supprimierung der tierischen oder pflanzlichen Basalabwehr, um so die bakterielle Vermehrung zu ermöglichen (Cui und Shao 2011, Dean 2011, Macho 2016). Doch wie werden die entsprechenden T3S-Substrate vom T3S-System erkannt und ausgewählt?

### T3S-Signale

Eine zentrale Rolle für die Sekretion von Proteinen spielen sogenannte T3S-Signale, welche sich in den N-terminalen 20 - 30 Aminosäuren eines T3S-Substrats befinden und auf Aminosäureebene nicht konserviert sind (Büttner 2012). Trotz des variablen N-terminalen Proteinbereichs, konnten durch *in silico*-Analysen Gemeinsamkeiten in der Aminosäurekomposition von T3S-Signalen festgestellt werden. In den N-terminalen 30 Aminosäuren von T3-Effektoren konnte ein erhöhter Gehalt an Serin und ein geringerer Cystein- und Tryptophangehalt festgestellt werden (Arnold *et al.*, 2009, Dong *et al.*, 2013, Guttman *et al.*, 2002, Löwer und Schneider 2009, Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002, Samudrala *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde ein Effektorprotein mit einem synthetischen amphipathischen Sekretionssignal bestehend aus einer abwechselnden Abfolge der Aminosäuren Serin und Isoleucin effizient sekretiert (Lloyd *et al.*, 2001). Durch Kristallstrukturanalysen von Effektorproteinen aus tierpathogenen Bakterien (Guttman *et al.*, 2013, Lilic *et al.*, 2006) sowie Sequenzvergleichen zwischen T3S-Signalen (Wang *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2011) konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Proteinregion mit dem T3S-Signal unstrukturiert ist. Es wird spekuliert, dass das unstrukturierte T3S-Signal möglicherweise als Erkennungsmerkmal für Komponenten des T3S-Systems dient (Buchko *et al.*, 2010).

### Alternative T3S-Signale

Nicht nur der N-terminale Bereich eines Proteins kann für die Sekretion wichtig sein. Dies konnte für den Aminosäurebereich 519 - 524 im C-terminalen Bereich des Effektorproteins Tir („translocated intimin receptor“) aus enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gezeigt werden (Allen-Vercoe *et al.*, 2005). Für das Effektorprotein EspB („*E. coli* secreted protein“) aus EHEC wurde hingegen gezeigt, dass neben dem N-terminalen Bereich auch zentrale Proteinregionen notwendig sind für eine effiziente Sekretion des Proteins (Chiu *et al.*, 2003).

In einigen Fällen von T3-Effektoren aus *Yersinia* spp. und FliC, der Hauptkomponente des Flagellums von *E. coli*, konnten auch Exportsignale im 5'-Bereich der mRNA identifiziert werden (Anderson und Schneewind 1997, Majander *et al.*, 2005, Niemann *et al.*, 2013). mRNA-basierende T3S-Signale und die damit einhergehende kotranslationale Translokation, können jedoch nicht die sehr schnelle Translokation von T3-Effektorproteinen erklären, wie es für die Effektoren IpaB und IpaC aus *Shigella flexneri* (Export 240 Sekunden nach Wirtszellkontakt) oder SipA aus *Salmonella Typhimurium* (Export 10 Sekunden nach Wirtszellkontakt) gezeigt werden konnte, sodass eine Kombination von Exportsignalen im N-terminalen Bereich des Proteins und in der mRNA vermutet wird (Enninga *et al.*, 2005, Karlinsey *et al.*, 2000, Schlumberger *et al.*, 2005, Singer *et al.*, 2014).

### Translokationssignale und T3S-Chaperone – Helfer für eine erfolgreiche Translokation

Obwohl das N-terminale T3S-Signal hinreichend für eine *in vitro*-Sekretion ist, wurden Fusionsproteine mit den N-terminalen 20 Aminosäuren eines *Yersinia*-Effektors nicht effizient transloziert (Sory *et al.*, 1995). Neben dem T3S-Signal ist in den N-terminalen 50 - 100 Aminosäuren von Effektorproteinen ein Translokationssignal lokalisiert, welches zugleich häufig eine Chaperon-Bindestelle (CBD) darstellt (Büttner 2012). Durch das T3S- und Translokationssignal wird zusammen mit einem T3S-Chaperon die Translokation eines Effektorproteins ermöglicht (Cheng und Schneewind 1999, Sory *et al.*, 1995, Wattiau *et al.*, 1994). In vielen pathogenen Bakterien wird die Übertragung von Effektorproteinen post-translational über spezifische „Helfer“-Proteine reguliert (Feldman und Cornelis 2003, Lonjon *et al.*, 2016, Parsot 2003). Bei T3S-Chaperonen handelt es sich in der Regel um kleine (15 - 20 kDa) saure cytoplasmatische Proteine, welche durch ihre vorübergehende Bindung an zu sekretierende T3S-Substrate eine cytoplasmatische Proteolyse sowie eine vorzeitige Aggregation von T3-Effektoren verhindern und/oder das T3S-Substrat in einem sekretionskompetenten Zustand erhalten (Lara-Tejero *et al.*, 2011, Lohou *et al.*, 2013). Wie genau der T3S-Apparat die verschiedenen Effektoren bzw. Effektor-Chaperon-Komplexe im bakteriellen Cytoplasma erkennen kann ist unklar. Die Translokation der meisten T3-Effektoren erfolgt durch eine Bindung zu einem Chaperon-Dimer, wodurch es zu einer erweiterten Proteinkonformation kommt (Ghosh 2004, Rodgers *et al.*, 2008). Die Konformationsänderung führt vermutlich zu einem dreidimensionalen Erkennungssignal, wodurch der Komplex von einer T3S-System-Komponente erkannt und ihr zugeführt werden könnte. Ein solches Szenario wird beispielsweise für den Effektor-Chaperon-Komplex YopE-SycE aus *Yersinia* vermutet (Birtalan *et al.*, 2002, Rodgers *et al.*, 2008). Dies untermauert die Hypothese von Buchko *et al.* (siehe oben) und deutet insgesamt darauf hin, dass die strukturelle Flexibilität des T3S- und Translokationssignals die Erkennung von T3-Effektoren durch Komponenten des T3S-Systems, wie zum Beispiel der ATPase oder der cytoplasmatischen Domänen von SctU und SctV, erleichtern könnte. Roblin *et al.* konnten erstmals zeigen, dass ein Effektor-Chaperon-Komplex, bestehend aus dem *Salmonella*-Effektor SopB und dem dazugehörigen Chaperon SigE, eine hexamere Ring-ähnliche Struktur bildet, die aufgrund von Analogien zur T3S-ATPase zu einer Bindung an die ATPase InvC führen könnte (Roblin *et al.*, 2015). Es wurde zudem postuliert, dass eine hohe Konzentration des SopB/SigE-Komplexes die Hexamerbildung fördert und dadurch die Translokationsrate beschleunigt werden könnte (Roblin *et al.*, 2015, Tsai *et al.*, 2015). Es ist jedoch unklar, wie die ATPase mit dem Effektor-Chaperon-Komplex interagieren könnte und ob Bildung einer hexameren Struktur eines Effektor-Chaperon-Komplexes generell üblich ist.

Da T3S-Signale untereinander und sogar zwischen Substraten von translokations-assoziierten T3-Systemen und fT3S-Systemen austauschbar sind, wird von einem konservierten Substrat-Erkennungsmechanismus ausgegangen (Büttner 2012, Notti und Stebbins 2016). Möglicherweise dient das Translokationssignal bzw. die CBD des Proteins zusammen mit dem T3S-Chaperon der Erkennung durch das entsprechende T3S-System.

Basierend auf den zugehörigen T3S-Substraten werden T3S-Chaperone in drei Klassen unterteilt. Chaperone der Klasse 1 binden entweder ein (Klasse 1A) oder mehrere (Klasse 1B) T3-Effektoren (Cornelis und Van Gijsegem 2000, Parsot 2003). Klasse 2-Chaperone binden dagegen speziell an Translokatoren, während Klasse 3-Chaperone fT3S-System-Chaperone darstellen und bisher nur in tierpathogenen Bakterien beschrieben wurden (Büttner 2012).

### 1.3 Typ-IV-Sekretionssysteme - „Multitasking-fähige“ Nanomaschinen in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien

Basierend auf strukturellen Charaktereigenschaften wurden Typ-IV-Sekretions (T4S)-Systeme in Typ-IVA-Sekretions (T4AS)-Systeme, angelehnt an das VirB/D4-T4S-System von *Agrobacterium tumefaciens* und in Typ-IVB-Sekretions (T4BS)-Systeme, welche durch das Dot/Icm („defect in organelle trafficking/intracellular multiplication“)-T4S-System von *Legionella pneumophila* repräsentiert werden, eingeteilt (Bhatty *et al.*, 2013, Christie *et al.*, 2005). Eine dritte Gruppe von T4S-Systemen sind sogenannte minimale („minimized“) T4S-Systeme, die oftmals in Gram-positiven Bakterien der Gattung *Streptococcus*, aber auch in einigen Gram-negativen Bakterien vorzufinden sind (Bhatty *et al.*, 2013). Diese als T4CS-Systeme klassifizierte Gruppe besteht in der Regel aus nur 5 - 6 Untereinheiten, welche verwandt zu Komponenten des T4AS-Systems sind (Bhatty *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2012). T4S-Systeme, welche weder Ähnlichkeiten zum T4AS-, T4BS- noch zum T4CS-System aufweisen, werden als „andere“ T4S-Systeme bezeichnet und bekommen in der Regel einen Namen basierend auf dem Aufbau ihrer Untereinheiten (Bhatty *et al.*, 2013, Christie *et al.*, 2005). Ein Beispiel dafür ist das Cag-T4S-System von *Helicobacter pylori* oder das Ptl-T4S-System von *Bordetella pertussis* (Backert und Selbach 2008, Christie *et al.*, 2005).

T4S-Systeme sind essentiell für die Pathogenität von einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie einiger Archaea (Chandran Darbari und Waksman 2015, Zechner *et al.*, 2012). Das T4S-System transloziert verschiedenste Moleküle wie DNA, Nukleoprotein-Komplexe und/oder Effektorproteine in Bakterien- oder eukaryotische Zellen. T4-Effektorproteine können verschiedenste molekulare und zelluläre Wirtszellprozesse (wie beispielsweise die Immunabwehr des Wirtes, das endoplasmatische Retikulum oder das Cytoskelett) zum Vorteil des Bakteriums beeinflussen und somit das bakterielle Wachstum fördern (Bhavsar *et al.*, 2007, Ensminger 2016).

T4AS-Systeme werden in verschiedenen Bakterien der Spezies *Brucella*, *Bartonella* und *Agrobacterium* untersucht, während T4BS-Systeme bisher ausschließlich in tierischen intrazellulären Pathogenen, wie *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* und *Rickettsiella grylli* nachgewiesen werden konnten (Chandran Darbari und Waksman 2015, Zechner *et al.*, 2012). Bislang ist das T4AS-System von *A. tumefaciens* das einzig bekannte virulenz-assoziierte T4S-System von pflanzenpathogenen Bakterien (Chang *et al.*, 2014).

Orthologe T4AS-Systeme konnten in einigen *Xanthomonas* spp., wie *X. campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002, Qian *et al.*, 2005, Vorholter *et al.*, 2008), *X. albilineans* (Pieretti *et al.*, 2009), *X. campestris* pv. *vasculorum* (Studholme *et al.*, 2010), *X. campestris* pv. *musacearum* (Studholme *et al.*, 2010), *Stenotrophomonas maltophilia* (Crossman *et al.*, 2008, Rocco *et al.*, 2009), *X. arboricola* (Garita-Cambronero *et al.*, 2016) und *X. axonopodis* pv. *citri* (Alegria *et al.*, 2005, Brunings und Gabriel 2003) identifiziert werden. Die Rolle der meisten dieser T4AS-Systeme von pflanzenpathogenen Bakterien wurde bisher jedoch nicht aufgeklärt. Eine Ausnahme bildet *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), für welches kürzlich gezeigt werden konnte, dass es T4-abhängig andere Bakterienzellen abtötet (Souza *et al.*, 2015).

### 1.3.1 Die Architektur von T4S-Systemen

#### 1.3.1.1 Der Aufbau des T4AS-Systems von *Agrobacterium*

Eines der am besten studierten T4AS-Systeme in Gram-negativen Bakterien ist das VirB/VirD4-System von *A. tumefaciens*. Unter Verwendung des VirB/VirD4-T4S-Systems transloziert *A. tumefaciens* ein Nukleoproteinkomplex, der ein Tumor-induzierendes (Ti)-Plasmid enthält, in die Pflanzenzelle. Das Ti-Plasmid wird anschließend mit Hilfe von Effektorproteinen in die eukaryotische Wirtszell-DNA integriert (Christie *et al.*, 2005). Das T4AS-System besteht aus den Proteinen VirB1 - VirB11 sowie VirD4. Die *vir*-Gene *virB1* - *virB11* sowie *virD4* sind in der Regel in zwei Operons zusammengefasst (Beijersbergen *et al.*, 1992, Christie *et al.*, 2014). Das aus 12 Komponenten bestehende T4AS-System kann in drei Subkomplexe eingeteilt werden: 1) Die cytoplasmatischen ATPasen mit dem Kopplungsprotein. 2) Der Kernkomplex, welcher aus einem inneren Membrankomplex (IMC) und einem äußeren Membrankomplex (OMC) besteht, sowie 3) dem Pilus, welcher die extrazelluläre Struktur des T4AS-Systems bildet und mit der potentiellen Wirtszelle interagiert.

#### ATPasen und der Kopplungsproteinkomplex – die Kraftwerke des T4AS-Systems

In T4AS-Systemen liefert ein cytoplasmatisches ATPasen-Trio die Energie für den Sekretionsprozess (Abbildung 1.2) (Atmakuri *et al.*, 2004). Zu diesem ATPasen-Trio zählt das sogenannte Kopplungsprotein VirD4, welches zwei Funktionen ausübt. Zum einen bindet es Substrate (DNA und/oder Protein) und befördert diese zum ATPasen-Komplex und zum anderen hat es selbst eine ATP-hydrolysierende Funktion (Chandran 2013, Zechner *et al.*, 2012). Die Aktivität der ATPase hängt dabei wahrscheinlich von der Bindung eines Substrates ab. So konnte für das Homologe VirD4-Protein aus *E. coli* (Plasmid R388) in Anwesenheit von Einzelsträngiger DNA eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Moncalian *et al.*, 1999, Tato *et al.*, 2005). Das Kopplungsprotein VirD4 überträgt im Anschluss das Substrat an die ATPase VirB11.

VirB11 gehört zur Familie der AAA<sup>+</sup>-Hexamer-ATPasen, welche auch in T2S- und T3S-Systemen für die Energiebereitstellung des Substrattransports verantwortlich sind (Planet *et al.*, 2001). Kristallisierte VirB11-Homologe aus *H. pylori* (HP0525) und *B. suis* haben gezeigt, dass VirB11 eine Doppel-Ring-bildendes hexameres Protein ist (Hare *et al.*, 2006, Savvides *et al.*, 2003, Yeo *et al.*, 2000). Für die Übertragung des Substrats zu den inneren Membrankomponenten des Sekretionskanals (VirB6 und VirB8) spielt die ATPase VirB4 eine essentielle Rolle (Cascales und Christie 2004). VirB4 ist ubiquitär in allen bekannten T4AS-ähnlichen Systemen vertreten und bildet die Grundlage für ein funktionales T4S-System, da es sowohl für den Sekretionsprozess selbst als auch für die Pilusbildung essentiell ist (Shirasu *et al.*, 1994, Zechner *et al.*, 2012). Ko-Immunopräzipitations-Experimente offenbarten, dass VirD4 sowohl mit VirB11 als auch VirB4 interagiert (Atmakuri *et al.*, 2004). Die ATP-hydrolysierende Aktivität des ATPasen-Trios (VirD4, VirB4 und VirB11) wird durch VirB11 selbst koordiniert, wodurch die Weiterleitung von Substraten zum Sekretionskanal und damit über innere Membran des Bakteriums gewährleistet wird (Zechner *et al.*, 2012).

### Kernkomplex

Die Komponenten des Kernkomplexes (VirB6 - VirB10) bilden zusammen einen Sekretionskanal, welcher beide bakterielle Membranen durchspannt (Abbildung 1.2) (Chandran 2013, Christie *et al.*, 2005). Der IMC ermöglicht den Transport des Substrats über die innere Membran und besteht aus den integralen Membranprotein VirB6 sowie den bitopischen Membranproteinen VirB8 und VirB10 (Beijersbergen *et al.*, 1994). Das Lipoprotein VirB7 sowie das äußere Membran-assoziierte Protein VirB9 und das membrandurchspannende Protein VirB10 interagieren spontan zum OMC, der für die Übertragung des Substrats über das Periplasma und die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien erforderlich ist (Christie *et al.*, 2014, Fronzes *et al.*, 2009). Durch die transmembranen Regionen inseriert VirB10 sowohl in die innere als auch äußere bakterielle Membran, während das Pilotin VirB7 für die Lokalisierung des OMC in die äußere Membran verantwortlich ist (Chandran *et al.*, 2009, Fronzes *et al.*, 2009). Transfer-DNA Immunopräzipitations (TrIP)-Analysen haben gezeigt, dass das zu translozierende Substrat in engem Kontakt zu den inneren Membranproteinen VirB6 und VirB8 steht, wodurch geschlossen wurde, dass VirB6 und VirB8 möglicherweise eine Pore bilden, während die restlichen Proteine wahrscheinlich strukturell unterstützend auf den Komplex wirken (Cascales und Christie 2004).

### Der Pilus des T4AS-Systems

Der T4-Pilus wird aus den Pilin-Komponenten VirB2 und VirB5 gebildet (Abbildung 1.2) (Lai und Kado 1998, Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Eine direkte Verbindung zwischen Pilus und Sekretionskanal konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Jedoch wird davon ausgegangen, dass der Pilus als Verbindungskanal für Substrate über die äußere Membran dient (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999, Waksman und Orlova 2014). Unklar ist auch wie genau die Pilus-Assemblierung erfolgt und ob die Polymerisierung des Pilus in der inneren oder äußeren Membran beginnt. Dagegen ist bekannt, dass VirB5 wichtig für die Polymerisierung der Pilushauptkomponente VirB2 ist (Lai *et al.*, 2002, Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). Außerdem gilt VirB5 als das Adhesin des T4-Pilus und koordiniert die Wirt-Pathogen-Interaktion (Aly und Baron 2007). Anhand der Pilus-Morphologie unterscheidet man zwischen langen, flexiblen F-Typ-Pili (2 - 20  $\mu\text{m}$ ) und kurzen, starren P-Typ-Pili ( $< 1 \mu\text{m}$ ) (Lawley *et al.*, 2003). F-Typ-Pili sind vermutlich primär für die bakterielle Konjugation notwendig, wohingegen für den Transport von Proteinen und Nukleoproteinen in eine Wirtszelle der P-Typ-Pilus verwendet wird (Chandran Darbari und Waksman 2015, Lawley *et al.*, 2003). Die geringe Porengröße des Pilus von etwa 3 nm erlaubt den Transport von einzelsträngiger DNA sowie zum größten Teil entfaltetem Proteinen (Chandran Darbari und Waksman 2015). Der genaue Mechanismus, wie das T4AS-System Proteine oder Nukleoproteine über die Wirtszellmembran transloziert, ist noch nicht bekannt. Es wird spekuliert, dass die Translokation von DNA und/oder Effektorproteinen in die eukaryotische Wirtszelle vermutlich durch ein Translokon ermöglicht wird (Dumas *et al.*, 2001).

### Die innere Membrankomponente VirB3 und die lytische Transglycosylase VirB1

VirB3 lokalisiert in der inneren Bakterienmembran und könnte zusammen mit VirB6 und VirB8 für die Verankerung der ATPase VirB4 an die innere Membran verantwortlich sein, wodurch zudem vermutlich eine Verbindung zum Kernkomplex geschaffen wird (Abbildung 1.2) (Waksman und Orlova 2014). Durch die Homologie zum Pilin-Protein VirB2, könnte VirB3 auch an der Pilus-Assemblierung beteiligt sein (Hapfelmeier *et al.*, 2000, Shirasu und Kado 1993).

VirB1 gehört zur Familie der lytischen Transglycosylasen, welche häufig mit makromolekularen Transportsystemen von pathogenen Bakterien assoziiert sind (Koraimann 2003, Zahrl *et al.*, 2005). Die Muramidase-Aktivität von lytischen Transglycosylasen hilft, das im Periplasma befindliche dichte Peptidoglykangeflecht zu spalten und ermöglicht dadurch die Insertion von membrandurchspannenden Komponenten. Peptidoglycan besteht aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin, wobei VirB1 die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung der beiden Zuckerderivatmoleküle spaltet.



### Konformationsstadien des T4AS-Systems

Da die Sekretion von Substraten und die Pilus-Biogenese wahrscheinlich voneinander entgekoppelt werden kann (Jakubowski *et al.*, 2005, Jakubowski *et al.*, 2009, Jakubowski *et al.*, 2004, Kerr und Christie 2010), wurde spekuliert das es zwei Konformationsstadien des T4AS-Systems gibt (Chandran Darbari und Waksman 2015). Ein Stadium ist dabei auf die Pilus-Biogenese und ein weiteres Stadium auf die DNA- und/oder Proteinsekretion abgestimmt. Da der Pilus wahrscheinlich die Grundvoraussetzung für den DNA-Transfer ist (Babic *et al.*, 2008), kann vermutet werden, dass im ersten Stadium Pilusproteine sekretiert werden, sodass der Pilus assembliert wird und anschließend eine Konformationsänderung zur Sekretion und/oder Translokation von Effektorproteinen und Nukleoproteinen führt. Unklar ist, ob für die Pilus-Biogenese und die Sekretion von Proteinen und Nukleoproteinen zwei verschiedene Komplexe oder ein einzelner Komplex, welcher zwischen zwei verschiedenen Konformationen wechselt, benötigt wird.

### **1.3.1.2 Der Aufbau des T4BS-Systems von *Legionella***

Ein gut untersuchtes T4BS-System in Gram-negativen Bakterien ist das Dot/Icm-System von *L. pneumophila*, das daher im Folgenden als Ausgangspunkt zur Beschreibung des Aufbaus dient. Der Locus *dot/icm* kodiert das T4BS-System von *L. pneumophila*, welches aus ca. 27 Komponenten besteht und essentiell für die Vermehrung des Pathogens in der eukaryotischen Wirtszelle ist (Isberg *et al.*, 2009). Eine Vielzahl der Dot/Icm-Protein kann in zwei Proteinsubkomplexe aufgeteilt werden: 1) Ein T4-Kopplungsproteinkomplex und 2) einen Kernkomplex, der beide bakteriellen Membranen durchspannt und gleichzeitig einen Kanal für den Substrattransport schafft (Abbildung 1.1) (Kubori und Nagai 2016, Vincent *et al.*, 2006). Für 10 T4BS-System-Komponenten, welche vermutlich in der inneren Membran oder im Periplasma lokalisiert sind, ist noch keine genaue Funktion bekannt (Isberg *et al.*, 2009). Drei der ca. 27 Komponenten des Dot/Icm-T4S-Systems weisen Ähnlichkeiten zu Komponenten des VirB/VirD4-T4S-Systems auf. Dabei handelt es sich um die ATPase DotB (Homolog zu VirB11), die innere Membrankomponente IcmE (Homolog zu VirB10) und das vorhergesagte Kopplungsprotein IcmO (Homolog zu VirD4). Eine Extrazelluläre Struktur wurde für T4BS-Systeme bisher nicht beschrieben.

### Der Kopplungsproteinkomplex und die putativen ATPasen des T4BS-Systems

Der Kopplungsproteinkomplex wird durch die Proteine IcmJ, IcmO und IcmP gebildet (Abbildung 1.2). Subzelluläre Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass sich IcmO und IcmP in der inneren Membran befinden, während IcmJ sowohl in der inneren Membran als auch im Cytoplasma lokalisiert ist (Vincent *et al.*, 2006). Durch seine entfernte Ähnlichkeit zu VirD4, repräsentiert IcmO wahrscheinlich eine Art Substratrezeptor und übt damit möglicherweise eine ähnliche Funktion aus wie das Kopplungsprotein im T4AS-System (Buscher *et al.*, 2005).

Zudem weist IcmO in seinem C-terminalen Bereich eine CBD auf, welche für eine effiziente Sekretion von T4BS-Substraten wichtig ist (Sutherland *et al.*, 2012).

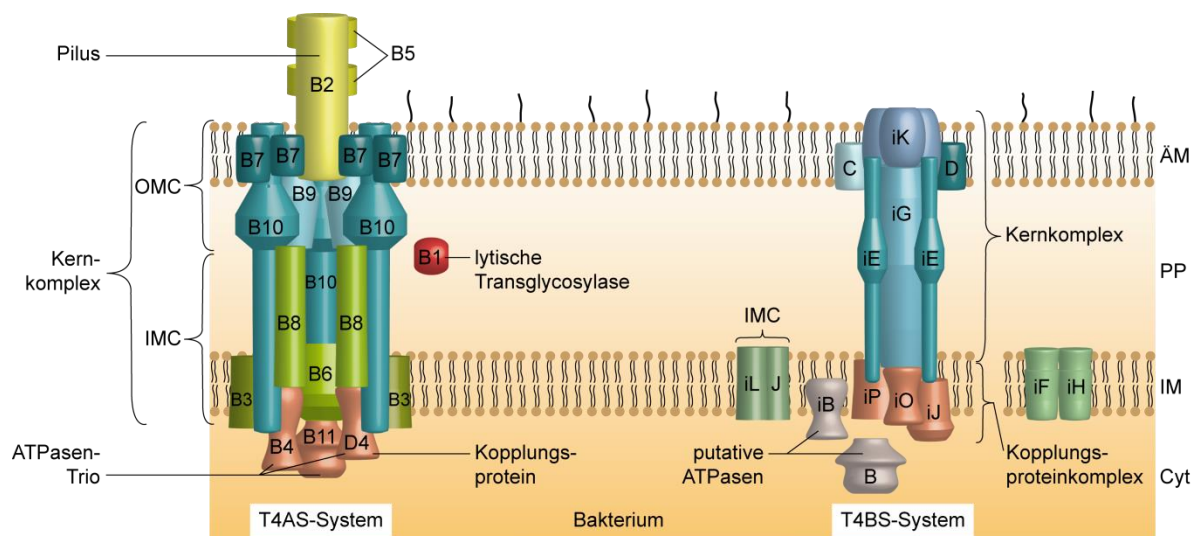
DotB ist eine cytoplasmatische Komponente, welche homolog zu VirB11 und phylogenetisch verwandt zu ATPasen des T2S-Systems ist (Planet *et al.*, 2001). Es wird daher vermutet, dass DotB eine ATPase des T4BS-Systems darstellt. IcmB weist entfernte Ähnlichkeiten zu VirB4 auf und besitzt ebenfalls Walker A und Walker B NTP-bindende Regionen (Purcell und Shuman 1998). Walker A- und Walker B-Motive sind entscheidend für die Bindung und Hydrolyse von ATP und kommen in einer Vielzahl von ATP-bindenden Proteinen vor. Eine ATPase-Funktion für IcmB wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

### Der putative Kernkomplex

Eine subzelluläre Lokalisationsstudie von Dot/Icm-Proteinen des T4BS-Systems lässt einen putativen Kernkomplex vermuten, der beide bakterielle Membranen durchspannt und vermutlich einen Sekretionskanal bildet (Vincent *et al.*, 2006). Der Kernkomplex besteht aus den fünf Proteinen DotC, DotD, IcmE, IcmG und IcmK (Abbildung 1.2) (Vincent *et al.*, 2006). Während IcmE und IcmG sowohl in der inneren als auch äußeren bakteriellen Membran vorzufinden sind, lokalisieren IcmK und die Lipoproteine DotC und DotD ausschließlich in der äußeren Membran des Bakteriums (Kubori und Nagai 2016). Kristallstrukturanalysen von DotD offenbarten einen unstrukturierten N-terminalen, gefolgt von einem höher strukturierten Proteinbereich (Nakano *et al.*, 2010). Der strukturierte Proteinbereich von DotD weist dabei strukturelle Ähnlichkeiten zum Sekretin aus T3S-Systemen auf (Nakano *et al.*, 2010). Strukturanalysen von VirB7 aus *Xanthomonas citri* pv. *citri* haben die gleiche Domänenanordnung wie in DotD gezeigt (Souza *et al.*, 2011), sodass geschlussfolgert wurde, dass der N-terminale Bereich von DotD der funktionelle Gegenpart von VirB7 ist (Kubori und Nagai 2016). IcmE weist Homologien zu VirB10 auf, wodurch vermutet wird, dass IcmE Energie von der inneren Membran zur vorhergesagten porenbildenden Komponente IcmK in der äußeren Membran überträgt (Vincent *et al.*, 2006). Die Lokalisierung von IcmK in die äußere Membran ist DotCD-abhängig, da in Abwesenheit von DotC oder DotD, IcmK im Periplasma verbleibt (Kubori und Nagai 2016).

Kürzlich konnte, neben dem Kernkomplex, ein weiterer stabiler Komplex in der inneren Membran von *L. pneumophila* identifiziert werden. Dieser IMC besteht aus IcmL, einem Strukturhomolog von VirB8, sowie DotJ und wird unabhängig von anderen Dot/Icm-Proteinen gebildet (Abbildung 1.2) (Kuroda *et al.*, 2015). Es wird spekuliert, dass der IcmL/DotJ-Komplex mit der putativen ATPase IcmB assoziieren könnte (Kubori und Nagai 2016).

Die inneren Membranproteine IcmF und IcmH sind wahrscheinlich nicht Teil des Kernkomplexes, dienen jedoch vermutlich der Stabilität des Sekretionsapparates (Abbildung 1.2) (Sexton *et al.*, 2004, VanRheenen *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Aufbaus von T4AS- und T4BS-Systemen.** Das **T4AS-System** besteht aus drei Subkomplexen: 1) Einem ATPasen-Trio mit Kopplungsprotein (hellrot), das wahrscheinlich als Substratrezeptor dient, 2) dem Kernkomplex, welcher aus einem inneren Membrankomplex (IMC) (grün) und einem äußeren Membrankomplex (OMC) (blau) besteht, sowie 3) dem Pilus (gelb), der die extrazelluläre Struktur des T4AS-Systems bildet. Im Periplasma befindet sich die lytische Transglycosylase (rot). Gemeinsam bilden die Subkomplexe einen Sekretionskanal für T4AS-Substrate aus. Die Proteine, aus denen die einzelnen Subkomplexe bestehen, sind im Text näher erläutert. Die dargestellten Buchstaben und Zahlen entsprechen den Vir-Proteinen VirB1 - VirB11 sowie VirD4. Das **T4BS-System**, für welches bisher keine Beteiligung am pflanzlichen Infektionsprozess gezeigt werden konnte, besteht aus zwei Subkomplexen. 1) Der Kernkomplex (blau), welcher beide bakterielle Membranen durchspannt und wahrscheinlich einen Sekretionskanal bildet und zum anderen 2) der Kopplungsproteinkomplex (hellrot), welcher in der inneren Bakterienmembran lokalisiert ist und vermutlich die Substratrekrutierung unterstützt. Die Proteine aus denen die beiden Subkomplexe bestehen sowie Proteine, die nicht mit dem Sekretionsapparat assoziiert sind (dunkelgrün und grau) wurden im Text näher erläutert. Dot/lcm-Proteine mit unbekannter bzw. putativer Lokalisierung sind nicht dargestellt. Einzelne Buchstaben entsprechen den Dot-Proteinen, während lcm-Proteine vor dem jeweiligen Buchstaben mit einem „i“ gekennzeichnet sind. Der Mechanismus, durch den das T4AS- und T4BS-System Substrate über die Wirtszellmembran transloziert ist nicht bekannt. Cyt: Cytoplasma; ÄM: äußere Membran; PP: Periplasma; IM: innere Membran.

### 1.3.2 Erkennung und Unterscheidung von Substraten des T4S-Systems

Ein entscheidender Prozess, während der Interaktion eines pathogenen Bakteriums mit der korrespondierenden Wirtszelle ist die Translokation von Effektorproteinen, über das T3S- oder T4S-System. Das pflanzenpathogene Bakterium *P. syringae* verfügt über ca. 190 T3-Effektoren, während das humanpathogene Bakterium *L. pneumophila* sogar über 330 T4-Effektoren verfügt (Ensminger 2016, Stavrinides *et al.*, 2006). Neben den Effektorproteinen besitzt das Bakterium eine Vielzahl weiterer Proteine, die beispielsweise für den Aufbau der Sekretionssysteme notwendig sind (siehe Kapitel 1.3.1). Daraus ergibt sich die Frage, wie aus solch einem riesigen Proteinpool in einer Bakterienzelle, die zu sekretierenden und/oder translozierenden Proteine herausgefiltert werden können und dabei einem spezifischen Sekretionssystem zugeführt werden.

#### Das Translokationssignal in Substraten des T4S-Systems

Für eine erfolgreiche Translokation über T4S-Systeme benötigen T4S-Substrate ein Translokationssignal, welches sich häufig im C-terminalen Bereich des Proteins befindet und vermutlich unstrukturiert ist (Christie *et al.*, 2014, Kubori und Nagai 2016, Nagai *et al.*, 2005, Vergunst *et al.*, 2005). Im Fall des T4AS-Substrats VirF sind bereits die C-terminalen 19

Aminosäuren hinreichend für eine Translokation über das T4AS-System von *A. tumefaciens* (Vergunst *et al.*, 2005). RaIF („Recruitment of Arf1 to *Legionella* phagosome“), das erste identifizierte T4BS-Substrat, besitzt ein funktionales Translokationssignal in den C-terminalen 20 Aminosäuren (Nagai *et al.*, 2005). In vergangenen Studien wurde versucht das T4-Translokationssignal zu charakterisieren, jedoch konnte keine generelle Konsensussequenz von den bekannten Translokationssignalen abgeleitet werden (Burstein *et al.*, 2009, Lifshitz *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2011). Allerdings wurden, wie im Fall von T3S-Signalen, Gemeinsamkeiten in der Aminosäurekomposition festgestellt. Am häufigsten wurden in Translokationssignalen von T4AS- und T4BS-Substraten Glutaminsäure und Serin vorgefunden, während Tryptophan und Cystein selten oder gar nicht vertreten waren (Wang *et al.*, 2014). Betrachtet man die Translokationssignale von T4AS- und T4BS-Substraten getrennt, können jedoch auch Unterschiede in der Aminosäurekomposition festgestellt werden. So weisen Translokationssignale von T4AS-Substraten vermehrt positiv geladene Arginin-reiche Regionen in den C-terminalen 30 Aminosäuren auf (Vergunst *et al.*, 2005). In den C-terminalen 20 Aminosäuren von T4BS-Substraten sind dagegen verstärkt hydrophobe Aminosäuren (Prolin, Phenylalanin) (Nagai *et al.*, 2005), sowie kleine, polare, positiv geladene Aminosäuren (Alanin, Serin, Threonin) bzw. Glutaminsäure vorhanden (Kubori *et al.*, 2008). Die genauen molekularen Mechanismen, die der Erkennung von C-terminalen Translokationssignalen unterliegen müssen noch aufgeklärt werden.

Einige T4-Effektoren weisen ein zweiteiliges Translokationssignal auf. Dies wurde beispielsweise für *Bartonella*-Effektorproteine (Bep) beschrieben. Dabei bildet ein positiv geladener C-terminaler Proteinbereich zusammen mit einer oder mehreren BID („Bep intracellular delivery“)-Domänen im Zentrum des Proteins ein funktionales Translokationssignal (Schulein *et al.*, 2005). Seltenerweise enthalten einige T4-Effektorproteine, wie beispielsweise BPE123 von *Brucella abortus* oder DotA von *L. pneumophila*, ein N-terminales Sec-Signal, wodurch höchstwahrscheinlich der Export der Proteine zunächst über das Sec-System in das Periplasma und von dort aus mit Hilfe des T4S-Systems über die äußere Membran des Bakteriums erfolgt (Marchesini *et al.*, 2011, Nagai und Roy 2001).

#### Die Kopplungsproteine und T4S-Chaperone von T4S-Systemen

Für die effiziente Translokation benötigen T4S-Substrate, neben dem Translokationssignal, zusätzlich das Kopplungsprotein und/oder spezifische T4S-Chaperone. T4S-Chaperone weisen analoge Eigenschaften und Funktionen, wie T3S-Chaperone auf (Kubori und Nagai 2016, Zechner *et al.*, 2012). Beispielsweise verhindert das Chaperon VirE1 von *A. tumefaciens*, die Oligomerisierung und Aggregation des Effektorproteins VirE2 und ermöglicht die Bindung von VirE2 an das Kopplungsprotein VirD4 (Dym *et al.*, 2008). Die Bindung eines T4AS-Substrats zum Kopplungsprotein VirD4 kann über das C-terminale Translokationssignal oder über ein oder mehrere interne Signale erfolgen (Christie *et al.*, 2014). Das Kopplungsprotein bindet Substrate und überträgt diese im Anschluss weiter an den Translokationsapparat (Alvarez-Martinez und Christie 2009).

Die Translokation von einer Vielzahl der über 330 T4BS-Substrate von *L. pneumophila* ist abhängig von einem cytoplasmatischen Chaperon-Komplex, bestehend aus den Proteinen IcmS und IcmW (Cambronne und Roy 2007, Ninio *et al.*, 2005). T4BS-Substrate, die für eine effiziente Translokation das T4S-Chaperon IcmS und/oder IcmW benötigen, besitzen in der Regel neben dem C-terminalen Translokationssignal, ein internes Signal, das für die Bindung von IcmS und/oder IcmW wichtig ist. So hängt die effiziente Translokation der *Legionella*-Effektoren SidG und SdeA von der Bindung zum Chaperon-Komplex IcmS-IcmW ab (Bardill *et al.*, 2005, Ninio *et al.*, 2005). Eine detaillierte Studie zu SidG zeigte, dass der Chaperon-Komplex am internen Signal von SidG bindet, wodurch möglicherweise eine Konformationsänderung im Protein zustande kommt, die wiederum die Erkennung des C-terminalen Translokationssignals durch das T4BS-System ermöglicht (Cambronne und Roy 2007). Die genaue Rolle von IcmS und IcmW ist nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass der Chaperon-Komplex an der Entfaltung der Substrate während des Transports beteiligt ist (Amyot *et al.*, 2013, Cambronne und Roy 2007, Sutherland *et al.*, 2012). IcmS und IcmW interagieren vermutlich mit dem Kopplungsproteinkomplex (IcmO-IcmP-IcmJ) (Sutherland *et al.*, 2012). Eine Mutation in der CBD von IcmO führte zu einer reduzierten Translokation von IcmS-IcmW-abhängigen T4BS-Substraten (u. a. SedA), während die Translokation von IcmS-IcmW-unabhängigen T4BS-Substraten (u. a. RalF) unbeeinflusst blieb (Sutherland *et al.*, 2012). Die Daten ließen vermuten, dass der Chaperon-Komplex IcmS-IcmW als eine Art Erkennungssignal dient, um spezifische T4BS-Substrate zum Kopplungsprotein IcmO zu transportieren oder zu präsentieren.

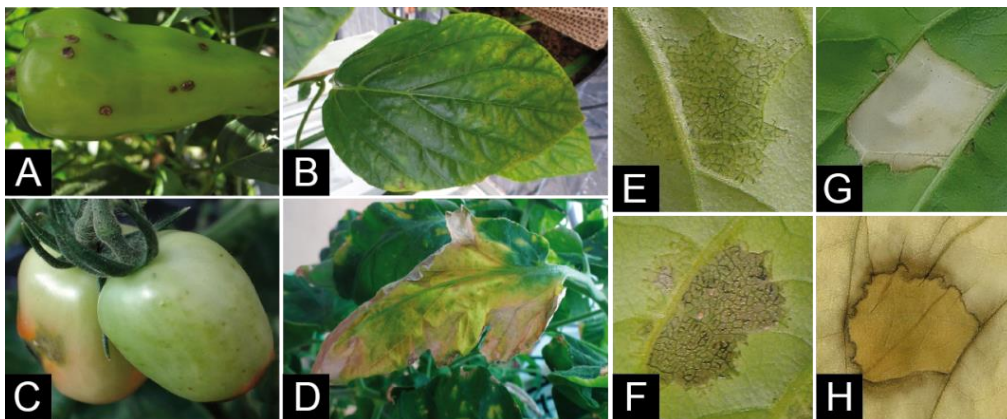
## 1.4 Das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas*

Die Gattung *Xanthomonas* gehört zur Familie der *Xanthomonadaceae* und beinhaltet 27 Spezies, die eine Vielzahl an Krankheiten (u. a. Fleckenkrankheit, Adernschwärze, Zitruskrebs oder Streifenkrankheit) in mindestens 124 monokotyledonen und 268 dikotyledonen Pflanzenspezies auslöst (Hayward 1993, Leyns *et al.*, 1984, Ryan *et al.*, 2011). Je nach Wirtsspektrum werden die *Xanthomonas*-Spezies in verschiedene Pathovare (pv.) eingeteilt.

### 1.4.1 Der Modellorganismus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Eines der Pathovare zum Studium der Interaktion zwischen Pflanzen und phytopathogenen Bakterien ist das Gram-negative, stäbchenförmige Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), welches der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika- (*Capsicum annuum*) und Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) ist (Abbildung 1.3) (Jones *et al.*, 2004). *Xcv* tritt über Öffnungen, wie Stomata oder Verwundungsstellen in den Apoplasten der Pflanzenzelle ein. Über das T3S-System wird ein „Cocktail“ von mindestens 30 Effektorproteinen in das Cytoplasma der Pflanzenzelle transloziert, wodurch eine weitere lokale Vermehrung des Bakteriums im Interzellularraum ermöglicht wird.

In suszeptiblen Paprikapflanzen führt die erfolgreiche Infektion zur Ausbildung sogenannter wässriger Läsionen, welche im weiteren Infektionsverlauf nekrotisch werden (Abbildung 1.3 E und F). In resistenten Pflanzen hingegen können spezifische Effektorproteine, sogenannte Avirulenz (Avr)-Proteine durch pflanzliche Resistenzproteine oder Resistenz-Gene (R-Gene) direkt oder indirekt erkannt werden, was in Folge häufig zu einer hypersensitiven Reaktion (HR) führt (Flor 1971, Greenberg und Yao 2004, Jones und Dangl 2006). Bei der HR handelt es sich um eine schnelle lokale Zelltodreaktion, welche eine weitere Vermehrung der Bakterien verhindert (Klement 1982). Im Labor kann eine solche HR-Reaktion durch die Verwendung hoher bakterieller Dichten sichtbar gemacht werden (Abbildung 1.3 G und H).



**Abbildung 1.3 Bakterielle Fleckenkrankheit auf Paprika- und Tomatenpflanzen verursacht durch *Xcv*.** Eine Infektion von *Xcv* führt zu braunen, nekrotischen Flecken auf Paprikafrüchten (A) und -blättern (B) sowie Tomatenfrüchten (C) und -blättern (D). Die Infiltration von hohen bakteriellen Dichten von *Xcv* führt in Blättern suszeptibler Paprikapflanzen zu wässrigen Läsionen (E), welche im weiteren Infektionsverlauf nekrotisch werden (F) (Laborphänotyp). In Blättern resistenter Paprikapflanzen kommt es zu einer Erkennung der Bakterien, wodurch eine hypersensitive Reaktion (HR) ausgelöst wird (G). Zur besseren Visualisierung der HR können die Blätter in Ethanol entfärbt werden (H). Quellen: A) <http://epakag.ucdavis.edu/vegetables/Pepper>; B - D) Jens Hausner und Felix Scheibner.

### 1.4.2 Effektorproteine von *Xcv*

Effektorproteine von *Xcv* können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen die sogenannten „*Xanthomonas* outer proteins“ (Xop) und zum anderen Avr-Proteine. Dabei sind die Funktionen individueller Effektoren sehr unterschiedlich. Die Effektorproteine XopJ und AvrBsT sind beispielsweise an der Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr beteiligt, in dem sie Zellwand-assoziierte Abwehrreaktionen und die ETI („effector triggered immunity“) inhibieren (Bartetzko *et al.*, 2009, Szczesny *et al.*, 2010). Bei der ETI werden spezifische Effektorproteine eines Pathogens in der Pflanze erkannt, was häufig zu einer HR an der Infektionsstelle führt (Jones und Dangl 2006). XopB und XopS von *Xcv* fördern u. a. die Ausbildung von Krankheitssymptomen sowie das bakterielle Wachstum (Schulze *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde für XopB eine Inhibierung des intrazellulären Vesikeltransports beschrieben (Schulze *et al.*, 2012).

Effektoren können aber auch die pflanzliche Genexpression aktivieren, wie es für das Avr-Protein AvrBs3 gezeigt wurde. AvrBs3 aus *Xcv* ist der Vertreter der gleichnamigen Protein-Familie und gehört zu den TAL („transcription activator-like“-)Effektoren, die hauptsächlich in

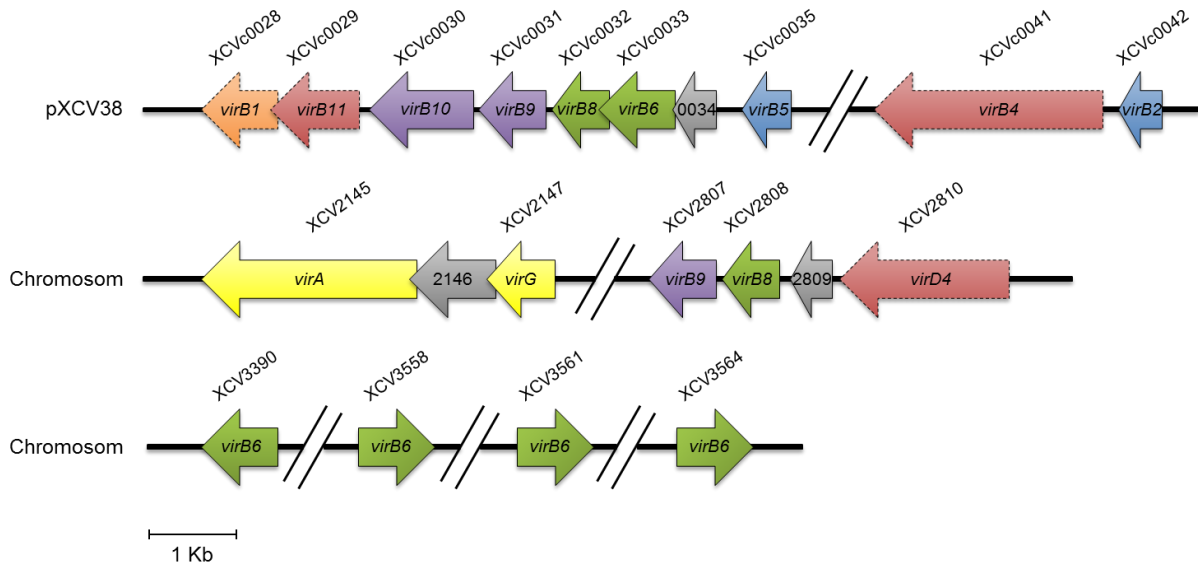
der Gattung *Xanthomonas* vorkommen und als Transkriptionsaktivatoren pflanzlicher Gene fungieren (Boch und Bonas 2010). Homologe TAL-Effektoren wurden in *Ralstonia solanacearum* und *Burkholderia rhizoxinica* nachgewiesen (Boch *et al.*, 2014). AvrBs3 besitzt ein N-terminales T3S- und Translokationssignal (Noël *et al.*, 2003). Zentral im Protein befindet sich die für TAL-Effektoren typische sogenannte „repeat“- oder DNA-Binderegion-Region. Dabei handelt es sich um ein 17,5 mal sich wiederholendes fast identisches 34 Aminosäuren langes Sequenzmotiv (Boch und Bonas 2010). In der C-terminalen Region von AvrBs3 befinden sich zwei Kernlokalisierungssignale sowie eine Aktivierungsdomäne, die vermutlich notwendig für eine transkriptionelle Aktivierung der Zielgene ist (Szurek *et al.*, 2001). Nach der Translokation über das T3S-System in die Wirtszelle dimerisiert AvrBs3 und wird durch die Bindung von Importin  $\alpha$  zusammen mit Importin  $\beta$  in den Zellkern transportiert (Gürlebeck *et al.*, 2005, Szurek *et al.*, 2001). Im Zellkern bindet AvrBs3 an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannten UPA („upregulated by AvrBs3“-Boxen und kann dabei mehr als 20 UPA-Gene induzieren (Kay *et al.*, 2009, Marois *et al.*, 2002). Interessanterweise kann AvrBs3 auch die Promotor-Region des R-Gens *Bs3* („bacterial spot resistance gene 3“) binden und aktivieren, was in der Folge zu einer HR in der Pflanzenzelle führt (Römer *et al.*, 2007). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer AvrBs3-spezifischen HR führen, sind derzeit nicht bekannt. Die pflanzliche Genexpression kann auch von Xops beeinflusst werden. So wurde gezeigt, dass XopD Abwehr- und Seneszenz-assoziierte Gene von *Xcv* negativ reguliert (Kim *et al.*, 2008).

### 1.4.3 *Xcv* kodiert ein T3S- und zwei putative T4S-Systeme

*Xcv* besitzt ein 5,17 Mb großes zirkuläres Chromosom, sowie die vier Plasmide pXCV183, pXCV19, pXCV2 und pXCV38 (Thieme *et al.*, 2005). Die Genomsequenz des 85-10-Stammes zeigte, dass Gene aller bisher beschriebenen Sekretionssysteme von Gram-negativen Bakterien vorzufinden sind.

#### Das putative T4S-System

Auf dem Plasmid pXCV38 sind neun Gene identifiziert wurden, die Komponenten eines möglichen T4S-Systems kodieren, das Homologien zum VirB/VirD4-T4S-System (T4S-System) von *A. tumefaciens* aufweist (Thieme *et al.*, 2005). Ein weiteres Gen, was vermutlich diesem System angehört, wurde auf dem Chromosom lokalisiert, sodass insgesamt 10 der 12 beschriebenen Komponenten des T4S-Systems in *Xcv* vorhanden sind (Abbildung 1.3). Die Gene *virB3* und *virB7* sind nicht im Stamm *Xcv* 85-10 vorhanden. In *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. albilineans*, *X. campestris* pv. *vasculorum*, *X. campestris* pv. *musacearum* und *Stenotrophomonas maltophilia* ist VirB7 dagegen vorzufinden.



**Abbildung 1.3. Schematische Übersicht über Gene, die Komponenten eines möglichen T4AS-Systems im Stamm 85-10 von *Xcv* kodieren.**

Das Plasmid pXCV38 enthält neun der 12 aus der Literatur bekannten Gene, die Komponenten eines möglichen T4AS-Systems kodieren könnten. Auf dem Chromosom ist das Zehnte Gen (*virD4*) sowie vier Kopien von *virB6*, jeweils eine Kopie von *virB8* und *virB9* sowie die Regulatoren *virA* und *virG* vorzufinden. Die Histidinkinase *VirA* und der cytoplasmatische „response“-Regulator *VirG* regulieren die Expression der *vir*-Gene von *A. tumefaciens* (Hwang *et al.*, 2015). Größe und Richtung eines Leserasters sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit deletierten Gene sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Farben entsprechen den vorhergesagten möglichen Funktionen der Genprodukte: orange – peptidoglykanspaltende Transglycosylase, rot – ATPasen (*virD4* kodiert das Kopplungsprotein), lila – kernkomplexbildende Proteine des T4AS-Systems, grün – substratkanalbildende Proteine, blau – extrazellulärer Pilus, gelb – 2-Komponenten „response“ Regulatoren, grau – hypothetische Proteine. 0034 = XCVc0034, 2146 = XCV2146, 2809 = XCV2809. Die Gene *virB3* und *virB7* sind im Stamm 85-10 nicht vorhanden.

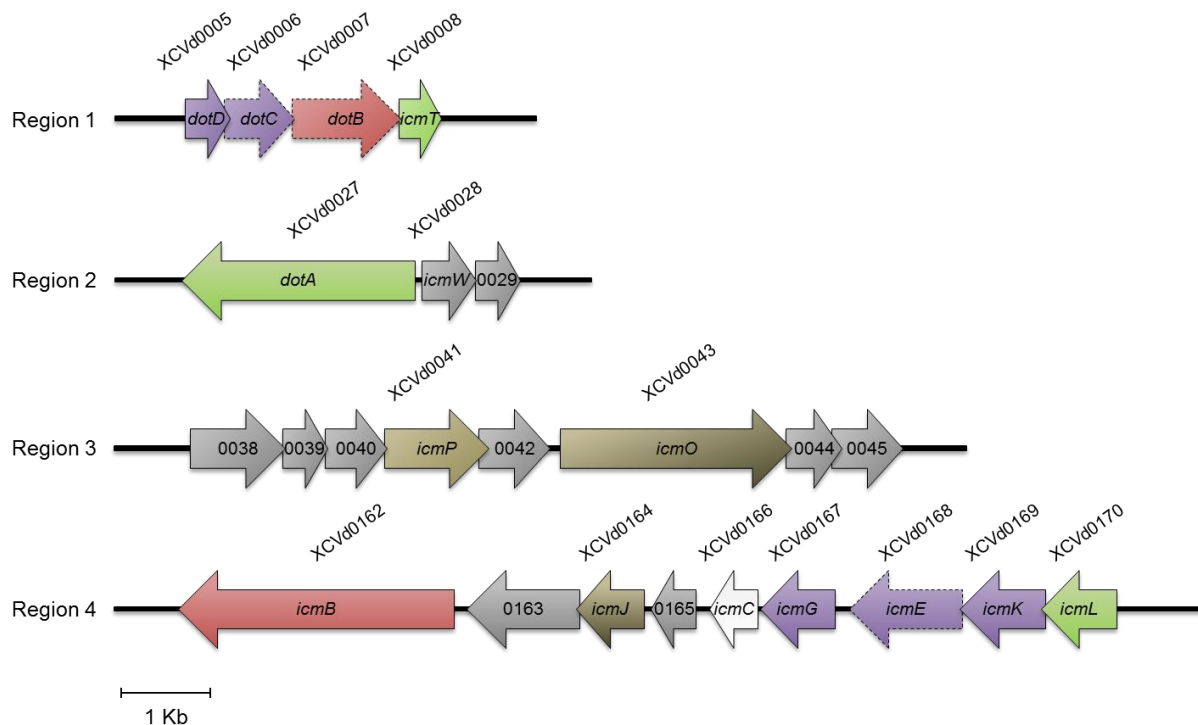
### Das putative T4BS-System

Interessanterweise wurde auf dem größten der vier Plasmide (pXCV183) von *Xcv* ein zweites putatives T4S-System identifiziert (Thieme *et al.*, 2005). Dieses weist starke Ähnlichkeiten zum *Dot/Icm*-T4S-System (T4BS-System) von den humanpathogenen Bakterien *L. pneumophila* und *C. burnetii* auf. In *Xcv* wurden dabei 15 der insgesamt 27 bisher beschriebenen Gene identifiziert (Abbildung 1.4).

Die Gene *icmF*, *icmH*, *icmN*, *icmQ*, *icmR*, *icmS*, *icmV*, *icmW*, *icmX*, *dotJ*, *dotP* und *dotV* sind nicht im Stamm *Xcv* 85-10 vorhanden. Ein orthologes Protein zum T4S-Chaperon *IcmW* stellt in *Xcv* möglicherweise XCVd0028 dar (Nagai und Kubori 2011).

Ob und welchen Einfluss die T4S-Systeme in *Xcv* haben könnten ist bisher nicht bekannt.





**Abbildung 1.4 Schematische Übersicht über Gene, die Komponenten eines möglichen T4BS-Systems im Stamm 85-10 von *Xcv* kodieren.**

Die Gene des putativen T4BS-Systems von *Xcv* sind auf vier Regionen auf dem Plasmid pXCV183 verteilt. In Region 1 befinden sich die Gene *dotB* - *dotD* sowie *icmT*. *dotA* ist zusammen mit XCVd0028 (= 0028), dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu dem Chaperon IcmW aufweist, in Region 2 zu finden. Die zwei Gene *icmO* und *icmP* liegen in Region 3. Region 4 beherbergt die Gene *icmB*, *icmC*, *icmE*, *icmG* sowie *icmJ* - *icmL*. Größe und Richtung eines Leserasters sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. In dieser Arbeit deletierte Gene sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Farben entsprechen den vorhergesagten möglichen Funktionen der Genprodukte: lila – mögliche kernkomplexbildende Proteine des T4BS-Systems, rot – mögliche ATPasen, weiß – Proteine mit unbekannter Funktion/Lage, braun – mögliche Untereinheiten eines Kopplungsproteinkomplexes mit ATPase-Funktion, grün – mögliche Strukturkomponenten, welche an der inneren Bakterienmembran lokalisiert sind, grau – hypothetische Proteine. Weitere Hypothetische Gene sind XCVd0029 = 0029, XCVd0038 = 0038, XCVd0039 = 0039, XCVd0040 = 0040, XCVd0042 = 0042, XCVd0044 = 0044, XCVd0045 = 0045, XCVd0163 = 0163, XCVd0165 = 0165. Im Stamm 85-10 fehlende Gene des Dot/Icm-Systems sind im Text beschrieben.

### Ein chromosomales Gencluster kodiert das T3S-System von *Xcv*

Das T3S-System von *Xcv* wird durch ein ca. 23 Kb großes „hypersensitive response and pathogenicity“-Gencluster (*hrp*-Gencluster) kodiert (Bonas *et al.*, 1991). Acht Transkriptionseinheiten mit insgesamt 25 Genen kodieren die strukturellen Komponenten sowie die Kontrollproteine und ein Effektorprotein des T3S-Systems (Büttner und Bonas 2002, Büttner *et al.*, 2007, Fenselau und Bonas 1995, Rossier *et al.*, 2000, Weber *et al.*, 2007). Die *hrp*-Gene sind essentiell für die Pathogenität von *Xcv*. 11 der 25 *hrp*-Gene sind in tier- und/oder pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und wurden deshalb als *hrc*-Gene („*hrp*-conserved“) bezeichnet und kodieren vermutlich essentielle Komponenten des Basalkörpers (He *et al.*, 2004). Neben den *hrp*- und *hrc*-Genen sind im *hrp*-Gencluster sogenannte *hpa*-Gene kodiert („*hrp*-associated“), welche einen positiven Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* haben, jedoch nicht essentiell für die Interaktion mit der Wirtspflanze sind (Büttner *et al.*, 2004, Büttner *et al.*, 2006, Huguet *et al.*, 1998, Lorenz *et al.*, 2008b, Lorenz *et al.*, 2008a). Ein Überblick über die *hrp*-Gene und deren Funktion ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Exprimiert werden die *hrp*-Gene nach dem Kontakt mit der pflanzlichen Wirtszelle oder durch die Anzucht der Bakterien in einem spezifischen Minimalmedium, durch die Transkriptionsregulatoren HrpG und HrpX (Schulte und Bonas 1992, Wengelnik und Bonas 1996c, Wengelnik *et al.*, 1996a). Es wird spekuliert, dass die Aktivierung von HrpG auf Grund einer Phosphorylierung des Proteins durch die Sensor kinase HpaS initiiert werden könnte, wie es für *X. campestris* pv. *campestris* vermutet wird (Li *et al.*, 2014). Das zur OmpR-Familie gehörende Protein HrpG aktiviert wiederum die Expression *hrpA* sowie *hrpX* (Wengelnik *et al.*, 1996a). Der zur AraC-Familie gehörende Transkriptionsaktivator HrpX induziert die *hrp*-Operone *hrpB* bis *hrpF* (Wengelnik *et al.*, 1996b).

**Tabelle 1.1 *hrp*-Gene und deren mögliche Funktion in *Xcv*.**

Operon	Gen	Vorhergesagte Funktion	Referenz
<i>hrpA</i>	<i>hrcC</i>	Sekretin	(Hausner <i>et al.</i> , 2013, Wengelnik <i>et al.</i> , 1996b)
<i>hrpB</i>	<i>hrcJ</i>	IM-Komponente	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
	<i>hrcL</i>	Regulator der ATPase	(Lorenz und Büttner 2009)
	<i>hrcN</i>	ATPase	(Lorenz und Büttner 2009)
	<i>hrcT</i>	Unbekannte Funktion	(Berger <i>et al.</i> , 2010)
	<i>hrpB2</i>	Putative „inner rod“-Komponente	(Hausner <i>et al.</i> , 2013, Lorenz <i>et al.</i> , 2008a, Rossier <i>et al.</i> , 2000)
	<i>hrpB1</i>	Putative „inner rod“-Komponente	(Hausner <i>et al.</i> , 2013, Rossier <i>et al.</i> , 2000)
	<i>hrpB4</i> <i>hrpB7</i>	Putatives IM-Protein Unbekannte Funktion	(Fenselau und Bonas 1995) (Fenselau und Bonas 1995)
<i>hrpC</i>	<i>hrcU</i>	Exportapparat, Substratbindung	(Berger <i>et al.</i> , 2010, Hartmann und Büttner 2013, Lorenz und Büttner 2009)
	<i>hrcV</i>	Exportapparat, Substratbindung	(Berger <i>et al.</i> , 2010, Büttner <i>et al.</i> , 2006, Hartmann und Büttner 2013, Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
	<i>hpaC</i>	T3S4-Kontrollprotein	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a, Schulz und Büttner 2011)
<i>hrpD</i>	<i>hrcQ</i>	Putativer C-Ring, Substratbindung	(Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
	<i>hrcR</i>	IM-Komponente	(Berger <i>et al.</i> , 2010)
	<i>hrcS</i>	IM-Komponente	(Berger <i>et al.</i> , 2010)
	<i>hpaA</i>	T3S-Kontrollprotein und Effektorprotein	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008b)
<i>hrpE</i>	<i>hrcD</i>	IM-Komponente	(Berger <i>et al.</i> , 2010)
	<i>hrpD6</i>	Unbekannte Funktion	(Huguet <i>et al.</i> , 1998)
	<i>hrpE</i>	Pilusprotein	(Weber und Koebnik 2005)
<i>hpaB</i>	<i>hpaB</i>	T3S-Chaperon	(Büttner <i>et al.</i> , 2004, Büttner <i>et al.</i> , 2006)
	<i>hpaE</i>	Unbekannte Funktion	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
<i>xopF1</i>	<i>xopF1</i>	Effektorprotein	(Büttner <i>et al.</i> , 2006, Büttner <i>et al.</i> , 2007)
	<i>hpaI</i>	Unbekannte Funktion	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
	<i>hpaD</i>	Unbekannte Funktion	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
<i>hrpF</i>	<i>hrpF</i>	Translokonprotein	(Büttner <i>et al.</i> , 2002)

#### 1.4.4 Achtung Kontrolle: Checkpoints in der T3S und Translokation

##### Checkpoint 1: Substrat-Bindestellen des T3S-Systems und das „inner rod“-Protein

Der Exportapparat des T3S-Systems bildet vermutlich einen Exportkanal aus, wodurch der Transport von T3S-Komponenten und -Substraten über die IM ermöglicht wird (Büttner 2012). Als Teil des Basalapparates bilden Komponenten des Exportapparates, wie u. a. HrcU und HrcV, vermutlich wichtige Bindestellen für T3S-Substrate von *Xcv* (Berger *et al.*, 2010). Mitglieder der SctU- und SctV-Familie von ft3S-Systemen aus tierpathogenen Bakterien enthalten zwei cytoplasmatische Domänen, die an der Erkennung

von T3S-Substraten beteiligt sind (Bange *et al.*, 2010, Minamino *et al.*, 2012, Minamino und Macnab 2000, Minamino und MacNab 2000). In Übereinstimmung damit, wurde für das IM-Protein HrcV gezeigt, dass die cytoplasmatische Domäne (HrcV<sub>C</sub>) mit HrpB2 sowie mit dem Pilusprotein HrpE und Effektorproteinen interagiert (Hartmann und Büttner 2013). Die cytoplasmatische Domäne von HrcU (HrcU<sub>C</sub>) interagiert ebenfalls mit HrpB2, jedoch nicht mit Pilus- und Effektorproteinen (Lorenz *et al.*, 2008a). HrpB2 wird durch das T3S-System sekretiert und ist essentiell für die Pilusassemblierung in *Xcv* (Lorenz *et al.*, 2008a, Rossier *et al.*, 2000). Es wird daher vermutet, dass HrpB2 eines der ersten Substrate ist, welches das T3S-System durchquert (Rossier *et al.*, 2000). Fraktionierungsstudien haben gezeigt, dass HrpB2 im bakteriellen Periplasma sowie der äußeren Membran lokalisiert (Hartmann *et al.*, 2012). Außerdem enthält HrpB2 in der C-terminalen Region ein konserviertes Aminosäuremotiv, das in vorhergesagten „inner rod“-Proteinen von tierpathogenen Bakterien vorkommt, wodurch insgesamt geschlossen wurde, dass HrpB2 möglicherweise das „inner rod“-Protein in *Xcv* sein könnte (Hartmann *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den „frühen“ Substraten, wie HrpB2 und HrpE, werden Translokonproteine als „mittlere“ und Effektorproteine als „späte“ Substrate bezeichnet, da diese Proteine erst sekretiert werden können, nachdem die „inner rod“-Struktur und der Pilus (und im Fall von Effektorproteinen das Translokon) aufgebaut wurden. HrpF bildet in *Xcv* wahrscheinlich das Translokon aus, da es essentiell für die Pathogenität des Bakteriums, aber entbehrlich für die T3S ist (Büttner *et al.*, 2002). Außerdem besitzt HrpF die Fähigkeit zur Bildung von Poren in Lipiddoppelmembranen und verfügt über zwei Transmembranbereiche (Büttner *et al.*, 2002).

### Checkpoint 2: Der Substratwechsel

Da der Zusammenbau des T3S-Systems wahrscheinlich schrittweise erfolgt, wird vermutet, dass es einen Wechsel in der Substratspezifität von „frühen“ zu „späten“ Substraten gibt (Büttner 2012, Lorenz *et al.*, 2008a). In *Xcv* wird der Substratspezifitätswechsel durch das T3S4 („type III secretion substrate specificity switch protein“)-Protein HpaC kontrolliert, das mit der cytoplasmatischen Domäne von HrcU interagiert und eine Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> herbeiführt (Lorenz *et al.*, 2008a, Schulz und Büttner 2011). HpaC, das mit HrpB2 interagiert, unterdrückt die effiziente Sekretion des putativen „inner rod“-Proteins HrpB2 und fördert die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen (Büttner *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2008a). Da sowohl HrpB2 als auch HpaC vermutlich am NPTH-Motiv mit HrcU interagieren, konkurrieren HrpB2 und HpaC möglicherweise um die gleiche Bindestelle von HrcU<sub>C</sub> (Lorenz und Büttner 2011). Das NPTH-Motiv von HrcU<sub>C</sub> wird vermutlich zwischen dem Asparagin und Prolin gespalten (Lorenz und Büttner 2011). Nach der Bindung des T3S4-Proteins HpaC an HrcU<sub>C</sub> führt die Spaltung und/oder die Konformationsänderung in HrcU möglicherweise zur Initiierung des Substratwechsels (Büttner 2012, Hausner und Büttner 2014). So konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von HrcU die Pathogenität von *Xcv* und die Sekretion von Translokonproteinen sowie Effektorproteinen

(„mittlere“ und „späte“ Substrate) fördert, während die Sekretion von HrpB2 („frühes“ Substrat) unbeeinflusst war (Lorenz und Büttner 2011). Es wurde geschlussfolgert, dass HrpB2 vor der Spaltung von HrcU sekretiert wird (Lorenz und Büttner 2011).

### Checkpoint 3: Die Hpa-Proteine - Kontrollproteine der T3S und Translokation

Für die effiziente Sekretion und Translokation von Effektorproteinen werden die Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC benötigt (Büttner *et al.*, 2004, Lorenz *et al.*, 2008b, Lorenz *et al.*, 2008a). Dabei bindet das Regulatorprotein HpaA zunächst an das T3S-Chaperon HpaB und verhindert damit wahrscheinlich eine Blockierung des T3S-Systems, sodass Translokonproteine zum T3S-Apparat gelangen können (Abbildung 1.4) (Lorenz *et al.*, 2008b). Als kleines (18 kDa), saures und Leucin-reiches Protein weist HpaB typische Eigenschaften von T3S-Chaperonen auf (Feldman und Cornelis 2003) und trägt zudem zur Virulenz von *Xcv* bei (Büttner *et al.*, 2004). Nachdem das T3S-System vollständig aufgebaut ist, erfolgt der Wechsel von „frühen“ Substraten („inner rod“- und Pilus-Proteine) und „mittleren“ Substraten (Translokonproteine) zu „späten“ Substraten (Effektorproteine). Entscheidend ist dafür wahrscheinlich die Sekretion und Translokation von HpaA in die Wirtszelle, wodurch HpaB „befreit“ wird und das Chaperon somit die effiziente Sekretion und Translokation von Effektorproteinen fördern kann (Abbildung 1.4) (Büttner *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2008b). HpaA übt damit die Funktion als T3-Kontrollprotein und als Effektorprotein aus, wobei die genaue Funktion von HpaA in der Wirtszelle noch nicht bekannt ist (Lorenz *et al.*, 2008b).

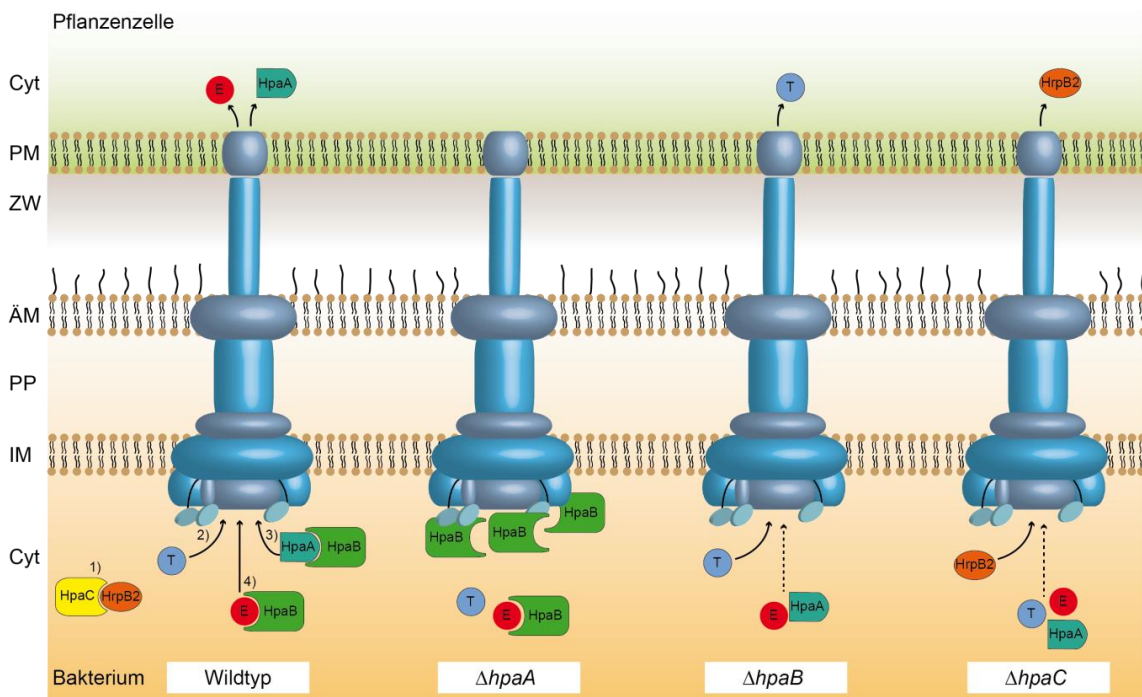
In Übereinstimmung mit der beschriebenen Funktion von HpaB, werden in einer *hpaB*-Deletionsmutante Effektoren reduziert sekretiert und transloziert (Abbildung 1.4) (Büttner *et al.*, 2004). Das putative Translokonprotein HrpF und XopA werden jedoch in Abwesenheit von HpaB transloziert (Büttner *et al.*, 2004). XopA könnte eine weitere Komponente des Translokons darstellen, da das Protein für die T3S entbehrlich, für die vollständige Virulenz und Avirulenz von *Xcv* jedoch benötigt wird (Noël *et al.*, 2002).

Sekretionsstudien mit einer *hpaA*-Mutante zeigten, dass im Vergleich zum Wildtypstamm die Sekretion von Effektoren sowie Pilus- und Translokonproteinen reduziert ist (Lorenz *et al.*, 2008b). Es wird vermutet, dass in diesem Fall HpaB die effiziente Sekretion verhindert, indem es mit Komponenten des T3S-Apparates interagiert und so den Export durch das T3S-System blockiert (Abbildung 1.4) (Lorenz *et al.*, 2008b).

In einer *hpaC*-Mutante wird das „inner rod“-Protein HrpB2 übersekretiert und kann wahrscheinlich auch transloziert werden, wohingegen die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen beeinträchtigt ist (Abbildung 1.4) (Hausner und Büttner 2014, Lorenz *et al.*, 2008a). Die Analysen mit verschiedenen Hpa-Mutanten haben gezeigt, welches komplexe Zusammenspiel nötig ist, um eine effiziente Sekretion und/oder Translokation von T3S-Substraten zu gewährleisten. Zudem deutet sich an, dass neben Effektorproteinen auch Nicht-Effektorproteine, wie das putative „inner rod“-Protein HrpB2 und die putativen Translokonproteine HrpF und XopA ein Translokationssignal besitzen.

Checkpoint 4: T3S- und Translokationssignale in T3S-Substraten

Damit Proteine über das T3S-System sekretiert oder transloziert werden können, benötigen diese ein T3S- und/oder Translokationssignal. In der Regel befindet sich das T3S-Signal in den N-terminalen 20 - 30 Aminosäuren und das Translokationssignal in den N-terminalen 50 - 100 Aminosäuren eines Proteins (Büttner 2012). Für AvrBs3, HpaA sowie einigen Xop-Effektoren aus *Xcv* wurde bereits die Wichtigkeit der N-terminalen Proteinregion sowie der Einfluss des T3S-Chaperons HpaB auf die Translokation nachgewiesen (Tabelle 1.2) (Büttner *et al.*, 2004, Büttner *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2008b, Noël *et al.*, 2003, Schulze *et al.*, 2012, Thieme *et al.*, 2007). Im Fall der Nicht-Effektorproteine HrpB2, HrpF und XopA wurde neben dem T3S-Signal ebenfalls ein Translokationssignal im N-terminalen Bereich der Proteine identifiziert (Büttner *et al.*, 2004, Hausner und Büttner 2014). Die molekularen Grundlagen, welche eine spezifische Export-Hierarchie von T3S-Substraten ermöglichen, sowie die Rolle des T3S- und Translokationssignals sind jedoch nicht vollständig verstanden (Stamm und Goldberg 2011).



**Abbildung 1.4 T3S-Kontrollproteine koordinieren den Export von T3S-Substraten.**

**Wildtyp:** Nach dem Aufbau des T3S-Systems (Basalapparat, „inner rod“, Pilus) und dem ersten Substratspezifitätswechsel, wird die effiziente Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2 durch das T3S4-Protein HpaC unterdrückt. Nach der Sekretion von Translokonproteinen (T) bindet das T3S-Chaperon HpaB das Regulator- und Effektorprotein HpaA. Durch einen noch unbekanntem Mechanismus wird die Sekretion und Translokation von HpaA initiiert. Durch die Translokation von HpaA wird HpaB „befreit“ und kann spezifisch an Effektorproteine (E) binden und die Sekretion und Translokation dieser fördern kann.  **$\Delta hpaA$ :** In Abwesenheit von HpaA blockiert HpaB wahrscheinlich den T3S-Apparat, in dem es an Komponenten des T3S-Systems bindet. Dies hat zur Folge, dass die effiziente Sekretion von Pilus, Translokon und Effektorproteinen supprimiert wird.  **$\Delta hpaB$ :** In einer *hpaB*-Mutante werden Effektoren reduziert sekretiert und transloziert. Interessanterweise werden ohne das Kontrollprotein HpaB die Translokonproteine HrpF und XopA sekretiert und auch in die Wirtszelle transloziert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass HrpF und XopA ein funktionales Translokationssignal enthalten.  **$\Delta hpaC$ :** Fehlt das T3S4-Protein HpaC werden Translokon- und Effektorproteine reduziert sekretiert. Gleichzeitig wird jedoch das „inner rod“-Protein HrpB2 verstärkt sekretiert und in die Pflanzelle transloziert. Somit ist HrpB2, neben HrpF und XopA, ein weiteres Nicht-Effektorprotein mit einem funktionalen Translokationssignal. Gestrichelte Pfeile deuten eine reduzierte Sekretion und/oder Translokation an. Cyt: Cytoplasma; PM: Plasmamembran; ZW: Zellwand; ÄM: äußere Membran; PP: Periplasma; IM: innere Membran. Abbildung modifiziert nach (Büttner 2012).

**Tabelle 1.2 T3S- und Translokationssignale in T3S-Substraten von *Xcv* sowie der Einfluss des T3S-Chaperons HpaB auf den Export der Proteine.**

T3S-Substrat	Translokationssignal <sup>1</sup>	Translokation <sup>2</sup>		Referenz
		Wildtyp	$\Delta hpaB$	
AvrBs1	unbekannt	+	+/-	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
AvrBsT	unbekannt	+	+/-	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
AvrBs3	1 - 200	+	+/-	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
XopB	1 - 177	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopC	1 - 200	+	+/-	(Büttner <i>et al.</i> , 2006, Noël <i>et al.</i> , 2003)
XopE1	1 - 135	+	n. a.	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopE2	1 - 150	+	n. a.	(Thieme <i>et al.</i> , 2007)
XopF1	1 - 200	+	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2007)
XopG	1 - 100	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopI	1 - 140	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopJ	1 - 155	+	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2006, Noël <i>et al.</i> , 2003)
XopK	1 - 74	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopM	1 - 520	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopR	1 - 152	+	-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopS	1 - 157	+	-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
XopV	1 - 148	+	+/-	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
HpaA	1 - 72	+	+/-	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008b)
HrpF	1 - 200	-	+	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
XopA	1 - 51	-	+	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
HrpB2	1 - 76	-	+ <sup>3</sup>	(Hausner und Büttner 2014)

<sup>1</sup>Für die Identifizierung eines Translokationssignals waren die dargestellten Aminosäurebereiche eines T3S-Substrats in translationaler Fusion mit einem Reporterprotein notwendig. Das Translokationssignal des jeweiligen T3S-Substrats vermittelte die Translokation des Reporterproteins in die Pflanzenzelle. Im Fall von AvrBs1 und AvrBsT ist das Volllängenprotein in translationaler Fusion mit dem Reporterprotein gemeint.

<sup>2</sup>Die erfolgreiche Translokation eines Fusionsproteins ging mit einer HR im Pflanzengewebe einher, die durch das Reporterprotein ausgelöst wurde. +, HR (Translokation); +/-, reduzierte HR im Vergleich zum Wildtyp (reduzierte Translokation); -, keine sichtbare HR (keine detektierbare Translokation); n. a., nicht analysiert.

<sup>3</sup>Die Translokation von HrpB2 in translationaler Fusion mit dem Reporterprotein wurde in einer *hpaC*-Mutante analysiert.

## 1.5 Zielstellung

In vorangegangenen Arbeiten wurde für einige T3S-Substrate von *Xcv* die Wichtigkeit der N-terminalen Region für die T3-abhängige Sekretion und Translokation nachgewiesen (siehe Tabelle 1.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die T3-Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC den Export von T3S-Substraten beeinflussen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung von minimalen T3S- und Translokationssignalen in dem Effektorprotein AvrBs3 sowie der Nicht-Effektorproteine XopA und HrpB2 mit Hilfe von *in vitro*-Sekretionsstudien und Reporter-basierten *in vivo*-Translokationsstudien. Die Ergebnisse der Reporter-basierten Experimente sollten zudem Aufschluss darüber geben, ob T3S- und Translokationssignale gemeinsam oder getrennt voneinander im Protein vorliegen. Außerdem sollte der Einfluss von Kontrollproteinen auf den Export von Fusionsproteinen zwischen Effektor- und Nicht-Effektorproteinen mit verschiedenen Reporterproteinen über das T3S-System untersucht werden.

*Xcv* ist das erste pflanzenpathogene Bakterium, welches Gene für zwei putative T4S-Systeme besitzt. Ob das identifizierte T4AS- bzw. T4BS-System einen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums hat, ist bisher unbekannt und war daher eine weitere Zielstellung dieser Arbeit. Hierfür sollten Deletionsmutanten generiert und anschließend durch Infektions- und *in vivo*-Wachstumsexperimente in Paprikapflanzen analysiert werden. Ferner sollte durch eine Kombination von bioinformatischen Vorhersagen und einer experimentellen Verifizierung die Identifizierung putativer T4S-Substrate in *Xcv* ermöglicht werden. Unter Verwendung des Vorhersageprogrammes S4TE („Searching algorithm for type-IV secretion system effectors“) sollten potentielle T4S-Substrate im Genom von *Xcv* identifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2.1 Verwendete Puffer und Lösungen**

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
DNA/RNA-Analysen	
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA
10 x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) Gelatine
5 x DNA-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) SDS (Sodiumdodecylsulfat); 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
„Annealing“-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat
1 x TBE-Puffer	90 mM Tris, pH 8,0; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA
RNA-Probenpuffer	Formamid; 0,5 M EDTA; 1 % Bromphenolblau
Proteinanalysen	
2 x Laemmli-Puffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v); Bromphenolblau
1 x TBST	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,05 % (v/v) Tween20
4 x Laufgelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
1 x Tank-Puffer	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS
Blockierlösung	5 % (w/v) Milchpulver; 3 % (w/v) BSA-Albumin Fraktion V in 1 x TBST
Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20 % (v/v) Methanol
p-Cumarsäure	29,6 mg in 2 ml DMSO
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	8,8 mg in 200 µl DMSO
ECL-Lösung	100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1,25 mM 3-Aminophthalhydrazid; 225 nM p-Cumarinsäure; 0,3 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 2.1.2 Medien und Antibiotika

Alle *E. coli*-Stämme wurden in Lysogeny Broth-Medium (LB-Medium) (Miller 1972) bei 37 °C über Nacht kultiviert. *Xcv*-Stämme und *Agrobacterium*-Stämme wurden in Nuriert-Yeast-Glycerol (NYG-Medium) (Daniels *et al.*, 1984) oder in Minimalmedium (MA-Medium) (Ausubel und Struhl 1996) kultiviert. Die Kultivierungstemperatur lag hierfür bei 30 °C. Festmedien enthielten 1,5 % (w/v) Agarose bzw. 1 % (w/v) Agarose für triparentale Konjugationen (siehe Kapitel 2.2.1.9). Die Medienzusammensetzung ist der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Zur Selektion von Bakterien wurden den Medien verschiedene Antibiotika zugesetzt (Tabelle 2.3).

**Tabelle 2.2 Medienzusammensetzung**

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; pH 7,5
NYG-Medium	0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,3 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 2 % (w/v) Glycerin
MA-Medium (pH 7,0 oder 5,3)	60 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 33 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7,6 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1,7 mM Natriumacetat; 10 mM Saccharose; 0,3 % (w/v) Casamino-säuren; 1 mM MgSO <sub>4</sub>

**Tabelle 2.3 Antibiotika**

Medienzusätze	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
Gentamycin (Gent)	15 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	10 µg/ml
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktosid)	0,004 % (w/v)

## 2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Die im Anhang befindlichen Tabellen 5.1 und 5.2 weisen die Bakterienstämme und Plasmide auf, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

## 2.1.4 Oligonukleotide

Die im Anhang befindliche Tabelle 5.3 beinhaltet die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

## 2.1.5 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) der nahezu isogenen Linien ECW, ECW-10R und ECW-30R verwendet. Von Tabakpflanzen wurde die Art *Nicotiana benthamiana* sowie *Bs3*-transgene und *gfp*-transgene *N. benthamiana* verwendet (Bonas *et al.*, 1991, Kousik und Ritchie 1998, Minsavage *et al.*, 1990, Werner *et al.*, 2011). *gfp*-transgene Pflanzen enthalten das virale Konstrukt pICH18951, welches das *gfp*-Gen sowie die RdRP-kodierende Sequenz („RNA-dependent RNA polymerase“) stromabwärts des *alcA* Promotors trägt (Werner *et al.*, 2011). Nach der Infiltration der jeweiligen Pflanzen mit *Xcv* oder *Agrobacterium* wurden die Pflanzen in eine Phytokammer (Series 101, Percival Scientific) überführt.



**Tabelle 2.4 Wachstumsbedingungen für *C. annuum* und *N. benthamiana***

	Lichtphase (16 h)		Dunkelphase (8 h)	
	<i>C. annuum</i>	<i>N. benthamiana</i>	<i>C. annuum</i>	<i>N. benthamiana</i>
<b>Lichtintensität</b>	180 $\mu\text{E}/\text{sm}^2$	100 $\mu\text{E}/\text{sm}^2$	-	-
<b>Relative Luftfeuchte</b>	65 %	75 %	65 %	70 %
<b>Temperatur</b>	26 °C	20 °C	22 °C	18 °C

## 2.1.6 Antikörper

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden spezifische Antikörper verwendet (Tabelle 2.5). Die Antikörper wurden in 1 x TBST verdünnt.

**Tabelle 2.5 Verwendete Antikörper**

Primärer Antikörper	Referenz	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Anti-AvrBs3	(Knoop <i>et al.</i> , 1991)	1:15000	Anti-Kaninchen IgG	1:10000
Anti-HrcJ	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)	1:4000	Anti-Kaninchen IgG	1:10000
Anti-HrpF	(Büttner <i>et al.</i> , 2002)	1:5000	Anti-Kaninchen IgG	1:10000
Anti-HrpB1	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)	1:3000	Anti-Kaninchen IgG	1:10000
Anti-c-Myc	Santa Cruz	1:500	Anti-Kaninchen IgG	1:10000

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas GmbH, Deutschland) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Es wurden 2 - 4 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 40  $\mu\text{l}$  Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.2.1.2 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Mittels PCR („polymerase chain reaction“), unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide und einer hitzestabilen DNA-Polymerase wurden gezielt DNA-Fragmente amplifiziert und/oder spezifisch DNA-Abschnitte mutiert. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten (FlexCycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Die gezielten Mutationen spezifischer DNA-Abschnitte wurden über die verwendeten Oligonukleotide eingebracht. So wurden beispielsweise gezielt Typ IIs-Restriktions-schnittstellen (*Bsal*, *BpiI* und *Esp3I*) mutiert, was essentiell für eine weitere Klonierung war (siehe 2.2.1.6 und 2.2.1.7). Für Kolonie- und Gradienten-PCR wurde die Taq-Polymerase verwendet. Um PCR-Fehler zu minimieren wurde für die Amplifizierung von Fragmenten, die anschließend kloniert werden sollten die *Phusion*-Polymerase (Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) und der zugehörige *Phu*-Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6 PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
<b>Taq-PCR</b>			
10 x Taq-Puffer	2 µl	4 min	95 °C
10 mM dNTPs	0,25 µl	30 s	95 °C
10 mM Primer for	1 µl	30 s	50-65 °C
10 mM Primer rev	1 µl	1 min/kb	72 °C
DMSO	1,4 µl	1 min	72 °C
1 U Taq DNA-Polymerase	0,3 µl	∞	12 °C
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl		
Template	10-50 ng DNA bzw. <i>E. coli</i> - oder <i>Xcv</i> - Einzelkolonie		
<b>Phusion-PCR</b>			
5 x GC-Puffer	10 µl	3 min	98 °C
10 mM dNTPs	1 µl	15 s	95 °C
10 mM Primer for	2,5 µl	15 s	50-65 °C
10 mM Primer rev	2,5 µl	30 s/kb	72 °C
1 U <i>Phu</i> -Polymerase	0,5 µl	1 min	72 °C
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	∞	4 °C
Template	10-50 ng DNA		

### 2.2.1.3 „Primer-annealing“-Protokoll

Für sehr kurze DNA-Fragmente ( $\leq 30$  Nukleotide) wurde ein sogenanntes „Primer-annealing“ durchgeführt. Dazu wurden Oligonukleotide so designt, dass diese miteinander hybridisieren können. Der „forward“-Primer enthielt die komplette zu klonierende Sequenz samt passender Überhänge zur Integration in den Zielvektor. Der „reverse“-Primer enthielt dabei die gleiche Sequenz in revers-komplementärer Form. Die Primerkonzentration von „forward“- und „reverse“-Primer wurde auf 100 µM eingestellt. Je 10 µl von „forward“- und „reverse“-Primer wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Dazu kamen 80 µl „annealing“-Puffer, sodass die Endkonzentration der Primer bei 10 µM lag. Durch das Erhitzen der Oligonukleotide bei 95 °C für 15 Minuten im Heizblock wurden das Primergemisch denaturiert. Die Hybridisierung der Primer erfolgte dann durch langsames Abkühlen des Eppendorfreaktionsgefäßes für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die hybridisierten Primer (dsDNA) konnten nun für weitere Klonierungsapplikationen eingesetzt werden.

### 2.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH, Deutschland) verwendet. Dabei wurde 1 U T4-DNA-Ligase (1 µl) pro 10 µl Reaktionsansatz sowie 1 µl 10 x T4 DNA-Ligasepuffer eingesetzt. Vom PCR-Reaktionsansatz wurden 8 µl eingesetzt. Die Reaktion erfolgte entweder für 10 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

### 2.2.1.5 „Blunt end“-Klonierung

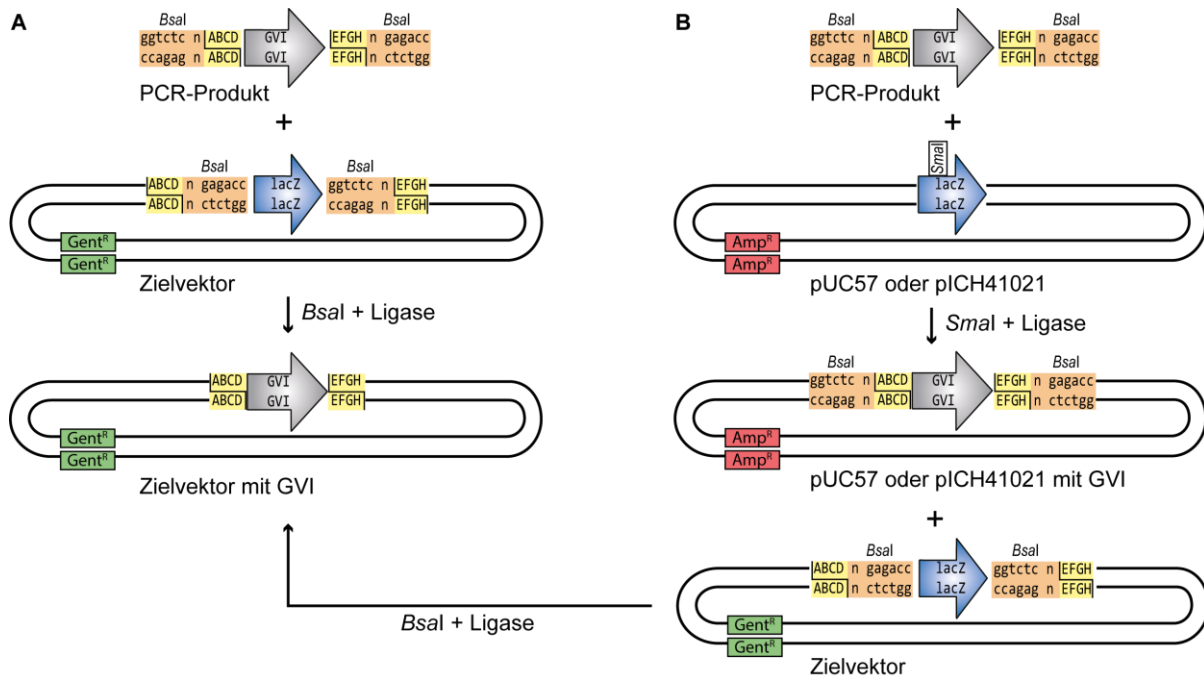
DNA-Fragmente, welche kloniert werden sollten wurden mittels *Phusion*-PCR (siehe 2.2.1.2) amplifiziert. Vor der Klonierung wurde das PCR-Fragment gereinigt oder nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus dem Agarosegel eluiert. Das gereinigte DNA-Fragment wurde danach in den Vektor pUC57 oder pICH41021 zwischenkloniert (Tabelle 5.2). Diese Vektoren besitzen eine Ampicillin-Resistenzgenkassette sowie ein *lacZ*-Gen. Die Linearisierung des Zielvektors erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit *SmaI*. Dieses Restriktionsenzym schneidet die Erkennungssequenz 5'-CCCGGG-3' ohne Überhänge („blunt end“). Die „blunt end“-Klonierung wurde in einem Temperaturzyklus-Steuergerät (FlexCycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 2.7). Nach Programmdurchlauf wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10) mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.8). Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Ampicilin und X-Gal über Nacht bei 37 °C. Mittels Kolonie-PCR wurde die Anwesenheit des gewünschten DNA-Fragments in weißen *E. coli*-Zellen getestet. Die DNA-Fragmente positiver Klone wurden anschließend mit vektorspezifischen sowie insertspezifischen Oligonukleotiden sequenziert.

**Tabelle 2.7 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die „blunt end“-Klonierung**

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
10 x T4 DNA-Ligationspuffer	1 µl	10 min	30 °C
PCR-Fragment	75 ng	10 min	16 °C
pUC57 / pICH41021	75 ng	10 min	30 °C
1 U <i>SmaI</i>	1 µl	∞	12 °C
1 U T4 DNA-Ligase	1 µl		
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl		

### 2.2.1.6 „Golden Gate“-Klonierung

Mit Hilfe des „Golden-Gate“-Systems können Gen und Zielvektor in einem Ansatz, unter Verwendung von Typ IIs-Restriktionsenzymen (*BsaI*, *BpiI* oder *Esp3I*) geschnitten und ligiert werden (Engler *et al.*, 2008). Voraussetzung dafür ist, dass das amplifizierte DNA-Fragment sowie das *lacZ*-Gen im Zielvektor (*lacZ $\alpha$* -Fragment) von Typ IIs-Restriktionsschnittstellen flankiert ist. Außerdem wurde darauf geachtet, dass das zu amplifizierende Gen von Interesse (GVI) und der Zielvektor keine weiteren Typ IIs-Restriktionsschnittstellen (*BsaI*, *BpiI* oder *Esp3I*) aufweist und wenn doch diese nötigenfalls mutiert worden sind (siehe Kapitel 2.2.1.2). Typ IIs-Restriktionsenzyme schneiden außerhalb ihrer Erkennungssequenz und generieren einen Überhang von vier Nukleotiden. Diese vier Nukleotide können frei ausgewählt werden, sodass eine gerichtete Assemblierung spezifischer DNA-Fragmente auf Grund der Hybridisierung komplementärer Nukleotidüberhänge ermöglicht wird. Das Prinzip der „Golden-Gate“-Klonierung ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1 Prinzip der „Golden-Gate“-Klonierung.**

**A)** DNA-Fragmente wurden mittels spezifischer Oligonukleotide in einer „Phusion“-PCR amplifiziert, sodass das Gen von Interesse (GVI, grau) von der Erkennungssequenz des Typ IIs-Restriktionsenzym *Bsal* (orange) flankiert ist. Die Erkennungssequenzen sind jeweils entgegengesetzt orientiert. Durch die Restriktion mit *Bsal* entsteht ein Überhang von vier Nucleotiden (gelb), welche frei wählbar sind (ABCD und EFGH stehen für beliebige Nucleotide). Der Zielvektor enthält das *lacZ*-Fragment (*lacZ*, blau), das ebenfalls von *Bsal*-Erkennungssequenzen flankiert wird, sodass nach erfolgter Restriktion und Ligation mit dem GVI eine Blau-Weiß-Selektion möglich ist. Während der Restriktion und Ligation eines DNA-Fragments in den Zielvektor werden die Typ IIs-Restriktionsschnittstellen sowie das *lacZ*-Gen ausgeschnitten. Folglich war es möglich, dass Restriktion und Ligation gleichzeitig stattfanden, da das Restriktionsenzym das ligierte DNA-Fragment nicht mehr aus dem Zielvektor schneiden kann.

**B)** Mehrere oder sehr große DNA-Fragmente, welche gerichtet kloniert werden sollten wurden zuerst in die Vektoren pUC57 oder pICH41021 mittels *SmaI* zwischenkloniert („blunt end“) und anschließend zusammen in den eigentlichen Zielvektor mittels *Bsal* kloniert. Abbildung modifiziert nach (Engler *et al.*, 2008).

Die „Golden Gate“-Klonierung wurde in einem Temperaturzyklus-Steuergerät (FlexCycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die in Tabelle 2.8 aufgelisteten Bedingungen verwendet. Das Enzym *Bsal* wurde von NEB und die Enzyme *BpiI*, *Esp3I* sowie die T4 DNA-Ligase von Thermo Scientific bezogen.

**Tabelle 2.8 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die „Golden Gate“-Klonierung**

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
10 x T4 DNA-Ligationspuffer	1 µl	2 min	37 °C
PCR-Fragment(e) / Module	75 ng	5 min	16 °C
Zielvektor	75 ng	5 min	50 °C*
1 U <i>Bsal</i> , <i>BpiI</i> oder <i>Esp3I</i>	1 µl	5 min	80 °C
1 U T4 DNA-Ligase	1 µl	∞	12 °C
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl		

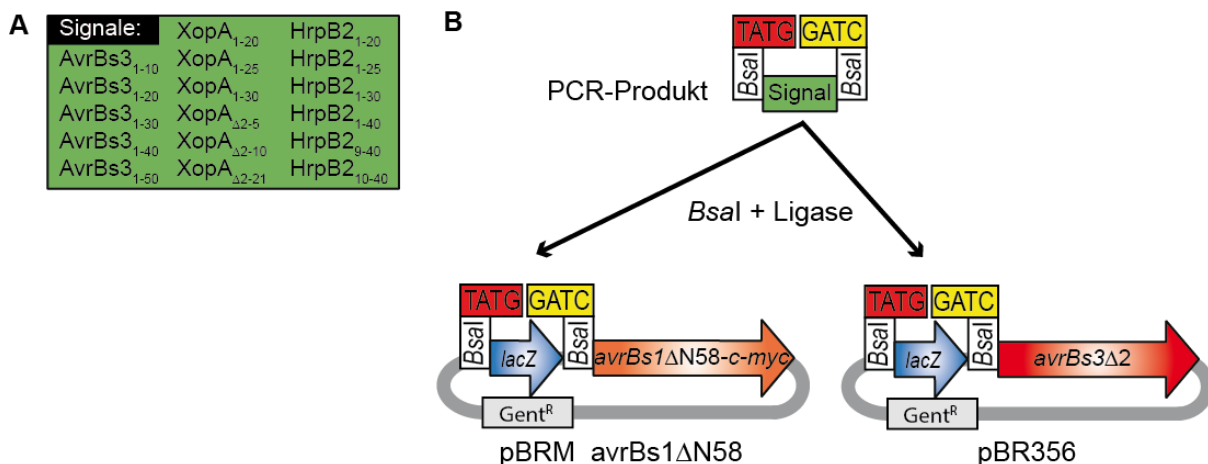
\* Temperaturoptimum für *Bsal*. Im Fall von *BpiI* und *Esp3I* wurde eine Temperatur von 37 °C gewählt.

### 2.2.1.7 Erstellung von Expressionskonstrukten und Deletionsmutanten

### Erstellung von Reporterkonstrukten zur Analyse von T3S- und Translokationssignalen

Für die Erstellung von *avrBs1*ΔN58 wurde der *lac*-Promotor sowie das *lacZ*α-Gen von pBRM mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *lacZ*prom\_for und *lacZ*\_rev amplifiziert. Nach der Reinigung des PCR-Fragments wurde dieses mit *Esp3I* verdaut. Das Plasmid pDSM100 enthält das Gen *avrBs1* mit einer 3x *c-myc*-kodierenden Sequenz. Für die Amplifikation des Fragments *avrBs1*<sub>59-445</sub>-3xc-*myc* mittels der Primer *Bs159\_for* und *Bs1myc\_rev* diente pDSM100 als „template“. Das resultierende DNA-Fragment wurde gereinigt und mit *BsaI* verdaut. Die beiden verdauten DNA-Fragmente wurden anschließend in den mit *EcoRI* und *HindIII* vorverdauten Zielvektor pBRM-P-Intermediat ligiert. Dies resultierte im Plasmid pBRM\_avrBs1ΔN58.

Zur Analyse von T3S- und Translokationssignalen wurden verschiedene N-terminale Bereiche von T3S-Substraten (Abbildung 2.2 A) translational an den zuvor erstellten AvrBs1ΔN58-Reporter oder den bereits vorhandenen AvrBs3Δ2-Reporter (Noël *et al.*, 2003) fusioniert. Dazu wurden DNA-Fragmente, welche für mögliche T3S- und Translokationssignale kodieren mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide vom Genom des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde von der Erkennungssequenz des Typ II-Restriktionsenzym *BsaI* flankiert. In einer „Golden Gate“-Reaktion wurde das jeweilige DNA-Fragment in den entsprechenden Zielvektor (pBRM\_avrBs1ΔN58 bzw. pBR356) kloniert (Abbildung 2.2 B). Bereits zu Beginn der Arbeit vorliegende Konstrukte sind der Tabelle 5.2 zu entnehmen.



**Abbildung 2.2 Schematische Darstellung zur Erstellung von Reporterkonstrukten für die Analyse von T3S- und Translokationssignalen ausgewählter T3S-Substrate.**

**A)** Übersicht der analysierten T3S- und Translokationssignale. Angegeben sind die Aminosäuren.

**B)** *avrBs3*-, *xopA*- und *hrpB2*-Derivate wurden per PCR amplifiziert und anschließend gereinigt. Die entsprechenden Fragmente werden von *BsaI*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Die farbigen Rechtecke über der Restriktionsschnittstelle entsprechen den jeweiligen Nucleotidüberhängen, sodass eine gerichtete Klonierung der Fragmente in die Zielvektoren pBRM\_avrBs1ΔN58 und pBR356 ermöglicht wird. Dem Reporter AvrBs1ΔN58, fehlen die N-terminalen 58 Aminosäuren und dem Reporter AvrBs3Δ2 fehlen die N-terminalen 152 Aminosäuren. Beide Reporter besitzen damit kein funktionales T3S- und Translokationssignal mehr.

### Erstellung von dTALE-2 und dessen Derivat dTALE-2 $\Delta$ N mittels des modularen Klonierungssystems

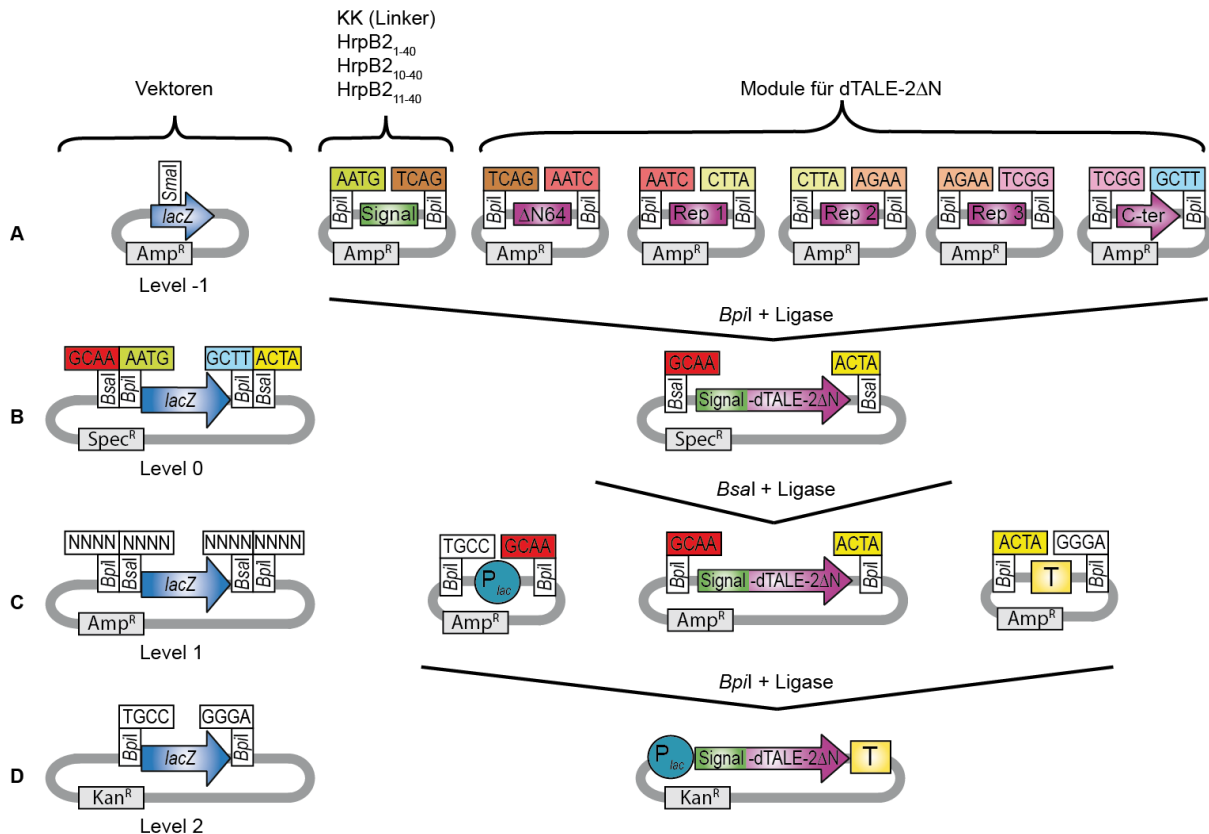
Das modulare Klonierungssystem (MoClo) basiert auf der „Golden Gate“-Technologie (siehe 2.2.1.6). Mit Hilfe des MoClo-Systems können systematisch komplette transkriptionelle Einheiten sowie Multi-Gen-Konstrukte aus einzelnen Modulen (z. B. Promotor, Genkodierende Sequenz, Epitop-kodierende Sequenz, Transkriptionsterminator) assembliert werden (Weber *et al.*, 2011). Die verwendeten Module und Vektoren sind im Anhang in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Der „designer“ TAL-Effektor (dTALE-2) ist zu 98 % identisch mit dem TAL-Effektor AvrBs3. Aufgrund des komplexen Aufbaus eines TAL-Effektors (siehe Kapitel 1.4.2) wurde der dTALE-2 in fünf Module geteilt, die zunächst in einem Level -1-Vektor zwischenkloniert vorlagen. Jedes Modul enthielt dabei ein funktionsrelevantes Element des dTALE-2. Dabei handelte es sich um die kodierende Sequenz der N-terminalen Region (N-ter), die kodierende Sequenz der „repeat“-Region, welche in drei Module (Rep 1, Rep 2, Rep 3) aufgeteilt wurde sowie die kodierende Sequenz der C-terminalen Region (C-ter) des dTALE-2. Die einzelnen Module (N-ter, Rep1, Rep2, Rep3, C-ter) wurden von *Bsal*-Restriktionserkennungssequenzen flankiert, wodurch die Module ausgeschnitten und aufgrund passender Überhänge gerichtet in einen Level 0-Vektor assembliert werden konnten. Das Level 0-Modul mit dem assemblierten dTALE-2 (pICH73103) sowie das Level 1-Modul, welches den *lac*-Promotor enthält (pICH50422) und ein Level 1-Modul, welches eine Transkriptionsterminatorsequenz enthält (pICH50122), wurden von S. Marillonnet zu Beginn der Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 5.2). Das Level 0-Modul mit dem dTALE-2 war von *Bsal*-Restriktionserkennungssequenzen flankiert, wodurch der dTALE-2 in den binären Level 1-Vektor pICH50251 mittels des Typ IIs-Restriktionsenzym *Bsal* kloniert werden konnte. Für die Generierung des dTALE-2-Expressionskonstrukts wurden Level 1-Module, welche den *lac*-Promotor, die komplette dTALE-2 kodierende Sequenz bzw. einen Terminator enthalten zusammen mit dem Level 2-Vektor pICH77739 in einer *BpiI*-„Golden Gate“-Klonierung assembliert (pAGB128).

Der dTALE-2 $\Delta$ N, welcher im 5'-Bereich eine Exportsignalsequenz (Signal) enthielt wurde aus sechs Modulen zusammengesetzt (Abbildung 2.3 A). Um das Level -1-Modul zu generieren, das die Codons 65-288 von dTALE-2 ( $\Delta$ N64) kodiert wurde pAGB128 als Template in einer PCR mit den Oligonukleotiden TALDN64\_for und TALN\_rev eingesetzt. Das daraus entstandene DNA-Fragment dTALE $\Delta$ N64 wurde in ein Level -1-Vektor zwischenkloniert. Die Level -1-Module Rep1 (pICH73079), Rep2 (pICH73081), Rep3 (pICH73093) und C-ter (pICH72151) wurden von S. Marillonnet zu Beginn der Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 5.2).

Das Signal-Modul enthielt entweder ein *hrpB2*<sub>x-40</sub>-Derivat oder ein Modul, das einen Linker von zwei Lysinresten (KK) kodiert (Abbildung 2.3 A). Zur Erstellung des Level -1-Moduls, das den Linker kodiert wurde ein „Primer-annealing“ mit den Oligonukleotiden linker-TALDN64\_for und linker-TALDN64\_rev durchgeführt (siehe 2.2.1.3). Das resultierende DNA-Fragment wurde „blunt end“ in einen Level -1-Vektor zwischenkloniert und sequenziert.

Für die Erstellung von *hrpB2*<sub>x-40</sub>-Modulen wurden die Codons 1 - 40, 10 - 40 und 11 - 40 von *hrpB2* per PCR amplifiziert und anschließend ebenfalls „blunt end“ in einen Level -1-Vektor zwischenkloniert. Für die Erstellung der dTALE-2ΔN-Konstrukte wurden die Level -1-Module, welche die *hrpB2*<sub>x-40</sub>-Derivate (Signal), die Codons 65-288 (ΔN64), die zentrale repeat-Region (Rep 1, Rep 2, Rep 3) und die C-terminale Region des dTALE-2 (C-ter) enthielten zusammen in den Level 0-Vektor pICH41308 mittels des Typ IIs-Restriktionsenzym *BpiI* kloniert (Abbildung 2.3 A und B). Alternativ zu den *hrpB2*<sub>x-40</sub>-Derivaten wurde der Linker (KK) als Signal-Modul in die „Golden Gate“-Reaktion eingesetzt. Der Level 0-Vektor enthält das *lacZ*α-Fragment (*lacZ*), das von den Erkennungssequenzen der Typ IIs-Restriktionsenzyme *BsaI* und *BpiI* flankiert ist. Nach der *BpiI*-Klonierung von Level -1 in Level 0 erfolgte die Klonierung des KK-dTALE-2ΔN-Moduls bzw. der *hrpB2*<sub>x-40</sub>-dTALE-2ΔN-Module in den Level 1-Vektor pICH50251 mittels *BsaI* (Abbildung 2.3 C). Zur Erstellung von dTALE-2ΔN-Expressionskonstrukten wurden die Level 1-Module, welche den *lac*-Promotor, den KK-dTALE-2ΔN bzw. ein *hrpB2*-dTALE-2ΔN-Derivat und einen Terminator enthielten zusammen in den binären Level 2-Vektor pICH77739 mittels einer *BpiI*-„Golden Gate“-Klonierung assembliert (Abbildung 2.3 C und D). Die entstandenen Expressionskonstrukte pAGB143 - 146 sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.



**Abbildung 2.3 Schematische Übersicht über die Erstellung von dTALE-2 $\Delta$ N-Konstrukten.**

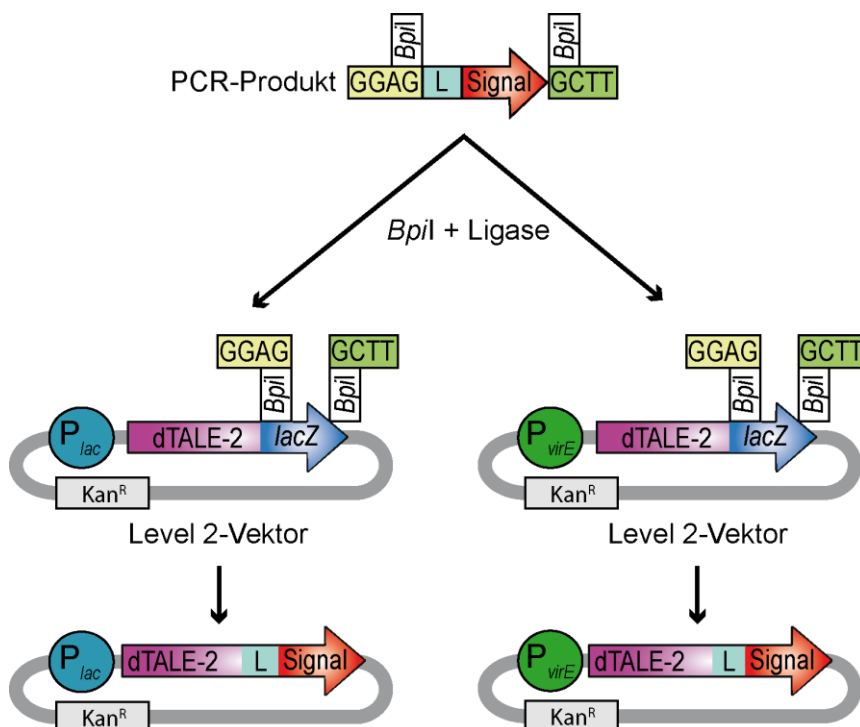
Auf der linken Seite der Abbildung befinden sich die verwendeten Vektoren in die die einzelnen Module kloniert wurden. Auf der rechten Seite ist die Klonierung der dTALE-2 $\Delta$ N-Konstrukte dargestellt. **A und B)** Die Level -1-Module enthalten Fragmente, die zur Assemblierung des dTALE-2 $\Delta$ N nötig sind. Dabei handelt es sich um die Codons 65-288 von dTALE-2 ( $\Delta$ N64), die zentrale „repeat“-Region (Rep 1, Rep2, Rep3) und den C-terminalen kodierenden Bereich von dTALE-2 (C-ter). Der N-terminal kodierende Bereich des dTALE-2 wurde durch ein *hrpB2*<sub>x-40</sub>-Fragment bzw. einen Linker, welcher zwei Lysine (KK) kodiert ersetzt (Signal, grün). Die entsprechenden Fragmente werden von *BpiI*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Die farbigen Rechtecke über den Restriktionsschnittstellen entsprechen den jeweiligen Nukleotidüberhängen, sodass eine gerichtete Assemblierung und anschließende Klonierung der Fragmente in den Level 0-Vektor ermöglicht wird. **C)** Je nach Art des Inserts (Promotor, GVI, Terminator) weist der Level 1-Vektor unterschiedliche Nukleotidüberhänge (NNNN) auf. Das Level 1-Modul pICH50422 enthält den *lac*-Promotor (*P<sub>lac</sub>*, blauer Kreis), während pICH50122 eine Terminatorsequenz (T, gelbes Viereck) enthält. Flankiert sind diese Fragmente von *BpiI*-Restriktionserkennungsstellen, deren Überhänge dabei so gewählt sind, dass sie einerseits zur kodierenden Sequenz (rotes und gelbes Rechteck) und andererseits zu den Überhängen des Level 2-Vektors passen (weißes Rechteck). Ausgehend vom Level 0-Modul wurden die dTALE-2 $\Delta$ N-Konstrukte in einer *Bsal*-„Golden Gate“-Reaktion in den Level 1-Vektor kloniert, welches von den Erkennungssequenzen der Typ IIs-Restriktionsenzyme *Bsal* und *BpiI* flankiert ist. Beide Restriktionsenzyme generieren, im Fall der kodierenden Sequenz den gleichen Überhang (GCAA/ACTA). **D)** Im finalen Klonierungsschritt werden die Level 1-Module zusammen mit dem Level 2-Vektor in einer *BpiI*-„Golden Gate“-Klonierung assembliert.

### Erstellung von dTALE-2-Reporterkonstrukten zur Analyse der T4-abhängigen Translokation von putativen T4S-Substraten

Die Auswahl der zu untersuchenden T4S-Substrate basierte auf den Vorhersagen von S4TE („Searching algorithm for type-IV secretion system effectors“, siehe Kapitel 2.2.6). Um zu analysieren, ob es sich bei den acht ausgewählten Proteinen (siehe Tabelle 3.3) um mögliche T4S-Substrate von *Xcv* handelt wurden DNA-Fragmente per PCR amplifiziert, welche den C-terminalen Proteinbereich der jeweiligen putativen T4S-Substrate kodieren. Der jeweilige „forward“-Primer fügte zusätzlich im 5'-Bereich des amplifizierten PCR-Produkts eine Linker-Region (L) an, welche die Aminosäuren GGGS kodiert (Abbildung 2.4). Die L-Region kann zwischen zwei Proteindomänen eine gewisse Flexibilität vermitteln.



Die Level 2-Vektoren, welche die kodierende Sequenz des dTALE-2 sowie ein stromabwärts gelegenes *lacZ*-Modul enthalten, wurden von S. Marillonnet zur Verfügung gestellt (Abbildung 2.4). Das *lacZ*-Modul ist von *Bpil*-Restriktionsschnittstellen flankiert und kodiert das *lacZ* $\alpha$ -Fragment. Die Klonierung der Fragmente, welche ein mögliches T4S-Signal kodieren erfolgte in den entsprechenden Level 2-Vektor mittels einer *Bpil*-„Golden Gate“-Reaktion (Abbildung 2.4). Die Hybridgene standen entweder unter der Kontrolle des *lac*- (blauer Kreis) oder des *virE*-Promotors (grüner Kreis). Potentiell positive Klone wurden mittels Blau-Weiß-Selektion ausgewählt und das entsprechende DNA-Fragment anschließend sequenziert. Die erstellten Expressionskonstrukte (siehe Tabelle 5.2) wurden in die T3-defizienten *Xcv*-Stämme 85-10 $\Delta$ *hrp* und 75-3 $\Delta$ *hrcV<sub>c</sub>* sowie in den *A. tumefaciens*-Stamm GV2260 elektroporiert (siehe Kapitel 2.2.1.10).



**Abbildung 2.4 Schematische Übersicht über die Erstellung von Reporterkonstrukten für die Analyse von Translokationssignalen ausgewählter T4S-Substrate.**

Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide wurden DNA-Fragmente per PCR amplifiziert, welche die C-terminalen 49 Aminosäuren von XCV3992, XCV0687, XCV4220 sowie XCV3492 kodieren (Signal, rot). Die entsprechenden PCR-Produkte werden von *Bpil*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Der jeweilige „forward“-Primer fügt zusätzlich im 5'-Bereich des amplifizierten PCR-Produkts eine Linker-Region (L) an, welche die Aminosäuren GGGG kodiert. Die L-Region kann zwischen zwei Proteindomänen eine gewisse Flexibilität vermitteln. Aus technischen Gründen wurden im Fall von XCV0160, XCV2208, XCV1697 und XCV0792 DNA-Fragmente amplifiziert, welche die C-terminalen 50 Aminosäuren kodieren. Die farbigen Rechtecke über der Restriktionsschnittstelle entsprechen den jeweiligen Nukleotidüberhängen, sodass eine gerichtete Klonierung in die Level 2-Vektoren ermöglicht wird. Das finale Hybridgen steht entweder unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (blauer Kreis) oder des *virE*-Promotors (grüner Kreis).

### Erstellung von *Xcv*-Deletionsmutanten

Zur Erstellung von *Xcv*-Deletionsmutanten wurde der Vektor pOK1 oder das „Golden Gate“-kompatible pOK1-Derivat pOGG2 verwendet (Huguet *et al.*, 1998, Schulze *et al.*, 2012).

Für die Generierung der *virB4*-Mutante wurde durch eine *Phusion*-PCR ein 810 bp und ein 581 bp großes DNA-Fragment amplifiziert, welches jeweils den flankierenden Bereich von

*virB4* darstellte. Dabei wurden mittels der verwendeten Oligonukleotide die Überhänge so gewählt, dass beide Teilfragmente zusammen in einer „Golden Gate“-Reaktion (*Bsal*) in den Suizidvektor pOGG2 kloniert werden konnten. Dieser Vektor besitzt ein *lacZ*-Gen, welches von *Bsal*-Restriktionsschnittstellen flankiert ist. Für Selektionszwecke besitzt pOGG2 neben einem Spectinomycin-Resistenzgen auch ein Gen, was für eine Levansucrase kodiert (*sacB*). *virB1* wurde zusammen mit *virB11* aus dem Genom von *Xcv* deletiert, da die ersten 14 bp von *virB1* mit dem 3'-Bereich von *virB11* überlappen. Mittels *Phusion*-PCR wurden ein 756 bp und ein 841 bp großes DNA-Fragment amplifiziert, welches jeweils den flankierenden Bereich von *virB1* bzw. *virB11* darstellte. Die weitere Klonierung in den Vektor pOGG2 erfolgte wie oben beschrieben.

Einige pOGG2-Konstrukte waren bereits vorhanden und konnten somit sofort zur Erstellung einer *Xcv*-Deletionsmutante genutzt werden. Die vorhandenen und generierten pOGG2-Konstrukte sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Die jeweiligen pOGG2-Konstrukte wurden in chemisch kompetente DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.8). Die Selektion von Transformanten erfolgte auf LB-Nähragarplatten, die Spectinomycin sowie X-Gal enthielten. Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert und die klonierten DNA-Fragmente anschließend sequenziert.

Um *Xcv*-Deletionsmutanten zu erzeugen wurde der Vektor pOK1 oder das „Golden Gate“-kompatible pOK1-Derivat pOGG2 mit dem jeweiligen Konstrukt mittels triparentaler Konjugation in *Xcv* übertragen. Die Selektion auf eine erfolgreiche Deletion eines oder mehrerer Gene basiert auf zwei Rekombinationsereignissen, welche wie in Hugué 1998 beschrieben durchgeführt wurde (Hugué *et al.*, 1998). Im ersten Rekombinationsereignis sollte es auf Grund der homologen Bereiche, zwischen dem jeweiligen Deletionskonstrukt und dem Chromosom bzw. einer der Plasmide von *Xcv* zur spezifischen Integration des Suizidplasmids kommen. Die Selektion der Konjugation erfolgte dabei auf NYG-Platten, die Rifampicin und Spectinomycin bzw. Rifampicin und 5 % Sucrose enthielten. In Gram-negativen Bakterien führt die Expression von *sacB* in Medien mit Sucrose zu einer Lysis der Zellen, was somit einen Hinweis auf eine erfolgreiche Integration des Suizidplasmids darstellt. Es wurden daher nur Transkonjuganten verwendet, welche auf Rifampicin und Spectinomycin nicht aber auf Rifampicin und 5 % Sucrose wuchsen. 10 Kolonien, welche die zuvor genannten Kriterien erfüllten wurden anschließend in 1 ml NYG resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf NYG-Platten mit Rifampicin und 5 % Sucrose plattiert. Durch diese Maßnahme sollte auf ein zweites Rekombinationsereignis selektiert werden, da nur die Zellen überleben, welche keine Plasmidsequenz (*sacB*) mehr enthalten. Im Idealfall rekombiniert in diesem zweiten Rekombinationsereignis die Region (welche deletiert werden soll) zwischen den zuvor klonierten homologen Bereichen zusammen mit dem Suizidplasmid aus dem Genom heraus. In 50 % der Fälle kann jedoch auch der Ausgangszustand wiederhergestellt werden. Zur Selektion wurden Klone, welche auf Rifampicin und 5 % Sucrose nicht jedoch auf Rifampicin und Spectinomycin wuchsen dreimal per Kolonie-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden getestet.

### Generierung von pBRNM

Da T4S-Substrate in der Regel ein C-terminales Exportsignal besitzen könnte ein c-Myc-Epitop die Erkennung oder Funktionalität des Proteins behindern. Auf Grund dieser Tatsache wurde ein neuer „Golden Gate“-kompatibler Vektor erstellt, welcher eine 3x *myc*-kodierende Sequenz stromaufwärts des zu klonierenden Gens von Interesse enthält. Für die Erstellung dieses Vektors wurde in einer *Phusion*-PCR mittels der Primer Esp-lacP-for und Esp-lacP-rev der *lac*-Promotor, mittels Esp-Myc-for und Esp-Myc-rev die 3xc-*myc*-kodierende Sequenz und mittels Esp-lacZ-for und Esp-lacZ-rev das *lacZ*-Gen (mit Stoppcodon) amplifiziert. Als Template wurde der Vektor pBRM verwendet. Die drei DNA-Fragmente wurden in den Vektor pICH41021 zwischenkloniert und anschließend sequenziert. Alle Fragmente wurden von *Esp3I*-Restriktionserkennungsstellen und spezifischen Nukleotidüberhängen flankiert, die eine gerichtete Assemblierung im Zielvektor ermöglichen. Die drei *Esp3I*-verdauten DNA-Fragmente wurden in den mit *EcoRI* und *HindIII* vorverdauten Zielvektor pBRM-P-Intermediat ligiert, was im Vektor pBRNM resultierte (Tabelle 5.2).

### Erstellung von Expressionskonstrukten zur Komplementation von *Xcv*-Deletionsmutanten

Zur Erstellung des *avrBs1*-Expressionskonstrukts wurde *avrBs1* mittels spezifischer Oligonukleotide vom Genom des *Xcv*-Stammes 85-10 mittels PCR amplifiziert und anschließend in den Vektor pBRM per „Golden Gate“-Klonierung kloniert (pBRM\_avrBs1).

Um zu überprüfen, ob *AvrBs1ΔN58* eine *avrBs1*-Mutante komplementieren kann wurde ein Linker, der zwei Lysine (KK) kodiert mittels „Primer-annealing“ (siehe 2.2.1.3) mit den Oligonukleotiden linker-156M-for und linker-156M-rev erstellt. Das resultierende DNA-Fragment wurde von *BsaI*-Restriktionsschnittstellen flankiert, sodass durch die entstehenden Überhänge (TATG/GATC) eine gerichtete Klonierung in den Vektor pBRM\_avrBs1ΔN58 erfolgen konnte (siehe Abbildung 2.2). Dies resultierte im Plasmid pBRM\_KK-avrBs1ΔN58.

Analog zu *avrBs1* wurde auch *virB4* mittels spezifischer Oligonukleotide via PCR amplifiziert und anschließend in einer „Golden Gate“-Reaktion in die Vektoren pBRM, pBRM(Stopp) und pBRNM kloniert. Der Vektor pBRM(Stopp) enthält ein Stoppcodon stromaufwärts der 3x *c-myc*-kodierenden Sequenz, sodass es zu keiner Expression dieses Epitops kommt. Alternativ wurde *virB4* in den Suizidvektor pLAND kloniert, welcher zur chromosomalen Integration von Genen in die *hpaF-hpaG*-Region von *Xcv* verwendet wird. Für die *hpaF-hpaG*-Region konnte bereits gezeigt werden, dass diese keinen Einfluss auf die Pathogenität von *Xcv* hat und somit als möglicher Integrationsort von Genen dienen kann (Lorenz *et al.*, 2012, Noël *et al.*, 2002, Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Der Vektor pLAND ist ebenfalls „Golden Gate“-kompatibel und ein pOK1-Derivat.

Für die Erstellung von Konstrukten zur Komplementation der *icmE*- und *dotCB*-Mutante wurde das MoClo-System verwendet. Dazu wurden der Promotor XCV0160, *icmE*, *dotCB* und die 3x *c-myc*-kodierende Sequenz separat mit spezifischen Oligonukleotiden per PCR amplifiziert und anschließend in Level 0-Vektoren mittels des Typ IIs-Restriktionsenzym *BpiI* zwischenkloniert. Die entstandenen Level 0-Module waren wiederum von *BsaI*-Restriktions-

erkennungsschnittstellen flankiert. Die 3x *c-myc*-kodierende Sequenz wurde im nächsten Klonierungsschritt mit der *icmE*- bzw. *dotCB*-kodierenden Sequenz in einer *BsaI*-„Golden Gate“-Reaktion assembliert und in den Level 1-Vektor pICH50251 zwischenkloniert. Das Level 0-Modul, welches die Promotorsequenz XCV0160 enthielt wurde in den Level 1-Vektor pICH47732 zwischenkloniert. Die jeweiligen Level 1-Module wurden zusammen mit einem End-Linker (pICH41744) in den Level 2-Vektor pICH45066 mittels des TIIIs-Restriktionsenzym *BpiI* kloniert. Dies resultierte in den Plasmiden pAGB042 und pAGB043 (siehe Tabelle 5.2).

Alternativ wurden *icmE* und *dotCB* per PCR amplifiziert und zusammen mit einem 201 bp großen Fragment, welches vermutlich den Promotor XCV0160 darstellt, in den Vektor pLAND-P kloniert. Die erhaltenen Expressionskonstrukte wurden in die korrespondierenden Deletionsmutanten via triparentaler Konjugation transferiert. Die Selektionsschritte zur chromosomalen Integration von Genen mittels der Suizidvektoren pLAND und pLAND-P erfolgte analog zu pOK1 bzw. pOGG2 (siehe Erstellung von *Xcv*-Deletionsmutanten).

### 2.2.1.8 Transformation von *E. coli*

Erstellte Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10 bzw. DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)) transformiert. Dazu wurde der Ligationsansatz (10  $\mu$ l) zu ca. 100  $\mu$ l chemisch kompetenter TOP10-Zellen pipettiert, welche zuvor auf Eis aufgetaut wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 40 Sekunden einem Hitzeschock (42 °C) ausgesetzt. Der Transformationsansatz wurde kurz auf Eis inkubiert und danach mit 200  $\mu$ l LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen anschließend auf selektiven LB-Platten plattiert, welche zusätzlich die für eine Blau-Weiß-Selektion notwendige Substanz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid) beinhalten. Am nächsten Tag wurden potentiell positive Klone mittels Kolonie-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide getestet. Alle klonierten und in *E. coli* transformierten DNA-Fragmente wurden durch die Firma GATC-Biotech sequenziert.

### 2.2.1.9 Triparentale Konjugation

Plasmide wurden mittels Triparentaler Konjugation von *E. coli*-Zellen (Donor) in *Xcv*-Zellen (Rezeptor) übertragen. Donor, Rezeptor und der *E. coli*-Helferstamm HB101 (Tabelle 5.1) wurden auf 1 %-igen NYG-Platten im Verhältnis von ca. 1:2:1 gemischt und anschließend über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das Plasmid des Helferstammes trägt die Tra-Region, welche essentiell für den Transfer ist. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 600  $\mu$ l NYG resuspendiert und 200  $\mu$ l dieser Suspension auf selektive NYG-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

### 2.2.1.10 Elektroporation von *Xcv* und *A. tumefaciens*

Eine weitere Möglichkeit Plasmide in *Xcv*-Zellen oder *Agrobacterium*-Zellen zu übertragen ist die Elektroporation. Im Fall von *Xcv* wurde der entsprechende Rezipientenstamm über Nacht auf selektivem NYG-Agarplatten plattiert. Ein Teil der Zellen wurde dann in NYG-Flüssigmedium über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurde die Menge an Zellen herunterzentrifugiert, um eine Kultur von 1 ml mit einer OD<sub>600</sub> von 1,0 zu erhalten. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml eiskaltem Wasser aufgenommen. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (8000 rpm, 4 min, 4 °C). Es folgten drei Waschschrte mit eiskaltem Wasser. Danach wurden die Zellen in 50 µl sterilem 10 %-igem (v/v) Glycerol resuspendiert. Für die Elektroporation wurden 50 - 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde in eine 2-mm-Elektroporationsküvette gefüllt und in dem „Micro Pulser™“ (BIO-RAD, München, Deutschland) bei U = 2,4 kV für t = 5,5 ms elektroporiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 600 µl NYG. Die Proben wurden ca. zwei Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert. 100 µl der Suspension wurden auf selektiven NYG-Agarplatten plattiert und bei 30°C für drei Tage inkubiert.

Aliquots einer 50 µl Suspension von *A. tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut. Für die Elektroporation wurden 2 µl Plasmid-DNA eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde in eine 2-mm-Elektroporationsküvette gefüllt und in dem „Micro Pulser™“ (BIO-RAD, München, Deutschland) bei U = 2,4 kV für t = 5,5 ms elektroporiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl NYG. Die Proben wurden ca. eine Stunde bei 30 °C schüttelnd inkubiert. 50 - 200 µl wurden auf selektiven NYG-Agarplatten plattiert und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert.

### 2.2.1.11 *Agrobacterium*-vermittelte transiente Proteinexpression *in planta*

Für die *Agrobacterium*-vermittelte Proteinexpression wurde das Fragment *avrBs1ΔN58-c-myc* vom Plasmid pBRM\_ *avrBs1ΔN58-c-myc* mittels der Oligonukleotide *avrBs1\_agro\_for* und *avrBs1myc\_agro\_rev* in einer PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Oligonukleotide wurde, neben *Bsal*-Restriktionsschnittstellen, der 5'-Überhang TATG und der 3'-Überhang GGTG (sowie ein Stoppcodon nach der 3x *c-myc*-kodierenden Sequenz) generiert. Das erhaltene Fragment wurde anschließend in einer *Bsal*-„Golden Gate“-Reaktion in den *Agrobacterium*-kompatiblen Vektor pGGA7 kloniert. Dies führte zum Expressionskonstrukt pGGA7\_ *avrBs1ΔN58*.

Für die Erstellung von *Agrobacterium*-kompatiblen *avrBs3*-Expressionskonstrukten wurden vorgefertigte „Golden Gate“-kompatible Module assembliert, die den N-terminalen Bereich (pJet1.2:N356), die „repeat“-Region (pJet1.2:rep-*avrBs3*), die AR-Region (pJet1.2:AR-*avrBs3*) und die C-terminale Region (pJet1.2:CTM-*avrBs3*) von *avrBs3* kodieren (Tabelle 5.2). Eine *Bsal*-„Golden Gate“-Reaktion mit den oben genannten Modulen in den *Agrobacterium*-kompatiblen Vektor pGGA3 resultierte im Konstrukt pGGA3\_ *avrBs3Δ2*.

Für die Assemblierung von pGGA3\_avrBs3<sub>1-10</sub>-avrBs3Δ2 und pGGA3\_avrBs3<sub>1-20</sub>-avrBs3Δ2 wurde das N-terminale Modul von *avrBs3* (Codon 153-288) erneut amplifiziert, um einen passenden 5'-Überhang zur anschließenden translationalen Fusion von *avrBs3*<sub>1-10</sub> bzw. *avrBs3*<sub>1-20</sub> zu generieren. Dies erfolgte mit den Oligonukleotiden AvrBs3dN152\_for und Hax-N-R-rev („template“: pJet1.2:N356). *avrBs3*<sub>1-10</sub> und *avrBs3*<sub>1-20</sub> lagen bereits als Modul zwischenkloniert in pUC57 vor. Die Module, welche AvrBs3<sub>1-10</sub> bzw. AvrBs3<sub>1-20</sub>, den N-terminalen Bereich von AvrBs3, die „repeat“-Region, die AR-Region und die C-terminale Region von *avrBs3* enthalten, wurden in einer „Golden Gate“-Reaktion assembliert und in den Vektor pGGA3 kloniert.

Die Expression der jeweiligen Hybridgene wurde vom 35S-Promotor gesteuert. Die erstellten Expressionskonstrukte wurden anschließend in den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 oder GV2260 elektroporiert.

### 2.2.1.12 Quantitative und Semiquantitative RT-PCR-Analysen

Nach einer erfolgreichen Translokation des Effektorproteins AvrBs3, in Blätter von ECW-30R- oder *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen kommt es zu einer Induktion im Transkriptgehalt von *UPA20* und *Bs3* (Kay *et al.*, 2007, Römer *et al.*, 2007). Um diese Genexpression nachweisen zu können wurden qRT-PCR- bzw. RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme 85\*, 85\*Δ*hrpF*, 85\*Δ*hrcN* und 85\*Δ*hrpF*Δ*xopA*, welche jeweils das Plasmid pBRM\_avrBs3 tragen sowie eine Mock-Kontrolle (MgCl<sub>2</sub>) in ECW-30R-Pflanzen und *Bs3*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von 4 x 10<sup>8</sup> KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Nach acht Stunden wurden pro Stamm 16 Blattscheiben (aus ECW-30R) und 12 Blattscheiben (aus *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*) mittels Korkbohrer (2 mm) geerntet. Die Blattscheiben wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem vorgekühlten Pistill erfolgte die Homogenisierung der Blattscheiben im Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte mittels des „RNeasy Plant Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Die Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA wurde zum einen mit dem NanoDrop® Spektrophotometer (ND-1000, Wilmington, USA) ermittelt und zum anderen wurde ein Teil der jeweiligen Probe in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese von jeweils 2 µg Gesamt-RNA, unter Verwendung der Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer und des „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ nach Herstellerangaben (Thermo Scientific).

Als Template für die qRT-PCR-Analysen wurde die cDNA 1:50 verdünnt und der „Absolute BlueSYBR Green Fluorescein Mix“ (Thermo Scientific) verwendet (siehe Tabelle 2.9). Durch eine stufenweise Erhöhung der Temperatur (50 °C - 100 °C, in 0,5 °C-Schritten für je 15 Sekunden) wurde eine Schmelzkurve erstellt, wodurch die Spezifität der Oligonukleotide überprüft wurde. Die PCR-Effizienzen für die verwendeten Oligonukleotide lagen bereits vor (A. Sorgatz und O. Müller).

Die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit dem „CFX Connect™ Real-Time System“ und dem „Bio-Rad CFX Manager™ 3.1“ (Bio-Rad). Zur Normalisierung wurden die Referenzgene Elongationsfaktor 1  $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) und Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolase (*UCH*) verwendet (Müller *et al.*, 2015, Römer *et al.*, 2007). Im Fall der RT-PCR-Analysen wurden 4  $\mu$ l einer 1:50 verdünnten cDNA als Template eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels spezifischer Oligonukleotide für *UPA20* und *Bs3* sowie der Referenzgene *EF1 $\alpha$*  und *UCH*. Zur Überprüfung einer möglichen DNA-Kontamination wurde eine Negativkontrolle in den RT-PCR-Analysen mitgeführt. Im Fall dieser sogenannten –RT-Kontrolle erfolgte die cDNA-Synthese ohne die reverse Transkriptase. Für die RT-PCR-Analyse wurde, wenn nicht anders angegeben ein Zyklus von 40 Wiederholungen gewählt.

**Tabelle 2.9 Reaktionsansatz und Bedingungen der qRT-PCR und RT-PCR**

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
<b>qRT-PCR</b>			
Absolute BlueSYBR Green Fluorescein	10 $\mu$ l	15 min	95 °C
Primer for + rev	2,8 $\mu$ l	15 s	95 °C
cDNA (1:50)	4 $\mu$ l	15 s	57 °C
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	25 s	72 °C
		10 s	95 °C
		15 s	50 °C
		15 s	100 °C
		$\infty$	4 °C
			In 0,5 °C-Schritten auf 100 °C erhöht
			50x Zyklen
<b>RT-PCR</b>			
10 x Taq-Puffer	2 $\mu$ l	1 min	95 °C
10 mM dNTPs	0,3 $\mu$ l	15 s	95 °C
100 mM Primer for	3 $\mu$ l	15 s	57 °C
100 mM Primer rev	3 $\mu$ l	30 s/kb	72 °C
1 U Taq-Polymerase	0,3 $\mu$ l	1 min	72 °C
DMSO	1,4 $\mu$ l	$\infty$	4 °C
cDNA (1:50)	4 $\mu$ l		
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l		
			23-41x Zyklen

## 2.2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.2.1 Protein-Extraktion aus *Xcv*

Für die Extraktion von Proteinen aus *Xcv* wurden die jeweiligen Stämme über Nacht auf NYG-Agarplatten (mit entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Stämme als Flüssigkultur in NYG-Medium über Nacht bei 30 °C angezogen. Am Folgetag wurde die optische Dichte bei 600 nm mittels Photometer bestimmt. Die Zelldichte wurde anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 in 4 ml NYG-Medium eingestellt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für eine Stunde in einem Rotator bei 30 °C. Nach der Inkubationszeit wurde erneut die OD<sub>600</sub> gemessen. 500  $\mu$ l der Kultur wurden pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50  $\mu$ l 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert. Abschließend erfolgte das Kochen der Proben für fünf Minuten im Wasserbad. Angepasst an die jeweilige OD<sub>600</sub> der Kulturen wurden gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.2.3).

### 2.2.2.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in einer vertikalen Apparatur für Mini-Gele (Mighty Small II, Amersham Pharmacia Biotech AB, San Francisco, USA). Verwendet wurden 4 %-ige Sammelgele und 10 %-ige bzw. 15 %-ige Trenngele. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (10 %)**

Komponente	Trenngel (30 ml)	Sammelgel (15 ml)
H <sub>2</sub> O	11,9 ml	9 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	7,5 ml	3,75 ml <sup>1</sup>
30 % (v/v) Acrylamid	10 ml	2 ml
10 % (w/v) SDS	0,3 ml	0,15 ml
10 % (w/v) APS	0,3 ml	0,15 ml
Temed	0,012 ml	0,009 ml

Tris-HCl- Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid, SDS-Natriumdodecylsulfat, TEMED-Tetramethylethyldiamin ; APS- Ammoniumpersulfat

<sup>1</sup> Für das Sammelgel wurde 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 verwendet

Als Laufpuffer der SDS-PAGE diente 1 x Tank. Die Proteinproben wurden bei konstanter Spannung von 130 V und einer Stromstärke von 400 mA aufgetrennt. Als Marker wurden 3,5 µl des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas GmbH, Deutschland) parallel zu den Proben aufgetrennt. Die aufzutragenden Proteinmengen wurden entsprechend der Bakteriendichte der Flüssigkultur angepasst.

### 2.2.2.3 Western-Blot

Nachdem die Proteinproben aufgetrennt wurden erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine mittels Western-Blot (Sambrook *et al.*, 1989). Durch ein Tank-Blot-Verfahren wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 95 V, 400 mA und 4 °C für eineinhalb Stunden. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran in Blockier-Lösung für mindestens eine halbe Stunde (bei leichtem Schütteln) inkubiert um freie Bindungsstellen auf der Oberfläche abzusättigen. Anschließend wurde die Membran einmal für fünf Minuten in 1 x TBST gewaschen und danach mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.5) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschriffe in 1 x TBST bevor der sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 2.5) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben worden ist. Nach erneuten drei Waschschriffen wurde mittels ECL-Verfahren („enhanced chemiluminescence“) der sekundäre Antikörper (und somit indirekt das Protein von Interesse) nachgewiesen (Protokoll nach Amersham Pharmacia Biotech). Dafür wurde die Membran in ECL-Lösung (siehe Tabelle 2.1) inkubiert und anschließend auf einen Film (Kodak BioMax Light Film, Rochester, USA) aufgelegt. Der Film wurde im Anschluss mittels Entwicklerlösung (Kodak) entwickelt und abschließend mittels Fixierlösung (Kodak) fixiert.



### 2.2.3 *In vitro*-Sekretionsanalysen

Mit Hilfe von *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde die T3-abhängige Sekretion von Proteinen durch *Xcv* untersucht. Die Bedingungen für diesen Assay wurden leicht modifiziert nach Rossier *et al.*, 1999 durchgeführt. Dabei wurde der Stamm 85\* oder Derivate von diesem verwendet. 85\*-Stämme exprimieren die *hrp*-Gene konstitutiv, was auf eine mutierte Form von *hrpG* (*hrpG\**) zurückzuführen ist. *Xcv*-Stämme wurden in 4 ml MA-Medium (pH 7,0) über Nacht kultiviert. Danach erfolgte der Transfer in MA-Medium (pH 5,2) mit Zugabe von 10 µg/ml Thiamin (Serva, Heidelberg) sowie 50 mg/ml gereinigtem BSA (New England Biolabs). Die Zelldichte wurde dabei, wenn nicht anders angegeben auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 eingestellt. Danach erfolgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden in einem Rotator bei 30 °C. Anschließend wurden 500 µl von der Kultur pelletiert und als Gesamtextrakt (GE) in 50 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert. Der Rest der Kultur wurde durch einen proteindurchlässigen Filter (0,45 µm HT Tuffryn-Membran, Acrodisc 25 mm Syringe Filter, Pall GmbH, Dreieich, Deutschland) in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorgefäß mit 200 µl Trichloressigsäure (TCA) filtriert. Die sekretierten Proteine wurden für 30 Minuten in TCA auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Proteine pelletiert (10 min, 14000 rpm, 4 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurde den Proben 100 %-iger eiskalter EtOH (-20 °C) zugegeben und erneut zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen (ÜS = Überstand). Alle Proteinextrakte wurden fünf Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Danach erfolgte die Auftrennung äquivalenter Proteinmengen mittels SDS-PAGE.

### 2.2.4 Infiltration von Bakterien in Paprika- bzw. Tabakblätter

Für die Inokulation von Paprika- bzw. Tabakblättern wurden zunächst die jeweiligen *Xcv*- oder *A. tumefaciens*-Stämme auf selektiven NYG-Agarplatten angezogen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 1 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die bakterielle Dichte wurde am Photometer eingestellt. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> von 0,1 einer bakteriellen Dichte von ca. 10<sup>8</sup> KBE ml<sup>-1</sup>. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit einer nadellosen Einwegspritze in die Blattunterseite der jeweiligen Pflanzen infiltriert. Die Reaktion der Pflanze wurde fotografisch dokumentiert. Die Hypersensitive Reaktion in resistenten Paprika- oder Tabakpflanzen wurde mittels Bleichen der Blätter in 70 %-igem EtOH (bei 65 °C) verdeutlicht.

### 2.2.5 *In planta* Wachstumskurven

Zur Analyse des Wachstums der Bakterien *in planta* wurden die jeweils verwendeten *Xcv*-Stämme mit einer bakteriellen Dichte von 10<sup>4</sup> KBE ml<sup>-1</sup> in drei Blätter von drei verschiedenen ECW-Pflanzen infiltriert. Die Probenentnahme erfolgte mit einem Korkbohrer (Blattscheibendurchmesser entsprach 0,3 cm<sup>2</sup>). Blattscheiben wurden anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl 1 mM MgCl<sub>2</sub> sowie einer Stahlkugel überführt. Der

Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer Schwingmühle (MM300, Retsch, Haan, Deutschland) bei 30 Hz für 30 Sekunden. Die Bakteriensuspensionen wurden mit verschiedenen Verdünnungen auf NYG-Platten, welche Rifampicin und Cycloheximid enthielten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Danach wurden die Kolonien gezählt und der Mittelwert der koloniebildenden Einheiten pro cm<sup>2</sup> berechnet.

### **2.2.6 *In silico*-Analysen zur Identifizierung potentieller T4S-Substrate in *Xcv* mittels S4TE**

„Searching algorithm for type-IV secretion system effectors“ (S4TE) ist ein bioinformatisches Analyseprogramm und bietet die Möglichkeit potentielle Substrate des T4S-Systems in  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien *in silico* zu ermitteln (Meyer *et al.*, 2013). Mit Hilfe von S4TE wurden in dieser Arbeit *in silico*-Analysen zur Identifizierung möglicher T4S-Substrate in *Xcv* durchgeführt. Die Durchführung der Analyse erfolgte zusammen mit dem Informatiker Martin Knoth. Um das Genom von *Xcv* mittels S4TE analysieren zu können, benötigt das Programm eine Genomdatenbank, bestehend aus vier verschiedenen Dateien (genome.nucl, genome.an, genome.prot und genome.csv). Im Fall von genome.nucl handelte es sich um die gesamte Genomsequenz des *Xcv*-Stammes 85-10 (Chromosom sowie die vier Plasmide pXCV183, pXCV19, pXCV2 und pXCV38) im FASTA-Format. Genome.an beinhaltet die „gene ID“, die Position des ersten und letzten Nukleotids einer kodierenden Sequenz und die Information, ob sich ein Gen auf dem „sense“- oder „anti-sense“-Strang befand. Aus der Datei genome.prot, welche alle Proteinsequenzen des untersuchten Genoms beinhaltet wurde im Anschluss mit Hilfe von nomprot.pl die Datei genome.csv generiert. Nach erfolgreicher Generierung der Datenbank wurde das Programm S4TE.pl für die dann folgende Effektorsuche gestartet. Das Programm S4TE beinhaltet 10 unabhängige Module, um 13 charakteristische Sequenzeigenschaften (13 Suchparameter) von T4S-Substraten untersuchen zu können. Modul 1 diente der Untersuchung des RS-TY-Konsensusmotivs (Suchparameter 1), das aus 10 Nukleotiden besteht und in 14 Promotoren von T4-Effektoren gefunden wurde (Meyer *et al.*, 2013). Bei dem Motiv handelt es sich um drei Purine (R), eine der starken Basen G oder C (S), einem beliebigen Nukleotid (A, T, G, C), vier Thyminen (T) und einem Pyrimidin (Y). Das Modul 1 extrahiert die 300 stromaufwärts des Startcodons liegenden Nukleotide und analysiert diese im Hinblick auf das RS-TY-Konsensusmotiv. Mit Hilfe des 2. Moduls wurde die jeweilige Proteinsequenz mittels BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) analysiert, um so Homologien zu bereits bekannten T4-Effektoren zu identifizieren (Suchparameter 2). Dabei wurden bereits publizierte T4-Effektoren (Chen *et al.*, 2010, Gomez-Valero *et al.*, 2011) mit dem von S4TE untersuchten Proteom verglichen. Es wurde dabei ein E-Wert von  $E < 0,01$  verwendet. Insgesamt fünf Module suchten im Proteom von *Xcv* nach jeweils sechs spezifischen Domänen. Modul 3 diente dabei der Suche nach eukaryotisch- und prokaryotisch-ähnlichen Domänen (Suchparameter 3 und 4). Dabei bezog sich die Motivsuche auf einen Vergleich mit 58 eukaryotisch-ähnlichen und 3617 prokaryotisch-ähnlichen Domänen, welche

bisher in T4-Effektoren identifiziert worden sind (Meyer *et al.*, 2013, Prakash *et al.*, 2011). Der Abgleich erfolgte mit der Pfam („Protein families“)-Datenbank. Das 4. Modul diente der Identifizierung von Kernlokalisierungssignalen (NLS), welche dazu führen, dass Proteine in den Zellkern von eukaryotischen Zellen transportiert werden können (Hicks und Galan 2013) (Suchparameter 5). Das Sequenzmotiv basiert dabei auf dem „Hidden Markov“-Modell von Ba *et al.*, 2009. Mittels Modul 5 wurde nach möglichen Mitochondrienlokalisierungssignalen (MLS) im N-terminalen Bereich des Proteins gesucht (Suchparameter 6) (Claros 1995). Verwendet wurden nur MLS mit  $P > 0,95$ . Die Proteininstabilität wird unter anderem durch permanente posttranslationale Modifikationen gewährleistet, die durch eine Prenylierung erreicht werden (Hicks und Galan 2013). Diese Prenylierung erfolgt an dem C-terminal konservierten Aminosäuresequenzmotiv CaaX (C, Cystein; a, entspricht einer aliphatischen Aminosäure; X, entspricht einer beliebigen Aminosäure) (Al-Quadani *et al.*, 2011), welches durch Modul 6 identifiziert wurde (Suchparameter 7). Das 7. Modul suchte nach „coiled coil“-Strukturen in den Kandidatenproteinen (Suchparameter 8). Für die Suche von „coiled-coil“-Domänen wurde die „pepcoil“-Software des Emboss-Packets (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepcoil>) verwendet ( $P > 0,95$ ). Drei Module dienten der Suche nach fünf spezifischen Sekretions- und Translokationscharakteristika in T4S-Substraten. So analysierte das Modul 8 die Kandidatenproteine nach basischen Aminosäuren (H, R, K) in den C-terminalen 25 Aminosäuren (Suchparameter 9) und im Hinblick auf einen positiv geladenen C-terminalen Bereich (Suchparameter 10) (Niu *et al.*, 2010, Rikihisa und Lin 2010, Vergunst *et al.*, 2005). In  $\alpha$ -Proteobakterien haben alle bekannten T4-Effektoren drei oder mehr basische Aminosäuren in den C-terminalen 25 Aminosäuren des Proteins. Diese Beobachtung wurde deswegen als Grenze verwendet, um Kandidatenproteine als positiv zu bewerten. Um die C-terminale Ladung eines Proteins zu berechnen, wurden alle positiv geladenen Aminosäuren (H, R, K) addiert und von diesen dann alle negativ geladenen Aminosäuren (E, D) sowie die negative C-terminale Ladung subtrahiert (die Berechnung beschränkt sich auf die C-terminalen 25 Aminosäuren des Proteins). Dabei sollte die C-terminale Ladung eines Proteins  $\geq 2$  sein, um als positiv eingestuft zu werden. Das 9. Modul analysierte dagegen die Hydrophobizität im C-terminalen Bereich (Suchparameter 11) und Hydrophilizität des gesamten Proteins (Suchparameter 12). Dafür wurde die „Kyte-Doolittle“-Skala verwendet (Kyte und Doolittle 1982). Diese Skala besagt, dass je hydrophober ein Aminosäurerest ist, desto höher ist der Hydropathie-Wert ( $> 0$ ). Die meisten bekannten T4-Effektoren sind hydrophil, haben also einen negativen Hydropathie-Wert (Lockwood *et al.*, 2011, Nagai *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2011). Deswegen wurde als Grenzwert in der Analyse des zu analysierenden Proteoms ein Wert von  $< -200$  verwendet. Für Suchparameter 11 wurde nach hydrophoben Aminosäureresten an der 3. und 4. Position vom C-Terminus aus gesehen gesucht. Das 10. und damit letzte Modul scannte das Protein nach einer „E-block“-Domäne, welche aus einer Glutaminsäure-reichen Sequenz (EEXXE), in den C-terminalen 30 Aminosäuren des Proteins besteht und vermutlich wichtig für die Translokation ist (Suchparameter 13) (Huang *et al.*, 2011).

Nach erfolgreichem Programmdurchlauf generierte S4TE eine Rangliste aller putativen T4S-Kandidaten entsprechend einer Erfolgswahrscheinlichkeit. Ob ein potentielles T4S-Substrat in der Rangliste weit vorn steht, also mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich ein T4S-Substrat sein könnte, hängt von der Anzahl der vorhandenen Sequenzeigenschaften in dem jeweiligen Gen/Protein ab. Je mehr der zuvor beschriebenen Suchparameter in dem jeweiligen Gen/Protein übereinstimmen, desto höher wird das Gen/Protein in der Rangliste eingestuft. Zu beachten ist, dass es sich bei den durch S4TE vorgeschlagenen T4-Effektor-Kandidaten zum Teil um Falsch-Positive (FP) Kandidaten handeln könnte. Nachdem jedem putativen T4S-Substrat eine bestimmte Kombination an Suchparametern zugeordnet wurde, erstellte das Programm zwei weitere Leistungsindizes. Basierend auf einem Datensatz von 275 bekannten T4-Effektoren aus *L. pneumophila* (Stamm Philadelphia) wurden die jeweiligen Module so angepasst, dass sie den bestmöglichen Vorhersagewert für Richtig-Positive (RP) Kandidaten ermittelten. Der erste generierte Leistungsindex war der sogenannte Empfindlichkeitsindex für *Legionella* ( $SI_L$ , „sensitivity index for *Legionella*“). Die Berechnung von  $SI_L$  lautet  $SI_L = \frac{RP}{RP+FP}$  und liegt im Bereich von 0 bis 1.  $SI_L$  gibt Auskunft in welchem Verhältnis Richtig-Positive Kandidaten, mit derselben Kombination an Sequenzeigenschaften bereits in *L. pneumophila* gefunden wurden. Der zweite generierte Leistungsindex wurde als Positivitätsindex für *Legionella* ( $PI_L$ , „positivity index for *Legionella*“) durch die Formel  $PI_L = \frac{RP-FP}{FP}$  definiert. Er beschreibt den Nettoertrag der Richtig-Positiven und setzt diese ins Verhältnis zu den Falsch-Positiven. Der  $PI_L$ -Wert liegt zwischen -1 bis 10. Die Vorauswahl der Kandidaten erfolgte demnach anhand der Anzahl der identifizierten Sequenzeigenschaften und anhand des  $SI_L$ -Werts, welcher möglichst nah bei 1 liegen sollte und des  $PI_L$ -Werts, welcher möglichst nah bei 10 liegen sollte. Eine Ausnahme könnten Kandidaten sein, die einen  $SI_L$ - und  $PI_L$ -Wert von 0 haben. Solch eine Kombination an Sequenzeigenschaften wurde in T4-Effektoren von *L. pneumophila* bisher nicht nachgewiesen, sodass es sich hierbei um neue Effektoren handeln könnte, die nicht den bisher bekannten T4-Effektoren entsprechen. Um die enorme Anzahl von möglichen T4S-Substraten weiter einzugrenzen wurden nur diejenigen Kandidaten ausgewählt, die mindestens fünf spezifische Sequenzeigenschaften aufwiesen. Die durch S4TE berechneten Vorhersagen waren und sind kein Beweis dafür, ob es sich tatsächlich um T4S-Substrate handelt, sondern dienen lediglich einer Vorauswahl der Kandidaten, die später experimentell untersucht werden sollten. Basierend auf den Resultaten des Programmes wurde eine experimentelle Validierung der erfolgsversprechendsten Proteine mittels des dTALE-2-Reporterproteins durchgeführt (siehe 2.2.1.7).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse von T3S- und Translokationssignalen ausgewählter Substrate des T3S-Systems von *Xcv* unter Verwendung des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters

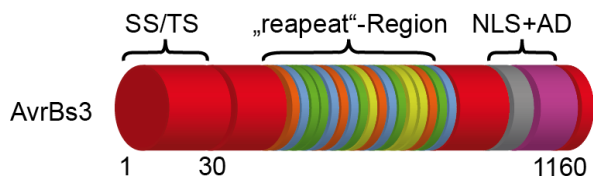
T3S- und Translokationssignale von Effektor- und Nicht-Effektorproteinen können mit Hilfe von Reporterproteinen identifiziert und analysiert werden. Zur Analyse der Exportsignale des Effektorproteins AvrBs3, des putativen Translokonproteins XopA und des putativen „inner rod“-Proteins HrpB2, wurden die Reporterproteine AvrBs3 $\Delta$ 2 und AvrBs1 $\Delta$ N58 (Kapitel 3.2) verwendet. AvrBs3 $\Delta$ 2 ist ein N-terminales Deletionsderivat des TAL-Effektors AvrBs3. Dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter fehlen die Aminosäuren 2-152 und damit ein funktionales T3S- und Translokationssignal (Szurek *et al.*, 2002). Ist der AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter in translationaler Fusion mit einem funktionalem T3S- und Translokationssignal, kann dieses Fusionsprotein durch das T3S-System von *Xcv* in die Pflanzenzelle übertragen werden. Mit Hilfe der Kernlokalisierungssignale in AvrBs3 $\Delta$ 2 wird das Fusionsprotein anschließend in den pflanzlichen Zellkern transportiert (Gürlebeck *et al.*, 2005, Szurek *et al.*, 2002). Resistente Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R besitzen das *B3*-Resistenzgen, das eine Flavinmonooxygenase kodiert (Römer *et al.*, 2007). Durch die Bindung von AvrBs3 $\Delta$ 2 an die Promotorregion von *Bs3*, wird die Transkription von *Bs3* initiiert, was zu einer HR im Infektionsbereich führt (Römer *et al.*, 2007). Die hypersensitive Reaktion (HR) ist somit der Indikator für eine Translokation des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters.

##### 3.1.1 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in AvrBs3

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass das T3S-Signal von AvrBs3 in den N-terminalen 50 Aminosäuren und das Translokationssignal in den N-terminalen 200 Aminosäuren des Proteins lokalisiert ist (Büttner *et al.*, 2004, Noël *et al.*, 2003). Weiterführende Studien haben gezeigt, dass in einem *Xcv*-Wildtypstamm die N-terminalen 50 Aminosäuren und in einer *hpaB*-Mutante die N-terminalen 30 Aminosäuren von AvrBs3 hinreichend für eine Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2 sind (D. Büttner, unpubliziert) (Abbildung 3.1.1).

Um den Sequenzbereich, welcher essentiell für die T3S bzw. Translokation von AvrBs3 ist, weiter einzugrenzen, wurden translationale Fusionen zwischen den N-terminalen 10 und 20 Aminosäuren von AvrBs3 mit dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter erstellt. Die erhaltenen *avrBs3*<sub>1-x</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2-Expressionskonstrukte wurden mittels triparentaler Konjugation in den *Xcv*-Stamm 85-10*hrpG*<sup>\*</sup> (85<sup>\*</sup>) transferiert. 85<sup>\*</sup> ist ein Derivat des *Xcv*-Wildtypstammes 85-10 mit einer Punktmutation im Transkriptionsregulator HrpG (HrpG<sup>\*</sup>), was zu einer konstitutiven Expression des *hrp*-Genclusters führt (Wengelnik *et al.*, 1999). Die konstitutive Expression des *hrp*-Genclusters erlaubt die *in vitro*-Analyse der T3-abhängigen Sekretion von T3S-Substraten (Rossier *et al.*, 1999). Die Sekretion und Translokation von AvrBs3<sub>1-10</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 und AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 wurde weiterhin im Stamm 85<sup>\*</sup> $\Delta$ *hpaB* analysiert, um den Einfluss des T3S-

Chaperons auf den Export der Fusionsproteine zu untersuchen. Die zu Beginn der Arbeit vorhandenen Stämme  $85^*$  und  $85^*\Delta hpaB$ , welche die Expressionskonstrukte  $avrBs3_{1-30}-avrBs3\Delta 2$ ,  $avrBs3_{1-40}-avrBs3\Delta 2$  oder  $avrBs3_{1-50}-avrBs3\Delta 2$  enthalten, wurden in den folgenden Experimenten vergleichend mitgeführt.

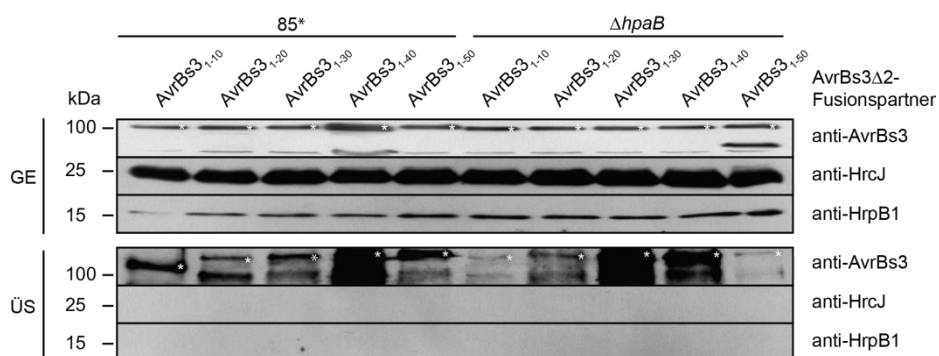


**Abbildung 3.1.1 Schematische Darstellung des TAL-Effektors AvrBs3.** Das T3S-Signal (SS) und Translokationssignal (TS) befindet sich in den N-terminalen 30 Aminosäuren. Es ist nicht bekannt, ob das SS und TS gemeinsam im Protein vorliegen. Im Zentrum befindet sich die „repeat“-Region. C-terminal sind die Kernlokalisierungssignale (NLS, grau) sowie die Aktivierungsdomäne (AD, lila). Die Zahlen stehen für die Aminosäuren des Proteins.

### AvrBs3 enthält ein funktionales T3S-Signal in den N-terminalen 10 Aminosäuren

Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden alle Stämme in Minimal (MA)-Medium angezogen (siehe Kapitel 2.2.3). Anschließend wurden die Überstände von den Bakterien durch Filtration getrennt. Sowohl die Überstände als auch die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot, unter Verwendung verschiedener Antikörper analysiert.

Alle  $AvrBs3_{1-x}-AvrBs3\Delta 2$ -Fusionsproteine wurden im Gesamtzellextrakt sowie im Überstand des  $85^*$ - und  $85^*\Delta hpaB$ -Stammes mittels AvrBs3-spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.1.2). Da die Effizienz der Sekretion der Fusionsproteine in verschiedenen Experimenten variierte, kann keine Aussage über den Einfluss des T3S-Chaperons auf die Sekretion getroffen werden. Die Sekretion der  $AvrBs3_{1-x}-AvrBs3\Delta 2$ -Fusionsproteine ist vermutlich nicht auf eine Lysis der Zellen zurückzuführen, da weder das innere Membranprotein HrcJ, noch das periplasmatische Protein HrpB1 im Überstand detektiert wurden (Abbildung 3.1.2). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aminosäuren 1 - 10 von AvrBs3 ein funktionales T3S-Signal enthalten. Zudem wird die Sekretion nicht wesentlich durch T3S-Chaperon HpaB beeinflusst.



**Abbildung 3.1.2 Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 vermitteln die Sekretion von AvrBs3 $\Delta 2$ .**

Die Stämme  $85^*$  und  $85^*\Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ), welche die in der Abbildung dargestellten  $AvrBs3_{1-x}-AvrBs3\Delta 2$ -Derivate synthetisierten, wurden in MA-Medium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Überstände (ÜS) wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-, HrcJ- und HrpB1-spezifischen Antikörpern untersucht. Das mit einem Stern (\*) markierte Signal entspricht dem jeweiligen  $AvrBs3_{1-x}-AvrBs3\Delta 2$ -Fusionsprotein, während die darunter liegenden Signale vermutlich Abbauprodukte des Fusionsproteins sind. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### Die N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 sind nicht hinreichend für eine Translokation von AvrBs3Δ2

Für die *in vivo*-Translokationsanalysen wurden alle Stämme in Blätter von Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R infiltriert. Der Stamm 85\*, der AvrBs3 oder AvrBs3<sub>1-50</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierte, löste eine AvrBs3-spezifische HR in Blättern von ECW-30R-Pflanzen aus (Abbildung 3.1.3 A). Dies bestätigt, dass die N-terminalen 50 Aminosäuren von AvrBs3 ein funktionales Translokationssignal enthalten (D. Büttner, unpubliziert). Nach der Infiltration des 85\*-Stammes, welcher die Fusionsproteine AvrBs3<sub>1-10</sub>-, AvrBs3<sub>1-20</sub>-, AvrBs3<sub>1-30</sub>- oder AvrBs3<sub>1-40</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierte, konnte hingegen keine sichtbare Reaktion in Blättern von ECW-30R-Pflanzen festgestellt werden (Abbildung 3.1.3 A).

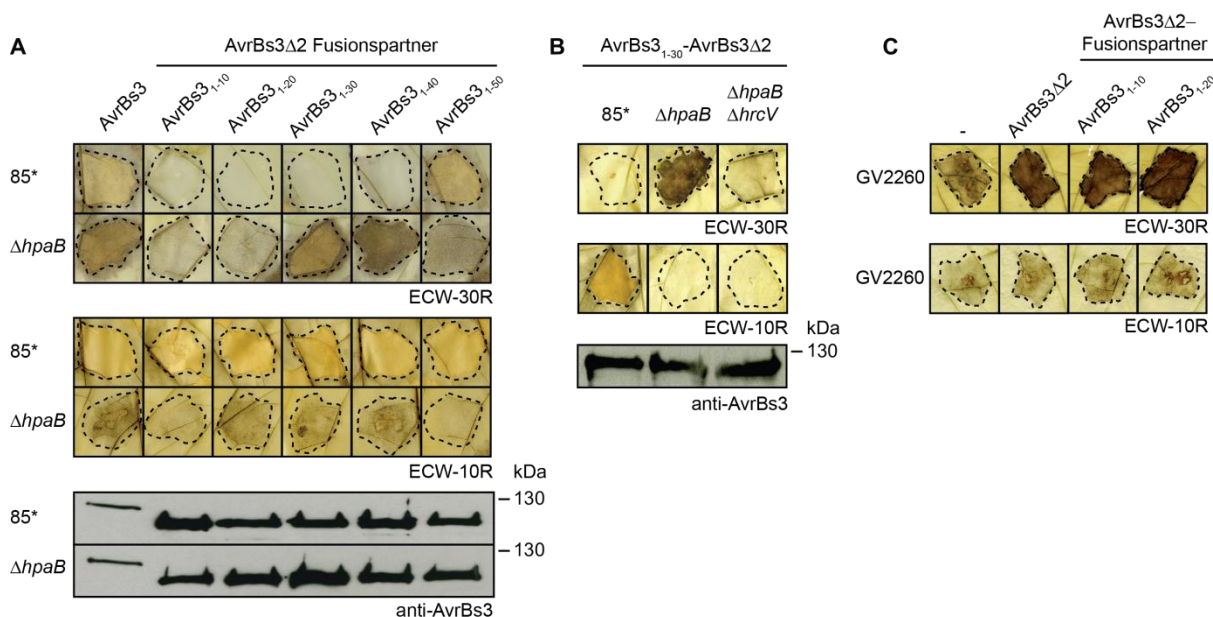
85\*Δ*hpaB* translozierte wie erwartet die Fusionsproteine AvrBs3<sub>1-30</sub>- und AvrBs3<sub>1-40</sub>-AvrBs3Δ2 (D. Büttner, unpubliziert), was zu einer HR in Blättern von ECW-30R-Pflanzen führte (Abbildung 3.1.3 A). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Stamm 85-10Δ*hpaB*, der AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierte, beobachtet (D. Büttner, unpubliziert). Daher ist die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 nicht generell auf die konstitutive Expression des *hrp*-Genclusters zurückzuführen. Im Vergleich zu AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2, wurde AvrBs3<sub>1-50</sub>-AvrBs3Δ2 durch eine *hpaB*-Mutante stark reduziert transloziert, was sich in einer schwächeren HR im Infektionsbereich auf ECW-30R-Blättern gezeigt hat (Abbildung 3.1.3 A). Keine sichtbare HR wurde nach Infiltration der 85\*Δ*hpaB*-Stämme, welche die Fusionsproteine AvrBs3<sub>1-10</sub>- und AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierten beobachtet (Abbildung 3.1.3 A). Demnach ist in den N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 vermutlich kein funktionales Translokationssignal enthalten.

Um zu überprüfen, ob die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 vom T3S-System abhängig ist, wurde das Fusionsprotein im Stamm 85\*Δ*hpaB*Δ*hrcV* analysiert. HrcV ist eine konservierte Komponente des T3S-Systems und essentiell für die T3-abhängige Proteintranslokation von Xcv (Hartmann und Büttner 2013, Rossier *et al.*, 1999). Die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 war T3-abhängig, da das Fusionsprotein nicht durch den Stamm 85\*Δ*hpaB*Δ*hrcV* transloziert wurde und es somit zu keiner HR in Blättern von ECW-30R-Pflanzen kam (Abbildung 3.1.3 A). Insgesamt lassen die Ergebnisse der Translokationsanalysen vermuten, dass AvrBs3 ein funktionales Translokationssignal in den ersten 30 Aminosäuren besitzt.

Um zu überprüfen, ob die Fusionsproteine einen negativen Einfluss auf das T3S-System haben, wurden alle Stämme in Blätter von ECW-10R-Pflanzen infiltriert, wodurch eine AvrBs1-spezifische HR ausgelöst werden sollte, die auf die Erkennung von AvrBs1 zurückzuführen ist (Escolar *et al.*, 2001, Ronald und Staskawicz 1988). Die Infiltration der 85\*-Stämme, die das jeweilige *avrBs3<sub>1-x</sub>-avrBs3Δ2*-Expressionskonstrukt enthielten, führte zu einer HR in ECW-10R-Blättern, die vergleichbar mit der HR eines Wildtypstammes war (Abbildung 3.1.3 A und B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *avrBs3<sub>1-x</sub>-avrBs3Δ2*-Expressionskonstrukte keinen negativen Einfluss auf die generelle T3S ausüben. Die 85\*Δ*hpaB*Δ*hrcV*- bzw. 85\*Δ*hpaB*-Stämme lösten dagegen keine oder eine im Vergleich zu 85\* reduzierte AvrBs1-spezifische

HR aus (Abbildung 3.1.3 A und B). Es wurde bereits gezeigt, dass die Translokation von AvrBs1 vom T3S-Chaperon HpaB abhängig ist (Szczesny *et al.*, 2010).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass AvrBs3<sub>1-10</sub>- und AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs3Δ2 aufgrund einer Falschfaltung nicht mehr in der Lage waren eine AvrBs3-spezifische HR in ECW-30R-Pflanzen auszulösen, wurden *avrBs3*<sub>1-10</sub>- und *avrBs3*<sub>1-20</sub>-*avrBs3*Δ2 mittels *A. tumefaciens* in das Genom von Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R- und ECW-10R integriert. Das Hybridgen *avrBs3*<sub>1-x</sub>-*avrBs3*Δ2 wurde unter der Kontrolle des 35S-Promotors, der in Pflanzen konstitutiv aktiv ist, exprimiert. Die Infiltration des *A. tumefaciens*-Stammes GV2260, ohne Expressionskonstrukt, löste eine Dunkelfärbung des Blattgewebes in ECW-30R- und ECW-10R-Blättern aus (Abbildung 3.1.3 C). Die transiente Expression von *avrBs3*<sub>1-10</sub>-*avrBs3*Δ2 und *avrBs3*<sub>1-20</sub>-*avrBs3*Δ2 in Blättern von ECW-30R-Pflanzen, führte dagegen zu einer HR (Abbildung 3.1.3 C). Diese HR war AvrBs3-spezifisch, da die transiente Expression von *avrBs3*<sub>1-10</sub>-*avrBs3*Δ2 und *avrBs3*<sub>1-20</sub>-*avrBs3*Δ2 zu keiner HR in Blättern von ECW-10R-Pflanzen führte (Abbildung 3.1.3 C).



**Abbildung 3.1.3 Identifizierung eines T3S- und Translokationssignals in AvrBs3.**

**A)** Die N-terminalen 30 Aminosäuren von AvrBs3 enthalten ein funktionales Translokationssignal. Die Stämme 85\* und 85\*ΔhpaB (ΔhpaB), welche AvrBs3Δ2 oder die in der Abbildung dargestellten AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs3Δ2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 2-3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Gleiche Mengen an Zellextrakt wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern analysiert.

**B)** Die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 durch den Stamm 85\*ΔhpaB ist vom T3S-System abhängig. Die Stämme 85\*, 85\*ΔhpaB (ΔhpaB) und 85\*ΔhpaBΔhrcV (ΔhpaBΔhrcV), welche AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierten, wurden wie in A beschrieben infiltriert.

**C)** Eine *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression von *avrBs3*<sub>1-10</sub>-*avrBs3*Δ2 und *avrBs3*<sub>1-20</sub>-*avrBs3*Δ2 zeigt, dass die synthetisierten Fusionsproteine eine AvrBs3-spezifische HR auslösen. Der *A. tumefaciens*-Stamm GV2260, welcher kein Konstrukt (-), *avrBs3*Δ2, *avrBs3*<sub>1-10</sub>-*avrBs3*Δ2 oder *avrBs3*<sub>1-20</sub>-*avrBs3*Δ2 enthielt, wurde in Paprikablätter von ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $8 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. *avrBs3*<sub>1-x</sub>-*avrBs3*Δ2 wurde unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt.

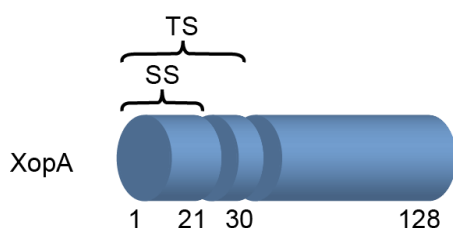
Umrandungen in A - C weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse in A - C wurden mindestens zweimal reproduziert.



### 3.1.2 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in XopA

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das putative Translokonprotein XopA über das T3S-System sekretiert wird und zur Virulenz von *Xcv* beiträgt (Noël *et al.*, 2002). Interessanterweise vermitteln die N-terminalen 51 Aminosäuren von XopA die Translokation des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters in einer *hpaB*-Mutante, jedoch nicht im Wildtyp (Büttner *et al.*, 2004). In weiteren Studien konnte das T3S-Signal von XopA auf die N-terminalen 21 Aminosäuren und das Translokationssignal auf die N-terminalen 30 Aminosäuren eingegrenzt werden (J. Stuttmann, Diplomarbeit 2004) (Abbildung 3.1.4). Für die Erstellung der *xopA*-Derivate wurde in dieser Diplomarbeit das Gateway<sup>TM</sup>-System verwendet. Bei der Gateway<sup>TM</sup>-Klonierung sorgt eine Rekombinase für die Rekombination zweier verschiedener DNA-Stränge an spezifischen Erkennungstellen, den sogenannten „attachment sites“ („att-sites“). Die „att-sites“ bleiben jedoch nach der Klonierung im Endkonstrukt erhalten. Ein Einfluss der „att-site“-kodierenden Aminosäuren auf die Sekretion bzw. Translokation von XopA-Fusionsproteinen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden in dieser Arbeit *xopA-avrBs3 $\Delta$ 2*-Expressionskonstrukte mittels des „Golden-Gate“-Systems erstellt (siehe Kapitel 2.2.1.7), wodurch keine Restriktionserkennungsstellen im Endkonstrukt zurückbleiben.

Ziel war es, das T3S- und Translokationssignal von XopA zu verifizieren und weiter einzugrenzen. Dazu wurden translationale Fusionen zwischen den N-terminalen 20, 25 und 30 Aminosäuren von XopA mit dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter erstellt. Um den Einfluss der N-terminalen 21 Aminosäuren von XopA auf die Sekretion und Translokation zu untersuchen, wurden schrittweise die Codons 2 - 5, 2 - 10 und 2 - 21 in *xopA* deletiert.

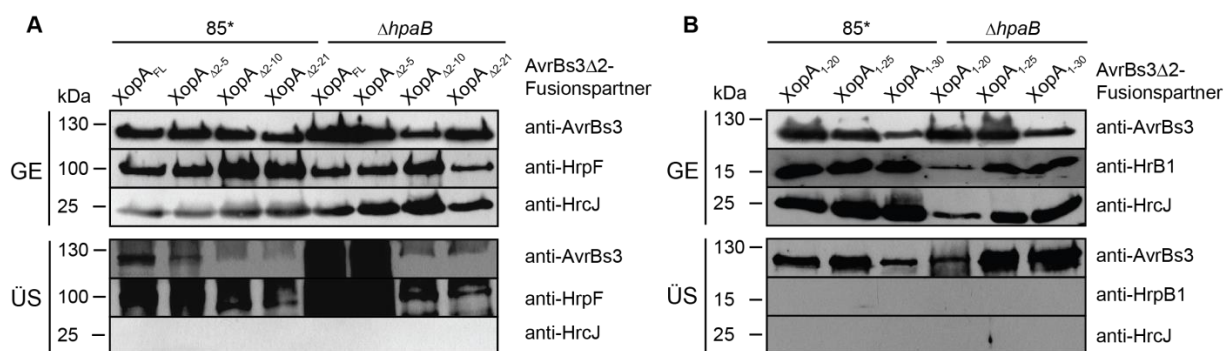


**Abbildung 3.1.4 Schematische Darstellung des T3S-Signals (SS) und Translokationssignals (TS) in XopA.** Die Zahlen stehen für die Aminosäuren des Proteins.

#### XopA enthält ein funktionales T3S-Signal im Aminosäurebereich 6 - 20

*In vitro*-Sekretionsanalysen haben gezeigt, dass XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 und XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2 durch die Stämme 85\* und 85\* $\Delta$ *hpaB* sekretiert werden (Abbildung 3.1.5 A). Zudem war, im Vergleich zum Wildtyp, die Sekretion von XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 und XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2 in Abwesenheit des T3S-Chaperons HpaB verstärkt. Kein sichtbares Signal wurde für XopA $\Delta$ 2-10-AvrBs3 $\Delta$ 2 und XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 im Überstand der Stämme 85\* bzw. 85\* $\Delta$ *hpaB*, mittels des AvrBs3-spezifischen Antikörpers detektiert (Abbildung 3.1.5 A). Um auszuschließen, dass die *xopA-avrBs3 $\Delta$ 2*-Expressionskonstrukte einen negativen Einfluss auf die generelle T3S haben, wurde die Membran mit einem HrpF-spezifischen Antikörper reinkubiert. HrpF ist das putative Translokonprotein von *Xcv* und wird T3-abhängig sekretiert

(Büttner *et al.*, 2002). Ein Signal für HrpF wurde sowohl im Gesamtextrakt als auch im Überstand von 85\* und 85\* $\Delta hpaB$  detektiert, sodass ein negativer Einfluss der XopA-Fusionsproteine auf die T3S ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3.1.5 A). Die Fusionsproteine XopA<sub>1-20</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA<sub>1-25</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 wurden im Gesamtzellextrakt sowie im Überstand der Stämme 85\* und 85\* $\Delta hpaB$ , mittels AvrBs3-spezifischer Antikörper detektiert (Abbildung 3.1.5 B). Die Sekretion der XopA<sub>1-x</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine wurde in diesem Fall nicht wesentlich durch das T3S-Chaperon HpaB beeinflusst. Zusammenfassend haben die Ergebnisse der Sekretionsanalysen gezeigt, dass das T3S-Signal von XopA in den N-terminalen 20 Aminosäuren des Proteins lokalisiert ist und die Aminosäuren 2 - 5 zudem entbehrlich für die Sekretion sind.



**Abbildung 3.1.5 In vitro-Sekretionsanalysen mit verschiedenen XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Derivaten.**

**A)** Sekretionsanalysen zeigen, dass die Aminosäuren 2 - 5 von XopA entbehrlich für die Sekretion von XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 sind. Die Stämme 85\* und 85\* $\Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ), welche die Fusionsproteine XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-10-AvrBs3 $\Delta$ 2 oder XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, wurden in MA-Medium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Überstände (ÜS) wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3- und HrpF-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Membran mit den ÜS wurde überbelichtet, sodass die Sekretion von XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2 nachvollzogen werden kann. Bei den Signalen im ÜS von 85\* und 85\* $\Delta hpaB$ , mit XopA $\Delta$ 2-10/ $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2, handelt es sich vermutlich um Hintergrundsignale, die durch die Überbelichtung entstanden sind.

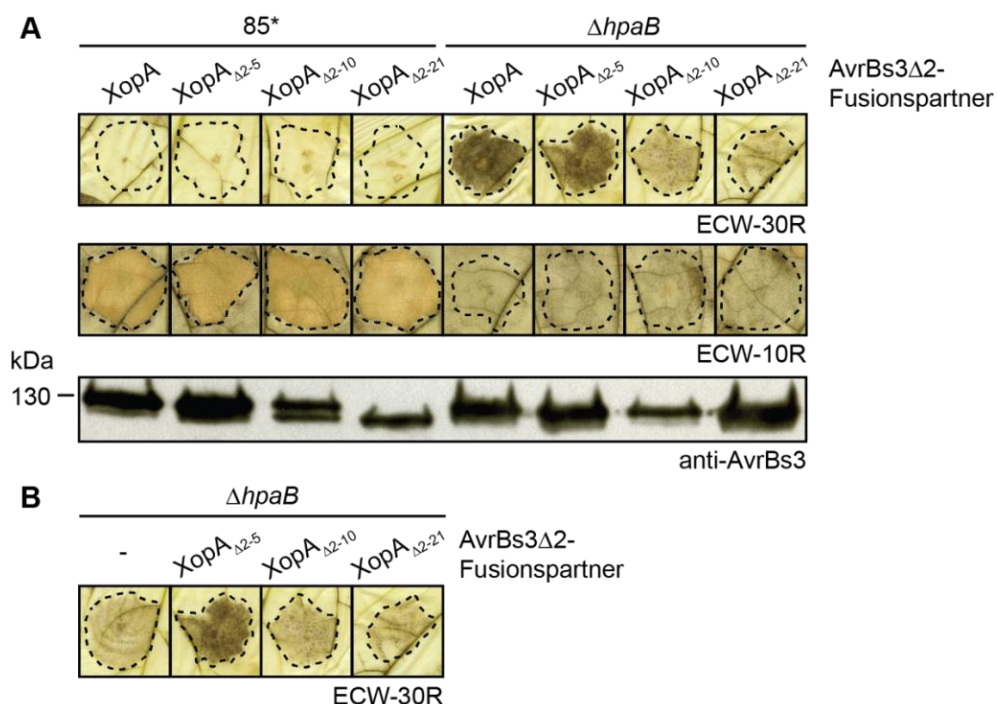
**B)** Die N-terminalen 20 Aminosäuren von XopA enthalten ein funktionales T3S-Signal. Die Stämme 85\* und 85\* $\Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ), welche die dargestellten XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden über Nacht in MA-Medium inkubiert. GE und ÜS wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern untersucht.

Um eine mögliche Lysis der Bakterien auszuschließen, wurden die Membranen mit HrcJ- und/oder HrpB1-spezifischen Antikörpern reinkubiert. Dabei wurde HrcJ bzw. HrpB1 im GE, jedoch nicht ÜS detektiert (B und C). Die Experimente in A und B wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

### Die Aminosäuren 2 - 5 von XopA sind entbehrlich für die Translokation des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters

Um den Einfluss der N-terminalen 21 Aminosäuren von XopA auf die Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2 zu untersuchen, wurden die Stämme 85\* und 85\* $\Delta hpaB$ , welche die Fusionsproteine XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-10-AvrBs3 $\Delta$ 2 oder XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, in Blätter von ECW-30R-Pflanzen infiltriert. Im Stamm 85\* wurde weder XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 noch eines der XopA $\Delta$ 2-x-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine transloziert (Abbildung 3.1.6 A). Dies ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten, in denen gezeigt wurde, dass XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine nur in Abwesenheit von HpaB transloziert werden (Büttner *et al.*, 2004).

Der Stamm  $85^*\Delta hpaB$  translozierte die Fusionsproteine XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 und XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2 (Abbildung 3.1.6 A). Eine im Vergleich zu  $85^*\Delta hpaB$  leicht reduzierte HR wurde beobachtet, wenn XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 durch den Stamm 85-10 $\Delta hpaB$  transloziert wurde (Büttner *et al.*, 2004). Die Translokation von XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2 wird demnach durch die *hrpG*<sup>\*</sup>-Mutation positiv beeinflusst. Nach der Infiltration des Stammes  $85^*\Delta hpaB$ , der das Fusionsprotein XopA $\Delta$ 2-10- bzw. XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierte, wurde keine AvrBs3-spezifische HR detektiert (Abbildung 3.1.6 A). Der Phänotyp der *hpaB*-Mutante mit dem *xopA* $\Delta$ 2-10- bzw. *xopA* $\Delta$ 2-21-*avrBs3* $\Delta$ 2-Expressionskonstrukt war vergleichbar mit der einer *hpaB*-Mutante ohne Expressionskonstrukt (Abbildung 3.1.3 B). Daraus kann geschlossen werden, dass XopA $\Delta$ 2-10- und XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 vermutlich nicht transloziert worden sind. Die *in vivo*-Translokationsstudien mit XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteinen haben gezeigt, dass die Aminosäuren 2 - 5 von XopA entbehrlich für die Translokation des Fusionsproteins sind. Zudem interferierten die Fusionsproteine nicht mit der AvrBs1-spezifischen HR (Abbildung 3.1.6 A).



**Abbildung 3.1.6 Die Aminosäuren 2 - 5 von XopA sind entbehrlich für die *hpaB*-abhängige Translokation von XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2.**

**A)** Die Stämme  $85^*$  und  $85^*\Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ), welche die Fusionsproteine XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2, XopA $\Delta$ 2-10-AvrBs3 $\Delta$ 2 oder XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Wie erwartet lösten alle  $85^*$ -Stämme eine AvrBs1-spezifische HR in Blättern von ECW-10R-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. Für den Proteinsynthesenachweis wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern analysiert.

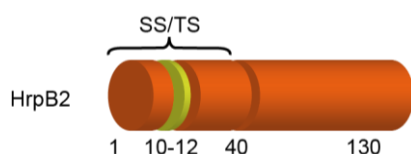
**B)** XopA $\Delta$ 2-10-AvrBs3 $\Delta$ 2 und XopA $\Delta$ 2-21-AvrBs3 $\Delta$ 2 können in Abwesenheit von HpaB scheinbar nicht transloziert werden. Eine HR wurde lediglich für XopA $\Delta$ 2-5-AvrBs3 $\Delta$ 2 nachvollzogen. Der Stamm  $85^*\Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ), welcher kein Plasmid (-) oder eines der oben erwähnten XopA $\Delta$ 2-x-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine enthielt, wurde wie in A beschrieben infiltriert.

Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 2 - 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

### 3.1.3 Eingrenzung des T3S- und Translokationssignals in HrpB2

Das Protein HrpB2 von *Xcv* wird als mögliches „inner rod“ Protein des T3S-Systems diskutiert und ist essentiell für die Pathogenität des Bakteriums (Rossier *et al.*, 2000). Sekretionsanalysen mit HrpB2-Derivaten, die verschiedene interne Deletion aufwiesen haben gezeigt, dass die Aminosäuren 16 - 25 entbehrlich jedoch die Aminosäuren Isoleucin, Alanin und Glutamat an Position 10, 11 und 12 eine wichtige Rolle für die effiziente Sekretion von HrpB2 spielen (S. Schulz, Dissertation 2012). Weitere Studien haben zudem gezeigt, dass die Sekretion von HrpB2 durch das T3S4-Protein HpaC supprimiert wird und die N-terminalen 76 Aminosäuren von HrpB2 ein funktionales Translokationssignal enthalten (Hausner und Büttner 2014, Lorenz *et al.*, 2008a). Durch die Verwendung verschieden langer N-terminaler Bereiche von HrpB2 in translationaler Fusion mit AvrBs3 $\Delta$ 2 wurde das Translokationssignal von HrpB2 auf die N-terminalen 40 Aminosäuren eingegrenzt (Abbildung 3.1.7) (Lorenz und Büttner, unpubliziert). Neben dem T3S4-Protein HpaC haben auch das T3S-Chaperon HpaB und/oder dessen Regulator HpaA einen Einfluss auf die Translokation von HrpB2. Im Vergleich zu einer *hpaC*-Mutante wird in einer *hpaABC*-Mutante HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 verstärkt transloziert (D. Büttner, unpubliziert).

Um zu analysieren, ob ein minimales T3S- und Translokationssignal von HrpB2 hinreichend für eine Sekretion bzw. Translokation ist, wurden translationale Fusionen zwischen den Aminosäuren 9 - 40 und 10 - 40 von HrpB2 mit dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter erstellt. Die Analyse der Fusionsproteine erfolgte im Stamm 85\*, 85\* $\Delta$ *hpaC* und 85\* $\Delta$ *hpaABC*. Die zu Beginn der Arbeit vorhandenen Stämme 85\* und 85\* $\Delta$ *hpaC*, mit den *hrpB2*<sub>1-x</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2-Expressionskonstrukten *hrpB2*<sub>1-20</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2, *hrpB2*<sub>1-25</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2, *hrpB2*<sub>1-30</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2 und *hrpB2*<sub>1-40</sub>-*avrBs3* $\Delta$ 2 wurden in den folgenden Experimenten mit verwendet, da bisher nicht bekannt war, ob die N-terminalen 20, 25 oder 30 Aminosäuren von HrpB2 bereits hinreichend für eine Sekretion von AvrBs3 $\Delta$ 2 sind.

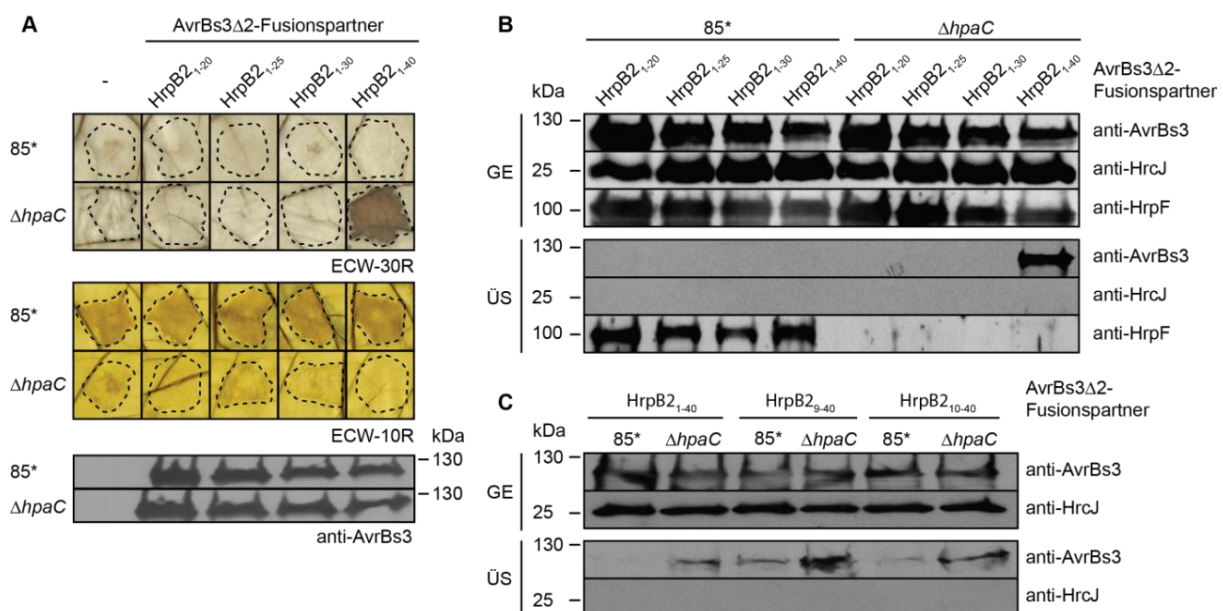


**Abbildung 3.1.7 Schematische Darstellung des T3S-Signals (SS) und Translokationssignals (TS) von HrpB2.** Es ist nicht bekannt, ob das SS und TS voneinander getrennt vorliegen. Die Zahlen stehen für die Aminosäuren des Proteins. Die für die Sekretion von HrpB2 kritischen Aminosäuren 10 - 12 sind in gelb dargestellt.

#### HrpB2 besitzt vermutlich ein gemeinsames T3S- und Translokationssignal

Keine AvrBs3-spezifische HR wurde nach der Infiltration der Stämme 85\* und 85\* $\Delta$ *hpaC*, welche die Fusionsproteine HrpB2<sub>1-20</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, HrpB2<sub>1-25</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 und HrpB2<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten in Blättern von ECW-30R-Pflanzen detektiert (Abbildung 3.1.8 A). Im Gegensatz dazu wurde wie erwartet HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 durch den Stamm 85\* $\Delta$ *hpaC*, nicht aber durch den Stamm 85\*, transloziert und löste eine AvrBs3-spezifische HR aus (Abbildung 3.1.8 A) (Lorenz und Büttner, unpubliziert). Die Fusionsproteine interferierten nicht mit der AvrBs1-spezifischen HR (Abbildung 3.1.8 A).

In Übereinstimmung mit den Translokationsanalysen, wurden in Sekretionsanalysen die Fusionsproteine HrpB2<sup>-1-20</sup>-AvrBs3Δ2, HrpB2<sup>-1-25</sup>-AvrBs3Δ2 und HrpB2<sup>-1-30</sup>-AvrBs3Δ2 nicht im Überstand von 85\* und 85\*Δ*hpaC* detektiert (Abbildung 3.1.8 B). Demnach enthalten die N-terminalen 30 Aminosäuren von HrpB2 kein funktionales T3S- und Translokationssignal. *In vitro*-Sekretionsanalysen haben weiterhin gezeigt, dass HrpB2<sup>-1-40</sup>-AvrBs3Δ2, HrpB2<sup>-9-40</sup>-AvrBs3Δ2 und HrpB2<sup>-10-40</sup>-AvrBs3Δ2 durch den Stamm 85\*Δ*hpaC* sekretiert werden (Abbildung 3.1.8 B und C). Im Vergleich zu den 85\*-Stämmen, waren die Signale für HrpB2<sup>-1-40</sup>-AvrBs3Δ2, HrpB2<sup>-9-40</sup>-AvrBs3Δ2 und HrpB2<sup>-10-40</sup>-AvrBs3Δ2 im Überstand der *hpaC*-Mutante verstärkt (Abbildung 3.1.8 C). Die Aminosäuren 2 - 9 von HrpB2 sind den Ergebnissen zur Folge entbehrlich für die Sekretion von HrpB2-AvrBs3Δ2. Auf die Beteiligung der Aminosäuren 2 - 8 und 2 - 9 von HrpB2 auf die Translokation wird nachfolgend eingegangen.



**Abbildung 3.1.8 Translokations- und Sekretionsanalysen mit verschiedenen *hrpB2*-Derivaten in translationaler Fusion mit dem *avrBs3Δ2*-Reporter.**

**A)** Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 enthalten ein funktionales Translokationssignal. Die Stämme 85\* und 85\*Δ*hpaC* (Δ*hpaC*), welche die in der Abbildung beschriebenen HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs3Δ2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von 4 x 10<sup>8</sup> KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 2 - 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Wie erwartet lösten alle 85\*-Stämme eine AvrBs1-spezifische HR in Blättern von ECW-10R-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der HrpB2-AvrBs3Δ2-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. Die AvrBs1-spezifische HR ist in *hpaC*-Mutanten reduziert (Lorenz *et al.*, 2008a). Für den Proteinsynthesenachweis wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern analysiert. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin.

**B)** Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 enthalten ein funktionales T3S-Signal. Die Stämme 85\* und 85\*Δ*hpaC* (Δ*hpaC*), welche die in der Abbildung beschriebenen HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs3Δ2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in MA-Medium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Überstände (ÜS) wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3- und HrpF-spezifischen Antikörpern untersucht. HrpF wurde durch die 85\*-Stämme sekretiert, sodass ein negativer Einfluss der *hrpB2-avrBs3Δ2*-Expressionskonstrukte auf die T3S ausgeschlossen werden kann. In Abwesenheit von HpaC ist die HrpF-Sekretion reduziert (Lorenz *et al.*, 2008a).

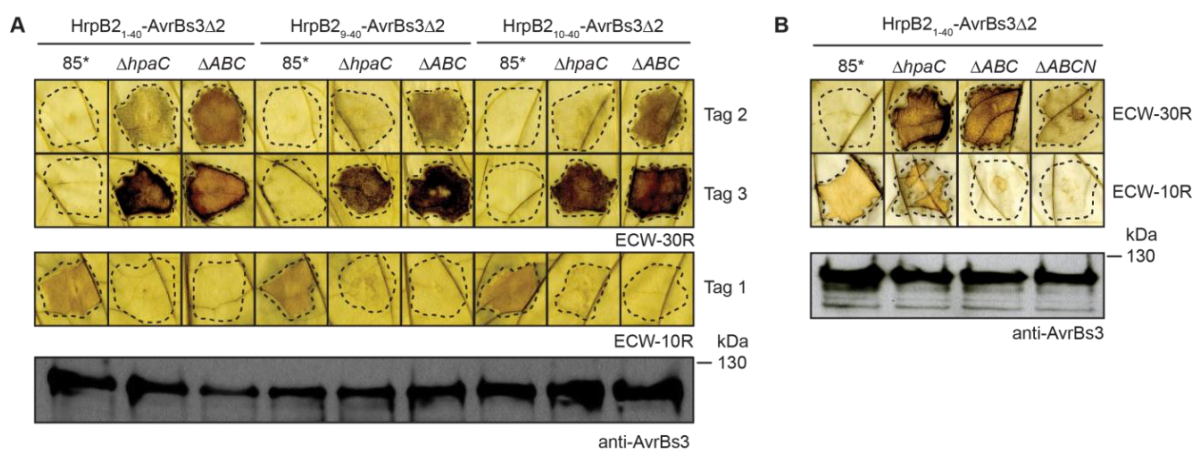
**C)** Die N-terminalen neun Aminosäuren von HrpB2 sind entbehrlich für die Sekretion von HrpB2-AvrBs3Δ2. Die Stämme 85\* und 85\*Δ*hpaC* (Δ*hpaC*), welche die in der Abbildung beschriebenen HrpB2<sub>x-40</sub>-AvrBs3Δ2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in MA-Medium inkubiert. GE und ÜS wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern untersucht. Um eine mögliche Lysis der Bakterien auszuschließen, wurden die Membranen mit HrcJ-spezifischen Antikörpern reinkubiert. HrcJ wurde in den GE, jedoch nicht in den ÜS detektiert (B und C).

Alle Versuchsergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

### Die Aminosäuren 10 - 40 von HrpB2 sind hinreichend für die Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2 in Abwesenheit der Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der Aminosäuren 2 - 8 und 2 - 9 von HrpB2 auf die Translokation des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporterproteins in einer *hpaC*- und einer *hpaABC*-Mutante untersucht werden. Dazu wurden die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hpaC* und 85\* $\Delta$ *hpaABC*, welche die Fusionsproteine HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, HrpB2<sub>9-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 und HrpB2<sub>10-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, in Blätter von ECW-30R-Pflanzen infiltriert. Der Stamm 85\* translozierte wie erwartet keines der HrpB2<sub>x-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine (Abbildung 3.1.9 A). Im Vergleich zu den *hpaC*-Mutanten, lösten die *hpaABC*-Mutanten, welche HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, HrpB2<sub>9-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 oder HrpB2<sub>10-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, eine schnellere, bereits nach zwei Tagen sichtbare HR aus (Abbildung 3.1.9 A). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Aminosäuren 2 - 8 und 2 - 9 von HrpB2 vermutlich unterstützend auf die Translokation des Fusionsproteins wirken, jedoch nicht essentiell sind. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem *hrpG*-Wildtypstamm 85-10 $\Delta$ *hpaC* beobachtet, sodass die Beobachtungen nicht auf die *hrpG*\*-Mutation zurückzuführen sind (Scheibner *et al.*, 2016).

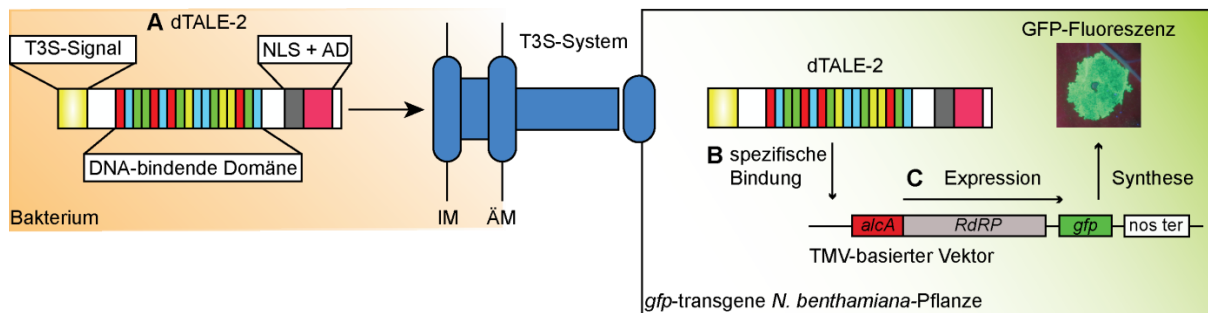
Zur Überprüfung der T3-abhängigen Translokation von HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 wurde das Fusionsprotein im Stamm 85\* $\Delta$ *hpaABC* $\Delta$ *hrcN* analysiert. Das Gen *hrcN* kodiert die ATPase des T3S-Systems und ist essentiell für die T3S (Lorenz und Büttner 2009). Die Translokation von HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 durch die *hpaABC*-Mutante wurde durch die zusätzliche Deletion von *hrcN* verhindert (Abbildung 3.1.9 B).



**Abbildung 3.1.9 HpaA, HpaB und HpaC beeinflussen den Export von HrpB2-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteinen.**  
**A)** Die N-terminalen neun Aminosäuren von HrpB2 sind entbehrlich für die Translokation eines HrpB2-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteins. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hpaC* ( $\Delta$ *hpaC*) und 85\* $\Delta$ *hpaABC* ( $\Delta$ *ABC*), welche die in der Abbildung beschriebenen HrpB2<sub>x-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-30R- und ECW-10R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 1, 2 oder 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt.  
**B)** Die Translokation von HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 ist vom T3S-System abhängig. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hpaC* ( $\Delta$ *hpaC*), 85\* $\Delta$ *hpaABC* ( $\Delta$ *ABC*) und 85\* $\Delta$ *hpaABC* $\Delta$ *hrcN* ( $\Delta$ *ABCN*), welche HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisierten, wurden wie in A beschrieben infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter 2 bzw. 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt.  
 Wie erwartet lösten alle 85\*-Stämme eine AvrBs1-spezifische HR in Blättern von ECW-10R-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der HrpB2-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. Für den Proteinsynthesenachweis wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern analysiert. Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Experimente in A und B wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

### 3.1.4 Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 vermitteln die Translokation eines „designer“-TALE in die Nicht-Wirtspflanze *Nicotiana benthamiana*

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das T3S- und Translokationssignal von HrpB2 die Translokation eines Effektorproteins in die Nicht-Wirtspflanze *N. benthamiana* vermitteln kann. Dazu wurde ein sogenannter „designer“ TAL-Effektor (dTALE-2) verwendet. Der dTALE-2 ist mit dem TAL-Effektor AvrBs3 auf Aminosäureebene zu 98 % identisch. So befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins ein T3S- und Translokationssignal und im Zentrum die DNA-bindende Domäne, („repeat“ Region) bestehend aus einem 17,5-mal sich wiederholenden 34 Aminosäuresequenzmotiv (Abbildung 3.1.10 A). Im Gegensatz zu AvrBs3 wurden die „repeat-variable diresidues“ (RVDs) jedoch so modifiziert, dass sie an die DNA Sequenz 5'-TCCCCGCATAGCTGAACAT-3' binden können (Weber *et al.*, 2011). Der C-terminale Bereich des Proteins, mit Kernlokalisierungssignalen (NLS) und Aktivierungsdomäne (AD), ist dagegen wieder identisch mit AvrBs3. Als Reportersystem wurden *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet, die einen stabil integrierten Tabakmosaikvirus (TMV)-basierten Vektor enthalten (Weber *et al.*, 2011, Werner *et al.*, 2011). Der TMV-Vektor steht unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors (Alkohol-Dehydrogenase) von *Aspergillus nidulans* und kodiert eine RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) sowie das grün fluoreszierende Protein GFP. Die *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen besitzen nicht den Transkriptionsaktivator AlcR, der jedoch notwendig ist für die Transkriptionsaktivierung. Somit kommt es nur zu einer Induktion der Gene auf dem TMV-Vektor, wenn der dTALE-2 transloziert wird und anschließend stromaufwärts der TATA-Box des *alcA*-Promotors bindet (Weber *et al.*, 2011), wie in Abbildung 3.1.10 B schematisch dargestellt. Die virale RNA wird durch die RdRP im Cytosol synthetisiert und führt anschließend zur Expression von *gfp* (Abbildung 3.1.10 C). Die GFP-Fluoreszenz ist auf die Infektionsstelle beschränkt, da dem viralen Vektor die Gene für eine Zell-Zell-Übertragung bzw. eine systemische Verbreitung fehlen (Weber *et al.*, 2011, Werner *et al.*, 2011).



**Abbildung 3.1.10 Der „designer“ TAL-Effektor dTALE-2 als Reporter zur Analyse der Proteintranslokation.**  
**A)** Das N-terminale T3S- und Translokationssignal ist notwendig damit der dTALE-2 über das T3S-System transportiert wird. Dieses Signal kann wahlweise gegen ein zu untersuchendes T3S- und Translokationssignal ausgetauscht werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.1.7). **B)** Besitzt der dTALE-2 ein funktionales T3S- und Translokationssignal, erfolgt die Translokation in die Pflanzenzelle. Als Reportersystem werden *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet, welche einen stabil integrierten Tabakmosaikvirus (TMV)-basierten Vektor tragen. Der TMV-Vektor steht unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors von *A. nidulans* und kodiert eine RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) sowie das grün fluoreszierende Protein GFP. Der dTALE-2 bindet eine spezifische DNA-Sequenz stromaufwärts der TATA-Box des *alcA*-Promotors und initiiert so die Transkription. **C)** Die virale RNA wird durch die RdRP im Cytosol synthetisiert und führt anschließend zur Expression von *gfp*. Die GFP-Fluoreszenz kann mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden und beschränkt sich auf den Infektionsbereich. NLS: „nuclear localisation signal“; AD: „acidic activation domain“; IM: innere Bakterienmembran; ÄM: äußere Bakterienmembran.

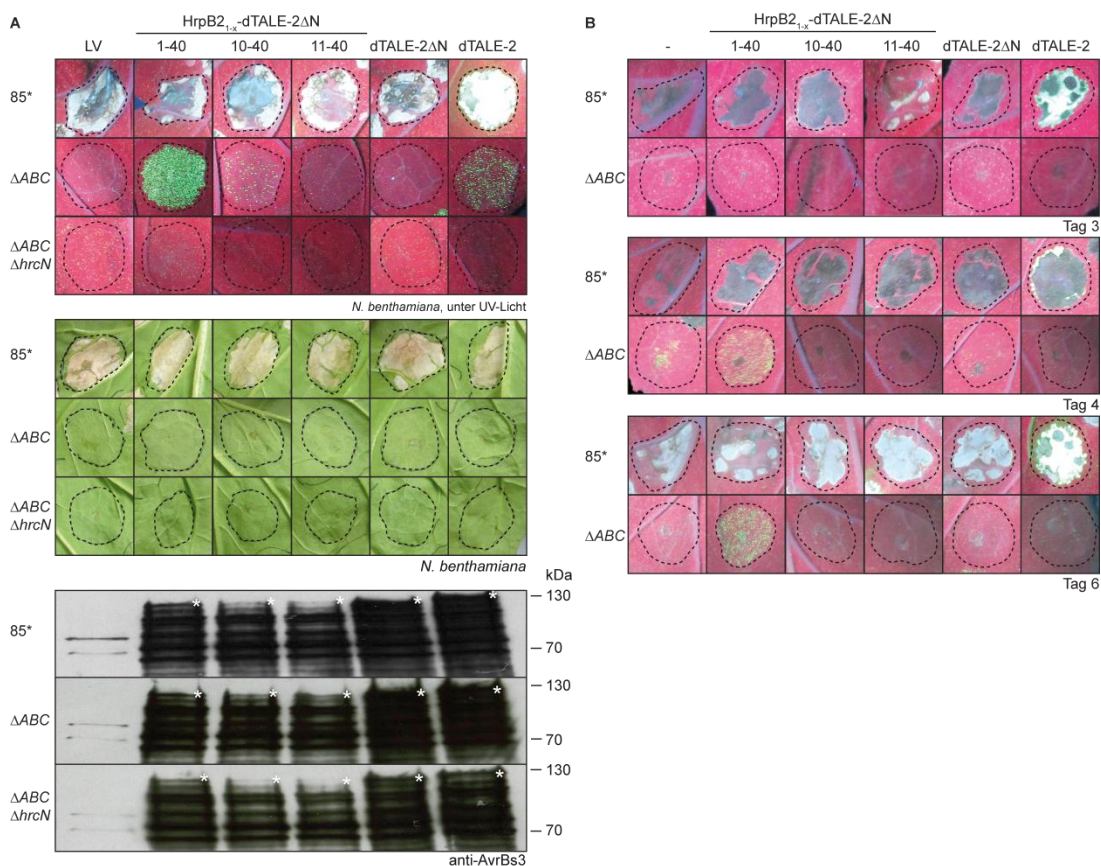
Für die Translokationsanalysen wurde der dTALE-2 und das N-terminale Deletionsderivat dTALE-2ΔN, dem die N-terminalen 64 Aminosäuren fehlen, verwendet. Die Notwendigkeit der N-terminalen Region für die Sekretion von AvrBs3 wurde bereits gezeigt (Büttner *et al.*, 2004, Schreiber *et al.*, 2015). Es wurden translationale Fusionen zwischen den Codons 1 - 40, 10 - 40 und 11 - 40 von HrpB2 mit dem dTALE-2ΔN erstellt (Kapitel 2.2.1.7). Der Leervektor sowie die Expressionskonstrukte dTALE-2, dTALE-2ΔN, *hrpB2*<sub>1-40</sub>-dTALEΔN, *hrpB2*<sub>10-40</sub>-dTALEΔN und *hrpB2*<sub>11-40</sub>-dTALEΔN wurden in die Stämme 85\*, 85\*Δ*hpaABC* und in die T3S-Mutante 85\*Δ*hpaABC*Δ*hrcN* elektroporiert. Anschließend erfolgte die Infiltration aller Stämme in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen.

Die Infiltration des 85\*-Stammes, der den dTALE-2 synthetisierte, führte zu einer GFP-Fluoreszenz, welche ab dem dritten Tag nach der Infiltration detektiert wurde (Abbildung 3.1.11 A und B). Die Ergebnisse zeigen, dass der dTALE-2 durch den Stamm 85\* transloziert wurde. In Folge der Ausbildung einer Nekrose in dem infizierten Blattbereich, wurde die GFP-Fluoreszenz jedoch teilweise überlagert (Abbildung 3.1.11 A und B). Solch eine Nekrose konnte in vorangegangenen Studien mit dem *Xcv*-Stamm GM98-38 bereits beobachtet werden (Metz *et al.*, 2005). Die Infiltration des Stammes 85\*Δ*hpaABC*, mit dem dTALE-2, zeigte hingegen erst nach acht Tagen eine punktuelle GFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.1.11 B). Dies führt zur Annahme, dass die Kontrollproteine HpaA, HpaB und/oder HpaC wichtig sind für eine effiziente Translokation des dTALE-2.

Keine sichtbare GFP-Fluoreszenz wurde nach der Infiltration des Stammes 85\*Δ*hpaABC*, der den dTALE-2ΔN synthetisierte detektiert (Abbildung 3.1.11). Im Gegensatz dazu wurde HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2ΔN durch den Stamm 85\*Δ*hpaABC* transloziert, was zu einer punktuellen GFP-Fluoreszenz führte, die ab dem vierten Tag an Intensität zunahm (Abbildung 3.1.11 B). Der Stamm 85\*Δ*hpaABC* translozierte HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2ΔN vermutlich effizienter als dTALE-2, was anhand einer stärkeren GFP-Fluoreszenz im jeweiligen Infektionsbereich



nachvollzogen wurde (Abbildung 3.1.11 A). Ein signifikant reduziertes oder kein GFP-Signal wurde nach Infiltration der Stämme  $85^*\Delta ABC$ , die HrpB2<sub>10-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N oder HrpB2<sub>11-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N synthetisierten detektiert (Abbildung 3.1.13 A). Folglich leisten die Aminosäuren 10 - 40 von HrpB2 einen wichtigen Beitrag für die effiziente Translokation des dTALE-2 $\Delta$ N-Reporters. Die Translokation von dTALE-2 und HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N war vom T3S-System abhängig, da der Stamm  $85^*\Delta ABC\Delta hrcN$ , in dem das für die ATPase kodierende Gen *hrcN* deletiert ist, zu keiner detektierbaren GFP-Fluoreszenz führte (Abbildung 3.1.11 A). Durch die erhaltenen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 die Translokation von dTALE-2 $\Delta$ N, in Abwesenheit der Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC, in die Nicht-Wirtspflanze *N. benthamiana* ermöglichen.



**Abbildung 3.1.11 Die *hpaABC*-Mutante transloziert HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N in die Nicht-Wirtspflanze *N. benthamiana*.**

**A)** HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N wird durch den Stamm  $85^*\Delta hpaABC$  in *N. benthamiana* transloziert. Die Stämme  $85^*$ ,  $85^*\Delta hpaABC$  ( $\Delta ABC$ ) und  $85^*\Delta hpaABC\Delta hrcN$  ( $\Delta ABCN$ ), welche den Leervektor (LV), HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, HrpB2<sub>10-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, HrpB2<sub>11-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, dTALE-2 $\Delta$ N oder dTALE-2 enthalten, wurden in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $8 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Die Bilder der GFP-Fluoreszenz wurden acht Tage nach Inokulation aufgenommen. Phänotypische Reaktionen wurden sechs Tage nach der Inokulation aufgenommen. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3-spezifischen Antikörpern analysiert. Die mit einem (\*) markierten Signale entsprechen dem Fusionsprotein, während die darunter liegenden Signale vermutlich Abbauprodukte des Fusionsproteins sind.

**B)** Zeitlicher Verlauf der Translokationsanalyse von HrpB2-dTALE-2 $\Delta$ N-Derivaten. Die Stämme  $85^*$  und  $85^*\Delta hpaABC$  ( $\Delta ABC$ ), welche kein Plasmid (-), HrpB2<sub>1-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, HrpB2<sub>10-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, HrpB2<sub>11-40</sub>-dTALE-2 $\Delta$ N, dTALE-2 $\Delta$ N oder dTALE-2 enthalten, wurden wie in A beschrieben infiltriert. Die Bilder der GFP-Fluoreszenz wurden nach drei, vier und sechs Tagen aufgenommen.

Umrandungen in A und B weisen jeweils auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

Die Ergebnisse der Sekretions- und Translokationsstudien mit den Proteinen AvrBs3, XopA und HrpB2 unter Verwendung des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1 Zusammenfassung der Sekretions- und Translokationsanalysen**

AvrBs3 $\Delta$ 2- Fusionspartner	85*		85* $\Delta$ hpaB		85* $\Delta$ hpaC		85* $\Delta$ hpaABC	
	S	T <sup>1</sup>	S	T <sup>1</sup>	S	T <sup>1</sup>	S	T <sup>1</sup>
AvrBs3	n. a.	+	n. a.	+/-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
AvrBs3 <sub>1-10</sub>	+	-	+	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
AvrBs3 <sub>1-20</sub>	+	-	+	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
AvrBs3 <sub>1-30</sub> <sup>2</sup>	+	-	+	+	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
AvrBs3 <sub>1-40</sub>	+	-	+	+/-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
AvrBs3 <sub>1-50</sub>	+	+	+	+/-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA <sup>2</sup>	+/-	-	+	+	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA $\Delta$ 2-5	+/-	-	+	+	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA $\Delta$ 2-10	-	-	-	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA $\Delta$ 2-21	-	-	-	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA <sub>1-20</sub> <sup>3</sup>	+	-	+	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA <sub>1-25</sub> <sup>3</sup>	+	-	+	-	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
XopA <sub>1-30</sub> <sup>3</sup>	+	-	+	+	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
HrpB2 <sub>1-20</sub>	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.
HrpB2 <sub>1-25</sub>	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.
HrpB2 <sub>1-30</sub>	-	-	n. a.	n. a.	-	-	n. a.	n. a.
HrpB2 <sub>1-40</sub> <sup>4</sup>	+/-	-	n. a.	n. a.	+	+	n. a.	++
HrpB2 <sub>9-40</sub>	+/-	-	n. a.	n. a.	+	+/-	n. a.	+
HrpB2 <sub>10-40</sub>	+/-	-	n. a.	n. a.	+	+/-	n. a.	+

S, *in vitro* Sekretion; T, *in vivo*-Translokation; +, sekretiert bzw. HR; ++, übersekretiert bzw. starke HR; -, keine Sekretion bzw. keine HR detektiert; +/-, signifikant reduzierte Sekretion bzw. HR; n. a., nicht analysiert

<sup>1</sup>Die jeweiligen *Xcv*-Stämme wurden mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> in Blätter von AvrBs3-responsiven Pflanzen infiltriert.

<sup>2</sup>Das Fusionsprotein wurde nicht durch den Stamm 85\* $\Delta$ hpaB $\Delta$ hrcV transloziert.

<sup>3</sup>Die Ergebnisse der Translokation von XopA<sub>1-x</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteinen wurde in vorangegangenen Studien gezeigt (J. Stuttmann, Diplomarbeit 2004) und konnte mittels „Golden Gate“-kompatibler xopA<sub>1-x</sub>-avrBs3 $\Delta$ 2-Expressionskonstrukte reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

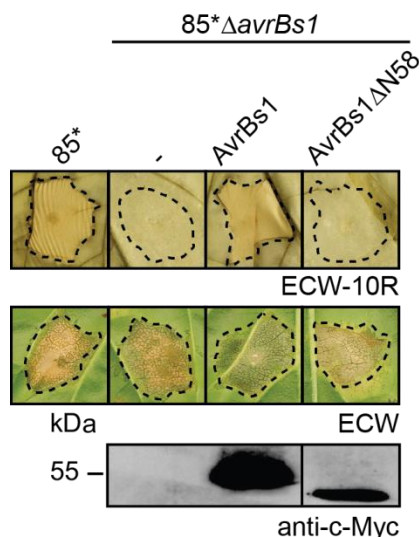
<sup>4</sup>HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 wurde nicht durch den Stamm 85\* $\Delta$ ABC $\Delta$ hrcN transloziert.

### 3.2 AvrBs1ΔN58 als alternativer Reporter zur Analyse von T3S- und Translokationssignalen

Um die identifizierten T3S- und Translokationssignale von AvrBs3, XopA und HrpB2 (Kapitel 3.1) zu verifizieren wurde ein alternativer Reporter zur Analyse von T3S- und Translokationssignalen verwendet. Dabei handelte es sich um AvrBs1ΔN58, der ein N-terminales Deletionsderivat des Effektorproteins AvrBs1 ist. Dem AvrBs1ΔN58-Reporter fehlen die Aminosäuren 2 - 58 und damit ein funktionales T3S- und Translokationssignal (Jiang *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008). In translationaler Fusion mit einem funktionalem T3S- und Translokationssignal kann das Fusionsprotein durch das T3S-System in die Pflanzenzelle übertragen werden. In Paprikapflanzen des Kultivars ECW-10R wird die Effektordomäne von AvrBs1ΔN58 direkt oder indirekt durch das Resistenzprotein Bs1 erkannt, was zu einer HR im Infektionsbereich führt (Xu *et al.*, 2008). Die HR ist somit der Indikator für eine Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters.

Da *avrBs1*, im Gegensatz zu *avrBs3*, natürlicherweise im Genom des *Xcv*-Stammes 85-10 vorkommt, wurden für die nachfolgenden Analysen *avrBs1*-Mutanten verwendet. Die Stämme 85\*Δ*avrBs1*, 85-10Δ*avrBs1* und 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaB* lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor (Jordan und Büttner, unpubliziert). Zunächst wurde überprüft, ob der Phänotyp einer *avrBs1*-Mutante durch AvrBs1 oder AvrBs1ΔN58 komplementiert werden kann. Die Erstellung von pBRM\_avrBs1 und pBRM\_KK-avrBs1ΔN58 ist im Material- und Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 2.2.1.7). Nach der Infiltration in Blätter von ECW-10R-Pflanzen löste der Stamm 85\*, im Gegensatz zum Stamm 85\*Δ*avrBs1*, eine HR aus (Abbildung 3.2.1). Der Phänotyp der *avrBs1*-Mutante wurde durch die ektopische Expression von *avrBs1*, nicht jedoch durch *avrBs1*ΔN58 komplementiert (Abbildung 3.2.1). Dieses Ergebnis bestätigt, dass AvrBs1ΔN58 kein funktionales Translokationssignal besitzt.

Um zu überprüfen, ob die Expression von *avrBs1* bzw. *avrBs1*ΔN58 die Funktion des T3S-Systems negativ beeinflusst, wurden die Stämme in Blätter von ECW-Pflanzen infiltriert. Die Infiltration der Stämme 85\* und 85\*Δ*avrBs1* führte zu wässrigen Läsionen, welche im weiteren Infektionsverlauf nekrotisch wurden, sodass ein negativer Einfluss der Expressionskonstrukte ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3.2.1).



**Abbildung 3.2.1 AvrBs1, jedoch nicht AvrBs1ΔN58 komplementiert eine *avrBs1*-Mutante.**

Die N-terminalen 58 Aminosäuren von AvrBs1 sind essentiell für die Translokation des Proteins. Der Stamm 85\* (ohne Konstrukt) sowie der Stamm 85\*Δ*avrBs1* (Δ*avrBs1*), welcher kein Plasmid (-), AvrBs1 oder AvrBs1ΔN58 enthält, wurde in Paprikablätter von ECW-10R- und ECW-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der ECW-10R-Pflanzen zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Krankheitssymptome wurden sieben Tage nach der Inokulation fotografisch dokumentiert. Für die Proteinexpression wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

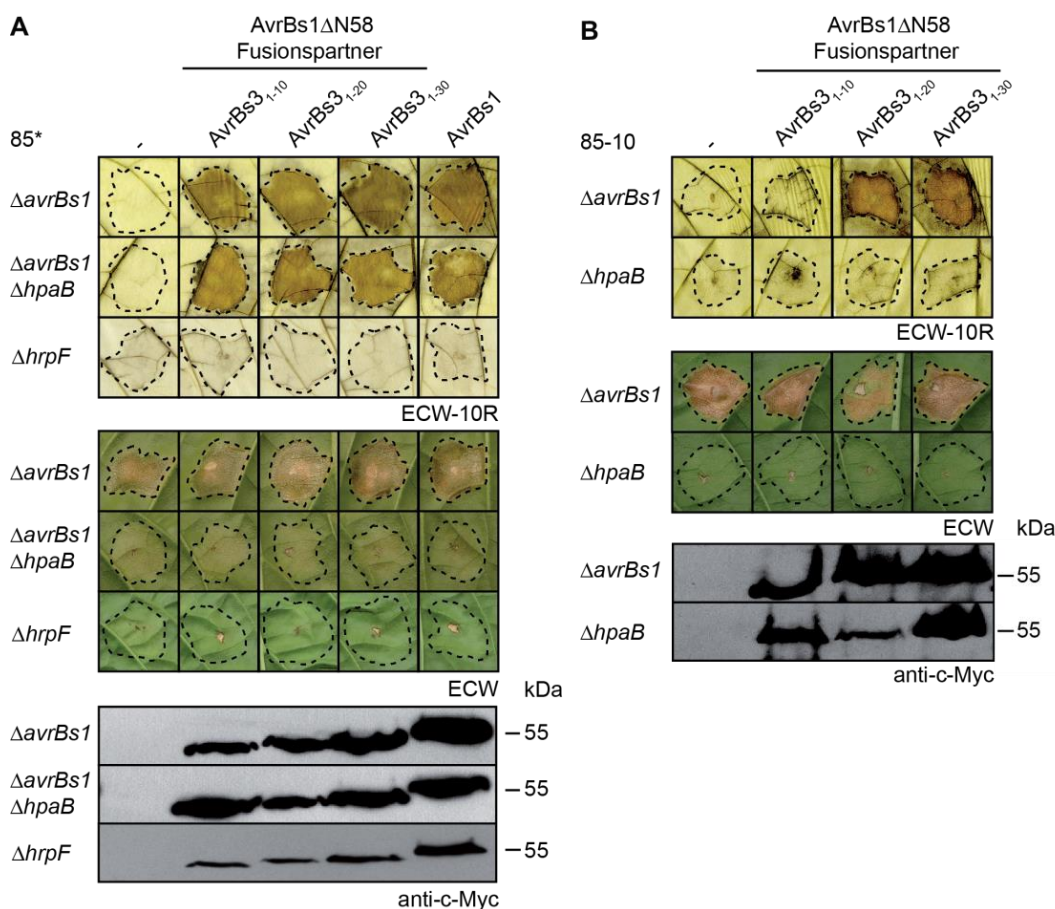
### 3.2.1 Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 vermitteln die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters

Um zu überprüfen, ob der N-terminale Bereich von AvrBs3 hinreichend für die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters ist, wurden die Codons 1 - 10, 1 - 20 und 1 - 30 von *avrBs3* translational an *avrBs1*ΔN58 fusioniert.

AvrBs1 und alle AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine wurden durch die Stämme 85\*Δ*avrBs1* und 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaB* transloziert, was in einer HR auf Blättern von ECW-10R-Pflanzen resultierte (Abbildung 3.2.2 A). Die Infiltration einer *hrpF*-Mutante, welche AvrBs1 oder eines der AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine synthetisierte, löste keine sichtbaren Reaktionen auf ECW-10R-Blättern aus (Abbildung 3.2.2 A). Die Translokation von AvrBs1 und den AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteinen ist demnach vom T3S-System abhängig.

Um den Einfluss der *hrpG*\*-Mutation auf die Translokation der AvrBs3-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine zu untersuchen, wurden die Fusionsproteine AvrBs3<sub>1-10</sub>-AvrBs1ΔN58, AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs1ΔN58 und AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58 im Stamm 85-10Δ*avrBs1* und 85-10Δ*hpaB* analysiert. Im Gegensatz zum Stamm 85\*Δ*avrBs1* (*hrpG*\*-Hintergrund) wurde AvrBs3<sub>1-10</sub>-AvrBs1ΔN58 nicht durch den Stamm 85-10Δ*avrBs1* (*hrpG*-Wildtyphintergrund) transloziert (Abbildung 3.2.2 B). Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 sind demnach in einem *hrpG*-Wildtyphintergrund nicht hinreichend für eine Translokation von AvrBs1ΔN58. Ein positiver Einfluss der *hrpG*\*-Mutation auf die Proteintranslokation wurde bereits beschrieben (Büttner *et al.*, 2004). AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs1ΔN58 und AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58 wurden dagegen durch den Stamm 85-10Δ*avrBs1* transloziert und lösten eine HR aus (Abbildung 3.2.2 B). Im *hrpG*-Wildtypstamm ist die Translokation der Fusionsproteine AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs1ΔN58 und AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58 zudem vom T3S-Chaperon HpaB abhängig (Abbildung 3.2.2 B). In einem *hrpG*-Wildtypstamm werden demnach die N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 sowie das Chaperon HpaB für eine effiziente Translokation von AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58 benötigt.

Die Ergebnisse der Translokationsstudien mit dem AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter stimmen demnach nicht mit den bisher erhaltenen Ergebnissen des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters überein und müssen daher kritisch betrachtet werden. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass der AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter möglicherweise ein internes Signal enthält, welches die Translokation fördert, jedoch allein nicht ausreichend für eine Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 ist. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen wurden im Folgenden die mit dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter identifizierten T3S- und Translokationssignale von XopA und HrpB2 in Kombination mit dem AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter analysiert.



**Abbildung 3.2.2 Translokationsanalysen mit AvrBs3-AvrBs1 $\Delta$ N58-Derivaten.**

**A)** Die N-terminalen 10 Aminosäuren von AvrBs3 sind ausreichend für eine T3S-abhängige Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 im *hrpG*\*-Hintergrund. Die Stämme 85\* $\Delta$ avrBs1 ( $\Delta$ avrBs1), 85\* $\Delta$ avrBs1 $\Delta$ hpaB ( $\Delta$ avrBs1 $\Delta$ hpaB) und 85\* $\Delta$ hrpF, welche kein Plasmid (-) enthalten oder die in der Abbildung beschriebenen AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-10R- und ECW-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Die Infiltration der *hrpF*-Mutante, ohne und mit den jeweiligen Expressionskonstrukten, wurde in einem separaten Experiment durchgeführt.

**B)** Im *hrpG*-Wildtypstamm 85-10 $\Delta$ avrBs1 sind die N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 für eine Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 notwendig. Die Translokation von AvrBs3<sub>1-20</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58 ist zudem HpaB-abhängig. Die Stämme 85-10 $\Delta$ avrBs1 ( $\Delta$ avrBs1) und 85-10 $\Delta$ hpaB ( $\Delta$ hpaB), welche kein Plasmid (-) enthalten oder die in der Abbildung beschriebenen AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58-Fusionsproteine synthetisierten, wurden wie in A beschrieben infiltriert.

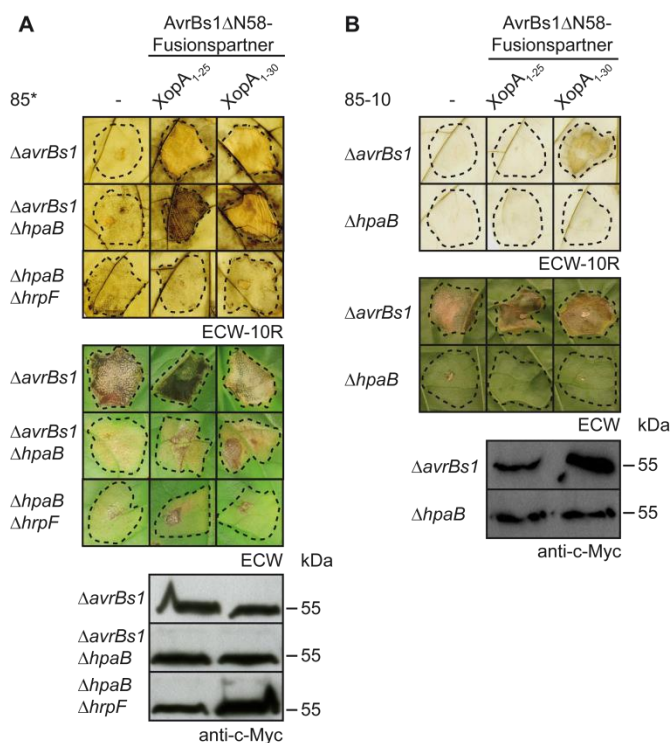
Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der ECW-10R-Pflanzen zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Krankheitssymptome wurden 7 - 11 Tage nach der Inokulation fotografisch dokumentiert. Alle 85\* $\Delta$ avrBs1- und 85-10 $\Delta$ avrBs1-Stämme lösten Krankheitssymptome in Blättern von ECW-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. 85\* $\Delta$ avrBs1 $\Delta$ hpaB-, 85-10 $\Delta$ hpaB- und 85\* $\Delta$ hrpF-Stämme lösten reduzierte bzw. keine Reaktion in Blättern von ECW-Pflanzen aus. Für die Proteinexpression wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Alle Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

### 3.2.2. Die N-terminalen 25 Aminosäuren von XopA vermitteln die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters

Für die Analyse des T3S- und Translokationssignal von XopA in Kombination mit dem AvrBs1ΔN58-Reporter wurden die Konstrukte *xopA<sub>1-25</sub>-avrBs1ΔN58* und *xopA<sub>1-30</sub>-avrBs1ΔN58* erstellt.

*XopA<sub>1-25</sub>-AvrBs1ΔN58* und *XopA<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58* wurden sowohl durch den Stamm 85\*Δ*avrBs1* als auch durch den Stamm 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaB* transloziert (Abbildung 3.2.3 A). Die Ergebnisse deuten an, dass die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters durch die N-terminalen 25 Aminosäuren von XopA vermittelt wird und das T3S-Chaperon HpaB keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation des Fusionsproteins hat. Da eine *hpaB-hrpF*-Mutante, die *xopA<sub>1-25</sub>-avrBs1ΔN58* oder *xopA<sub>1-30</sub>-avrBs1ΔN58* exprimiert, keine sichtbaren Reaktionen auf ECW-10R-Pflanzen hervorgerufen hat, ist davon auszugehen, dass die Translokation der Fusionsproteine vom T3S-System abhängig ist (Abbildung 3.2.3 A).

Der Einfluss der *hrpG*\*-Mutation wurde ebenfalls für die Fusionsproteine *XopA<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58*-Fusionsproteine analysiert. So wurde durch den Stamm 85-10Δ*avrBs1* das Fusionsprotein *XopA<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58* jedoch nicht *XopA<sub>1-25</sub>-AvrBs1ΔN58*, transloziert (Abbildung 3.2.3 B). Im *hrpG*-Wildtypstamm sind somit die N-terminalen 30 Aminosäuren von XopA nötig, um eine Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters zu vermitteln. Eine *hpaB*-Mutante (*hrpG*-Wildtypstamm), die *XopA<sub>1-25</sub>-AvrBs1ΔN58* oder *XopA<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58* synthetisierte, löste keine sichtbare Reaktion in ECW-10R-Blättern aus, woraus geschlossen werden kann, dass die *XopA*-*AvrBs1ΔN58*-Fusionsproteine in diesem Fall nicht transloziert wurden (Abbildung 3.2.3 B). Für die effiziente Translokation von *XopA<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58* spielt demnach das T3S-Chaperon HpaB eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu war die Translokation von *XopA*-*AvrBs3Δ2*-Fusionsproteinen nur in Abwesenheit des T3S-Chaperons möglich (siehe Abbildung 3.1.6 A) (Büttner *et al.*, 2004). Es kann spekuliert werden, dass AvrBs1ΔN58 auch in diesem Fall selbst einen Einfluss auf die Translokation haben könnte, wie es für *AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58*-Fusionsproteine vermutet wurde.



**Abbildung 3.2.3 Translokationsanalysen mit XopA-AvrBs1ΔN58-Derivaten.**

**A)** Die N-terminalen 25 Aminosäuren von XopA vermitteln die Translokation von AvrBs1ΔN58 unabhängig vom T3S-Chaperon HpaB im *hrpG\**-Hintergrund. Die Stämme 85\*ΔavrBs1 (ΔavrBs1), 85\*ΔavrBs1ΔhpaB (ΔavrBs1ΔhpaB) und 85\*ΔhpaBΔhrpF (ΔhpaBΔhrpF), welche kein Plasmid (-) enthalten oder die in der Abbildung beschriebenen XopA-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine synthetisierten, wurden in Paprikablätter von ECW-10R- und ECW-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert.

**B)** Im *hrpG*-Wildtypstammhintergrund sind die N-terminalen 30 Aminosäuren von XopA für eine Translokation von AvrBs1ΔN58 erforderlich. Die Translokation ist zudem von HpaB abhängig. Die Stämme 85-10ΔavrBs1 und 85-10ΔhpaB, welche kein Plasmid (-) enthalten oder die in der Abbildung beschriebenen XopA-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine synthetisierten, wurden wie in A beschrieben infiltriert.

Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der ECW-10R-Pflanzen zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Krankheitssymptome wurden neun Tage nach Inokulation fotografisch dokumentiert. Alle 85\*ΔavrBs1- und 85-10ΔavrBs1-Stämme lösten Krankheitssymptome in Blättern von ECW-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der XopA-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. Für die Proteinexpression wurden gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse in A und B wurden zweimal reproduziert.

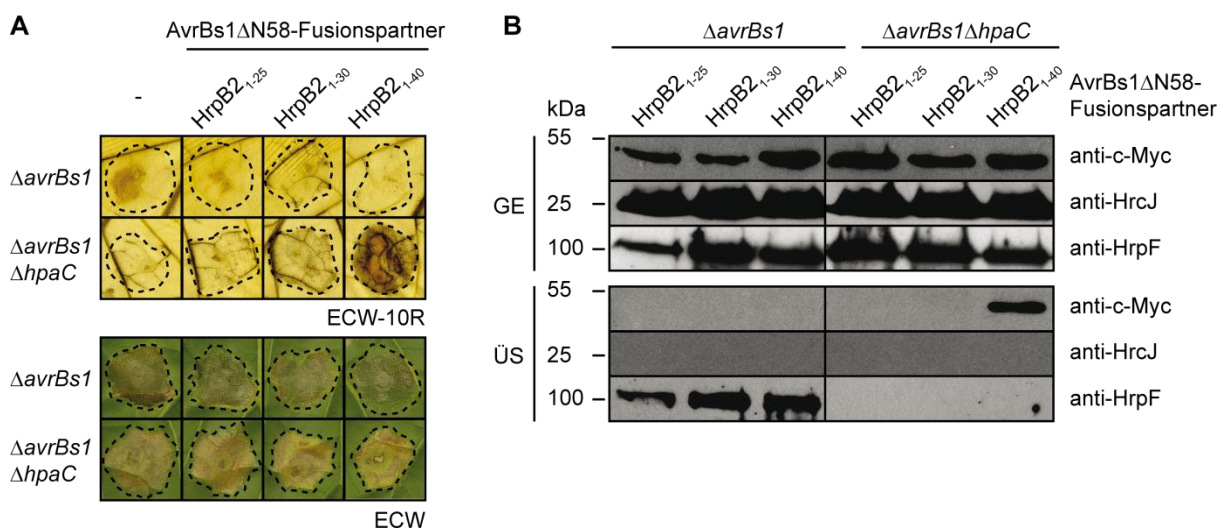
### 3.2.3 Das T3S- und Translokationssignal von HrpB2 ist notwendig und hinreichend für die Translokation von AvrBs1ΔN58

Die Ergebnisse der Translokationsstudien mit AvrBs3<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58- und XopA<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteinen haben gezeigt, dass ein Aminosäurebereich der lediglich die Sekretion des AvrBs3Δ2-Reporters vermittelte (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2), die Translokation von AvrBs1ΔN58 ermöglicht. Die Hypothese, dass allein ein T3S-Signal die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters vermittelt, sollte nun anhand von HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteinen analysiert werden. Dazu wurden die Konstrukte *hrpB2*<sub>1-25</sub>-avrBs1ΔN58, *hrpB2*<sub>1-30</sub>-avrBs1ΔN58 und *hrpB2*<sub>1-40</sub>-avrBs1ΔN58 erstellt und in die Stämme 85\*ΔavrBs1 und 85\*ΔavrBs1ΔhpaC transferiert. Da die N-terminalen 30 Aminosäuren von HrpB2, basierend auf den Ergebnissen des AvrBS3Δ2-Reporters, kein T3S-Signal enthalten (siehe Abbildung 3.1.8), sollte das Fusionsprotein HrpB2<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58 nicht transloziert werden.

Keines der HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine wurde durch den Stamm 85\*Δ*avrBs1* transloziert (Abbildung 3.2.4 A). Die Infiltration des Stammes 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaC*, welcher HrpB2<sub>1-25</sub>-AvrBs1ΔN58 oder HrpB2<sub>1-30</sub>-AvrBs1ΔN58 synthetisierte, löste keine sichtbare HR in Blättern von ECW-10R-Pflanzen aus (Abbildung 3.2.4 A). HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs1ΔN58 wurde dagegen durch den Stamm 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaC* transloziert (Abbildung 3.2.4 A). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass für eine erfolgreiche Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters ein funktionales T3S-Signal benötigt wird.

Um zu überprüfen, ob die N-terminalen 25, 30 oder 40 Aminosäuren von HrpB2 hinreichend für eine Sekretion von AvrBs1ΔN58 sind, wurde eine *in vitro*-Sekretionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde lediglich ein Signal für HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs1ΔN58 im Überstand des Stammes 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaC* mittels eines c-Myc-spezifischen Antikörpers detektiert (Abbildung 3.2.4 B). Die Sekretions- und Translokationsanalysen mit HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Derivaten lassen vermuten, dass HrpB2 ein gemeinsames T3S- und Translokationssignal in den N-terminalen 40 Aminosäuren besitzt.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die Translokation des AvrBs1ΔN58-Reporters bereits durch ein T3S-Signal erfolgt, was die Hypothese unterstützt, dass AvrBs1ΔN58 ein internes translokations-förderndes Signal enthalten könnte.



**Abbildung 3.2.4** Translokations- und Sekretionsanalysen mit verschiedenen *hrpB2*-Derivaten in translationaler Fusion mit dem *avrBs1*ΔN58-Reporter.

**A)** Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 vermitteln die Translokation von HrpB2-AvrBs1ΔN58. Die Stämme 85\*Δ*avrBs1* (Δ*avrBs1*) und 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaC* (Δ*avrBs1*Δ*hpaC*), welche die in der Abbildung dargestellten HrpB2-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine enthalten, wurden in Paprikablätter von ECW-10R- und ECW-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $3 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Alle 85\*Δ*avrBs1*-Stämme lösten Krankheitssymptome in Blättern von ECW-Pflanzen aus, sodass ein negativer Einfluss der HrpB2<sub>1-x</sub>-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine auf das T3S-System ausgeschlossen werden kann. Die Synthese der jeweiligen Fusionsproteine ist im Gesamtzellextrakt von (B) dargestellt. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin.

**B)** Die N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 vermitteln die Sekretion von HrpB2-AvrBs1ΔN58. Die Stämme 85\*Δ*avrBs1* (Δ*avrBs1*) und 85\*Δ*avrBs1*Δ*hpaC* (Δ*avrBs1*Δ*hpaC*), welche die in der Abbildung dargestellten HrpB2-AvrBs1ΔN58-Fusionsproteine enthalten, wurden in MA-Medium inkubiert. Gesamtzellextrakte (GE) und Überstände (ÜS) wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung von c-Myc-, HrcJ- und HrpF-spezifischen Antikörpern untersucht. HrpF wurde durch die 85\*-Stämme sekretiert, sodass ein negativer Einfluss der *hrpB2*<sub>1-x</sub>-*avrBs1*ΔN58-Expressionskonstrukte auf die T3S ausgeschlossen werden kann. In Abwesenheit von HpaC ist die HrpF-Sekretion reduziert (Lorenz *et al.*, 2008a). HrcJ wurde in den GE, jedoch nicht in den ÜS detektiert, sodass vermutlich keine Lysis der Bakterien aufgetreten ist. Alle Versuchsergebnisse wurden zweimal reproduziert.



### 3.3 Translokation von Proteinen ohne Translokonprotein

#### 3.3.1 Translokon-unabhängige Translokation von TAL-Effektoren in Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen von *Xcv*

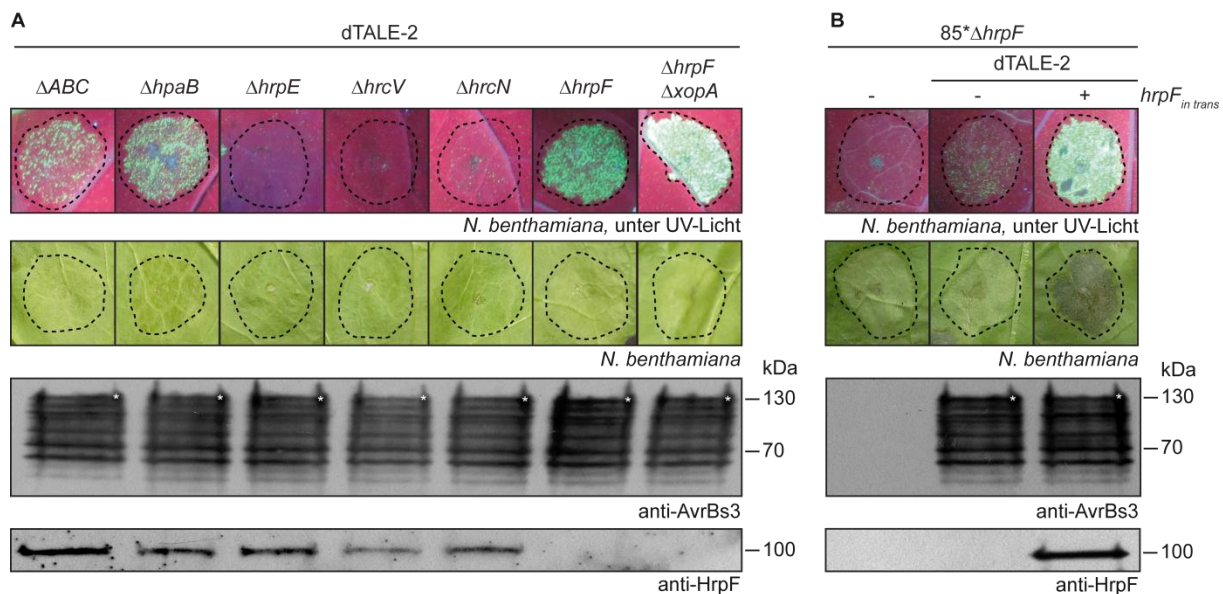
##### dTALE-2 wird partiell Translokon-unabhängig transloziert

Für die Überprüfung der T3-abhängigen Translokation des dTALE-2 wurden neben einer *hpaABC-hrcN*-Mutante (siehe Abbildung 3.1.11) fünf weitere T3-defiziente Stämme verwendet. Dazu wurde das Konstrukt dTALE-2 in  $85^*\Delta hrpE$ ,  $85^*\Delta hrcV$ ,  $85^*\Delta hrcN$ ,  $85^*\Delta hrpF$  und die Doppelmutante  $85^*\Delta hrpF\Delta xopA$  elektroporiert und die erhaltenen Stämme anschließend in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Neben HrpF wird auch XopA als ein mögliches Translokonprotein diskutiert, da eine *xopA*-Mutante eine reduzierte Pathogenität aufweist, die T3-abhängige *in vitro*-Sekretion jedoch unbeeinflusst ist (Noël *et al.*, 2002).

Die Stämme  $85^*\Delta hrpE$ ,  $85^*\Delta hrcV$  und  $85^*\Delta hrcN$ , welche jeweils das dTALE-2-Expressionskonstrukt enthielten, lösten keine detektierbare GFP-Fluoreszenz in *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen aus (Abbildung 3.3.1 A). Wie erwartet sind sowohl das Pilusprotein HrpE, die konservierte innere Membran- und Exportapparatkomponente HrcV und die ATPase HrcN essentiell für die Translokation von dTALE-2. Die Stämme  $85^*\Delta ABC$ ,  $85^*\Delta hrpF$  und  $85^*\Delta hrpF\Delta xopA$  translozierten den dTALE-2. Jedoch verursachten die *hrpF*- und *hrpF-xopA*-Mutante ein, im Vergleich zur *hpaABC*-Mutante, stärkeres GFP-Signal sechs Tage nach der Infiltration in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Blätter (Abbildung 3.3.1 A).

Wurde die *hrpF*-Mutante (mit dem dTALE-2) mit einer geringeren Bakteriendichte von  $10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert, wurden fünf Tage nach der Infektion nur punktuelle GFP-Fluoreszenzsignale detektiert (Abbildung 3.3.1 B). Um zu überprüfen, ob die HrpF-unabhängige Translokation des dTALE-2 tatsächlich auf die Deletion des korrespondierenden Gens zurückzuführen ist, wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Der Phänotyp einer *hrpF*-Mutante, die den dTALE-2 synthetisiert und reduziert transloziert, wurde durch die ektopische Expression von *hrpF* unter der Kontrolle des nativen Promotors komplementiert. Dabei wurde im Vergleich zur *hrpF*-Mutante (mit dem dTALE-2) ohne Komplementationskonstrukt eine stärkere GFP-Fluoreszenz für den komplementierten Stamm festgestellt, (Abbildung 3.3.1 B).

Wie zu erwarten war, verursachten alle Stämme keine sichtbare Reaktion auf Blättern von *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen, wenn diese ohne UV-Licht analysiert wurden (Abbildung 3.3.1 A und B). Einzig die Infiltration der mit *hrpF in trans* komplementierten *hrpF*-Mutante führte wie erwartet zu einer Nekrose im Infektionsbereich (Abbildung 3.3.1 B). Die GFP-Fluoreszenz wurde nicht durch die Nekrose überlagert, da die GFP-Fluoreszenz zu einem früheren Zeitpunkt, als die Nekrose sichtbar war. Die Ergebnisse führen zur Annahme, dass es sich möglicherweise um eine partielle Translokon-unabhängige, aber dennoch vom T3S-System abhängige Translokation des dTALE-2 handeln könnte.



**Abbildung 3.3.1 Die Translokation von dTALE-2 ist partiell unabhängig vom putativen Translokonprotein HrpF und XopA, jedoch abhängig vom T3S-System.**

**A)** dTALE-2 wird durch den Stamm  $85^* \Delta hrpF$  und  $85^* \Delta hrpF \Delta xopA$  in *N. benthamiana* transloziert. Die Stämme  $85^* \Delta hpaABC$  ( $\Delta ABC$ ),  $85^* \Delta hpaB$  ( $\Delta hpaB$ ),  $85^* \Delta hrpE$  ( $\Delta hrpE$ ),  $85^* \Delta hrcV$  ( $\Delta hrcV$ ),  $85^* \Delta hrcN$  ( $\Delta hrcN$ ),  $85^* \Delta hrpF$  ( $\Delta hrpF$ ) und  $85^* \Delta hrpF \Delta xopA$  ( $\Delta hrpF \Delta xopA$ ), welche den dTALE-2 synthetisieren, wurden in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE  $ml^{-1}$  infiltriert. Die Bilder der GFP-Fluoreszenz wurden 6 Tage nach der Inokulation aufgenommen. Phänotypische Reaktionen wurden ebenfalls 6 Tage nach der Inokulation fotografisch festgehalten.

**B)** Die *in trans*-Komplementation mit *hrpF* zeigt, dass die Translokation von dTALE-2 partiell vom Translokonprotein HrpF abhängig ist. Der Stamm  $85^* \Delta hrpF$  ( $\Delta hrpF$ ), welcher kein Plasmid (-), dTALE-2 oder dTALE-2 und *hrpF* unter der Kontrolle des nativen Promotors (+, *hrpF*<sub>*in trans*</sub>) enthält, wurde in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $10^8$  KBE  $ml^{-1}$  infiltriert. Die Bilder der GFP-Fluoreszenz wurden 5 Tage nach der Inokulation aufgenommen. Phänotypische Reaktionen wurden 12 Tage nach der Inokulation fotografisch festgehalten.

Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Für den Proteinsynthesenachweis wurden jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung von AvrBs3- und HrpF-spezifischen Antikörpern analysiert. Die mit einem (\*) markierten Signale entsprechen dem dTALE-2, während die darunter liegenden Signale vermutlich Abbauprodukte des Proteins sind. Im Fall von *hrpF*-Mutanten wurde wie erwartet kein Signal mittels HrpF-spezifischer Antikörper detektiert. Die Versuchsergebnisse in A und B wurden mindestens zweimal reproduziert.

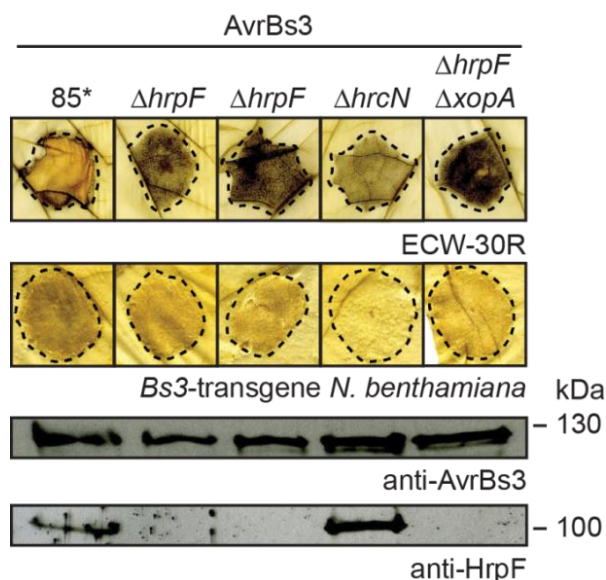
#### AvrBs3 kann vermutlich Translokon-unabhängig transloziert werden

Auf Grund der hohen Ähnlichkeit des dTALE-2 zu AvrBs3, stellte sich die Frage, ob auch AvrBs3 Translokon-unabhängig transloziert wird. Deswegen wurden die Stämme  $85^*$ ,  $85^* \Delta hrcN$ ,  $85^* \Delta hrpF$  sowie die Doppelmutante  $85^* \Delta hrpF \Delta xopA$ , welche jeweils AvrBs3 synthetisierten, in Blätter von ECW-30R-Pflanzen und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Die verwendeten transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen besitzen, wie auch die ECW-30R-Pflanzen, das *Bs3*-Resistenzgen, wodurch in Folge einer Translokation von AvrBs3 eine spezifische HR an der Infektionsstelle ausgelöst wird.

AvrBs3 wurde durch den Stamm  $85^*$ , nicht aber durch den Stamm  $85^* \Delta hrcN$ , in ECW-30R-Blätter und *Bs3*-transgene *N. benthamiana*-Blätter transloziert, was zu einer AvrBs3-spezifischen HR führte (Abbildung 3.3.2). Eine Dunkelfärbung des Blattgewebes an der Infektionsstelle von ECW-30R-Blättern, wurde nach der Infiltration der Stämme  $85^* \Delta hrpF$ ,  $85^* \Delta hrcN$  und  $85^* \Delta hrpF \Delta xopA$ , welche AvrBs3 synthetisierten beobachtet (Abbildung 3.3.2).

Im Vergleich zur *hrcN*-Mutante, wiesen die Infektionsstellen beider *hrpF*-Mutanten und der *hrpF-xopA*-Mutante eine dunklere Verfärbung des Blattgewebes auf. Eine Translokation des Effektors AvrBs3 könnte eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung gewesen sein.

Um die mögliche Translokation von AvrBs3 zu bestätigen, wurden die Stämme in Blätter von *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Der Stamm 85\* löste dabei eine Nekrose im Blattgewebe aus, die nicht von einer HR unterschieden werden konnte (Abbildung 3.3.2). Im Gegensatz zum Stamm 85\* $\Delta$ *hrcN* löste die Infiltration von 85\* $\Delta$ *hrpF* und 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA*, mit dem *avrBs3*-Expressionskonstrukt, eine HR in *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Blättern aus (Abbildung 3.3.2). Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass AvrBs3 Translokation-unabhängig transloziert werden könnte. Dies ist jedoch im Widerspruch zu bisher publizierten Daten, in denen eine HrpF-abhängige Translokation von AvrBs3 gezeigt wurde (Szurek *et al.*, 2002).



**Abbildung 3.3.2 Die Translokation von AvrBs3 ist vermutlich partiell unabhängig von den putativen Translokationproteinen HrpF und XopA.**

AvrBs3 wird durch den Stamm 85\* $\Delta$ *hrpF* und 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA* transloziert. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF* ( $\Delta$ *hrpF*), 85\* $\Delta$ *hrcN* ( $\Delta$ *hrcN*) und 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA* ( $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA*), welche AvrBs3 synthetisierten, wurden in Blätter von ECW-30R- und *Bs3*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR, wurden die Blätter der ECW-30R- und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen 2 - 3 Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines AvrBs3- und HrpF-spezifischen Antikörpers analysiert. Im Fall der *hrpF*-Mutanten wurde wie erwartet kein Signal mittels HrpF-spezifischer Antikörper detektiert. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

### 3.3.2 Nachweis der Translokon-unabhängigen Translokation von AvrBs3 mittels Transkriptanalysen von *UPA20* und *Bs3*

Die Infektionsexperimente (Kapitel 3.3.1) lieferten gute Indizien für eine mögliche Translokon-unabhängige Translokation von dTALE-2 und AvrBs3. Um weitere Hinweise zu erhalten, ob AvrBs3 in Abwesenheit von HrpF transloziert werden kann, wurden sowohl quantitative als auch semiquantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Wenn im Folgenden die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF*, 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA* oder 85\* $\Delta$ *hrcN* erwähnt werden, handelt es sich um Stämme die das *avrBs3*-Expressionskonstrukt enthalten.

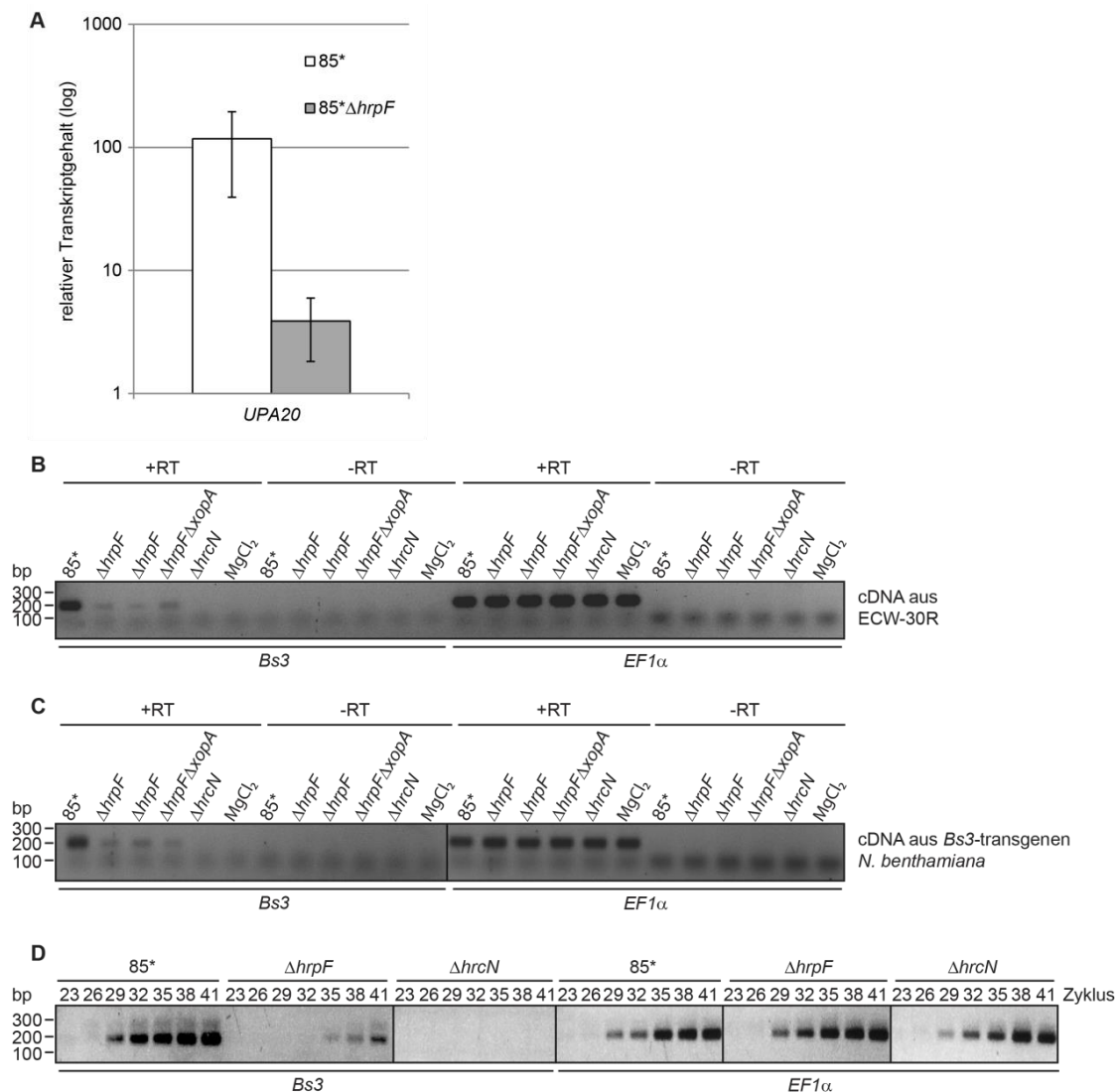
AvrBs3 induziert bei erfolgreicher Translokation, neben dem *Bs3*-Resistenzgen auch über 20 *UPA*-Gene („upregulated by AvrBs3“). Eines dieser *UPA*-Gene ist *UPA20*, das einen Zellgrößenregulator kodiert, dessen Expression in suszeptiblen Pflanzen eine Hypertrophie auslöst (Kay *et al.*, 2007). Zur Analyse des relativen Transkriptgehalts von *UPA20* wurden die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF* und 85\* $\Delta$ *hrcN* sowie das Infiltrationsmedium (MgCl<sub>2</sub>) allein in Blätter von ECW-30R-Pflanzen infiltriert. Nach acht Stunden wurde, wie im Material- und Methodenteil (Kapitel 2.2.1.12) beschrieben, Blattmaterial entnommen und anschließend daraus die Gesamt-RNA isoliert. Im Anschluß wurde die Gesamt-RNA in eine cDNA umgeschrieben und als „template“ in eine qRT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (Kapitel 2.2.1.12). Als Referenzgene wurde der Elongationsfaktor 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) (Römer *et al.*, 2007) sowie die Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolase (*UCH*) verwendet (Müller *et al.*, 2015). Die erhaltenen „cycle threshold“ (Ct)-Werte für das jeweilige Blattgewebe, in dem die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF*, 85\* $\Delta$ *hrcN* infiltriert worden sind, wurden auf die *hrcN*-Mutante bezogen, welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde.

Im Vergleich zu Blattgewebe, dass mit einer *hrcN*-Mutante infiltriert wurde, wies das Blattgewebe, dass mit dem Stamm 85\* bzw. 85\* $\Delta$ *hrpF* infiltriert wurde einen ca. 100-fachen bzw. ca. 4-fachen Anstieg in der Transkriptmenge von *UPA20* auf (Abbildung 3.3.3 A). Insgesamt wurde in vier der fünf durchgeführten Experimente eine Induktion von *UPA20* durch eine *hrpF*-Mutante verzeichnet. Ein statistischer Test hat jedoch gezeigt, dass die Induktion von *UPA20* nicht signifikant ist (t-Test: p = 0,052).

Um die Translokation von AvrBs3 zu verifizieren wurde zusätzlich der Transkriptgehalt von *Bs3* mittels semiquantitativer RT-PCR-Analysen nachgewiesen. Dazu wurde die gewonnene cDNA (aus ECW-30R- und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen, die mit 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF*, 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA*, 85\* $\Delta$ *hrcN* oder MgCl<sub>2</sub> infiltriert wurden) als „template“ in eine PCR eingesetzt (Kapitel 2.2.1.12) und mittels spezifischer Oligonukleotide ein Fragment des Resistenzgens *Bs3* amplifiziert. Zur Normalisierung diente der *EF1 $\alpha$* .

Anders als in cDNA-Proben von ECW-30R- und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen nach Infiltration von 85\* wurde nach Infiltration von 85\* $\Delta$ *hrcN* oder MgCl<sub>2</sub> kein spezifisches Produkt für das *Bs3*-cDNA-Fragment detektiert (Abbildung 3.3.3 B und C). Im Vergleich zu 85\* waren die Signale für das *Bs3*-cDNA-Fragment nach der Infiltration der *hrpF*- und *hrpF*-*xopA*-Mutanten abgeschwächt (Abbildung 3.3.3 B und C). Die Signale für das *Bs3*-cDNA-Fragment sind spezifisch und nicht auf eine DNA-Kontamination zurückzuführen, da in der –RT-Kontrolle (cDNA-Synthese, ohne reverse Transkriptase) kein sichtbares Produkt amplifiziert wurde (Abbildung 3.3.3 B und C). Durch den Nachweis von *Bs3*-Transkript wurde indirekt gezeigt, dass AvrBs3 transloziert und die Transkription von *Bs3* initiiert wurde. Die isolierte cDNA, aus mit 85\* $\Delta$ *hrpF* und 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA* infiltrierten ECW-30R-Blättern und *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Blättern, enthielt nur geringe Mengen an *Bs3*, da AvrBs3 in Abwesenheit des Translokons wahrscheinlich nicht effizient transloziert wurde. Allerdings zeigten RT-PCR-Analysen von cDNA-Proben aus ECW-30R-Pflanzen, die mit 85\* $\Delta$ *hrpF* infiltriert wurden, ein spezifisches *Bs3*-cDNA-Fragment ab dem 35. Zyklus (Abbildung 3.3.3 D). Für das *EF1 $\alpha$* -Fragment wurde in allen Stämmen ein vergleichbares Signal detektiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass gleiche cDNA-Mengen eingesetzt worden sind (Abbildung 3.3.3 B, C und D).

Zusammenfassend mit den Infektionsexperimenten (Kapitel 3.3.1) sowie den quantitativen und semiquantitativen RT-PCR-Analysen, war es möglich eine Translokon-unabhängige Translokation des TAL-Effektors AvrBs3 über das T3S-System nachzuweisen.



**Abbildung 3.3.3** qRT- und RT-PCR-Analysen zeigen einen Anstieg im Transkriptgehalt von *UPA20* und *Bs3* nach Infiltration einer *hrpF*-Mutante, welche *avrBs3* exprimiert.

**A)** Analyse der Transkriptmenge von *UPA20* mittels qRT-PCR, nach Infiltration einer *hrpF*-Mutante, welche *avrBs3* exprimiert. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF* ( $\Delta$ *hrpF*) und 85\* $\Delta$ *hrcN* ( $\Delta$ *hrcN*), welche *AvrBs3* synthetisierten wurden in Blätter von ECW-30R-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Acht Stunden nach der Inokulation wurden Blattscheiben geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde der Transkriptgehalt von *UPA20* mittels qRT-PCR bestimmt. Die erhaltenen Ct-Werte wurden mit Hilfe der Referenzgene *EF1 $\alpha$*  und *UCH* normalisiert. Der relative Transkriptgehalt wurde jeweils auf die *hrcN*-Mutante bezogen, welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von fünf biologischen Replikaten.

**B und C)** RT-PCR-Analysen zeigen, dass *Bs3*-cDNA nach Infiltration einer *hrpF*-Mutante oder einer *hrpF-xopA*-Doppelmutante, welche jeweils *avrBs3* exprimierten, amplifiziert werden kann. Dies wurde sowohl für cDNA aus infizierten ECW-30R-Pflanzen (B), als auch für cDNA aus infizierten *Bs3*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen (C) nachvollzogen. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF* ( $\Delta$ *hrpF*), 85\* $\Delta$ *hrcN* ( $\Delta$ *hrcN*) und 85\* $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA* ( $\Delta$ *hrpF* $\Delta$ *xopA*), welche *AvrBs3* synthetisierten und das Infiltrationsmedium allein (MgCl<sub>2</sub>), wurden wie in A beschrieben infiltriert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte ebenfalls wie in A beschrieben. Ein *Bs3*-cDNA-Fragment (ca. 200 bp) wurde mittels spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Zur Kontrolle wurde mittels spezifischer Oligonukleotide ein *EF1 $\alpha$* -cDNA-Fragment (ca. 200 bp) amplifiziert. +RT, cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase; -RT, cDNA-Synthese ohne reverser Transkriptase (Negativkontrolle). Bei den jeweils unteren Banden im Agarosegel handelt es sich um ein unspezifisches Signal.

**D)** Eine steigende Zyklusanzahl in der RT-PCR bestätigt die Akkumulation von *Bs3*-Transkript in infizierten Paprikapflanzen, nach Inokulation einer *hrpF*-Mutante, welche *avrBs3* exprimiert. Nach 35 Zyklen wurde ein spezifisches *Bs3*-cDNA-Fragment detektiert. Die Stämme 85\*, 85\* $\Delta$ *hrpF* ( $\Delta$ *hrpF*) und 85\* $\Delta$ *hrcN* ( $\Delta$ *hrcN*), welche *AvrBs3* synthetisierten, wurden wie in A beschrieben in Blätter von ECW-30R-Pflanzen infiltriert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte ebenfalls wie in A beschrieben. *Bs3*- und *EF1 $\alpha$* -cDNA-Fragmente wurden mittels spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Proben der RT-PCR wurden nach 23, 26, 29, 32, 35, 38 und 41 Zyklen mittels Gelelektrophorese analysiert. Bei den jeweils oberen Banden im Agarosegel handelt es sich um ein unspezifisches Signal. Die Versuchsergebnisse in B - D wurden zweimal reproduziert.

### 3.4 Die putativen T4S-Systeme von *Xcv*

*Xcv* besitzt Gene aller bisher beschriebenen Sekretionssysteme von Gram-negativen Bakterien. Auf dem Plasmid pXCV38 sind neun Gene lokalisiert, die Komponenten eines möglichen T4AS-Systems kodieren, das Homologien zum VirB/VirD4 T4S-System von *A. tumefaciens* aufweist. Ein zehntes *vir*-Gen befindet sich auf dem Chromosom, sodass insgesamt 10 der 12 beschriebenen Komponenten des T4AS-Systems in *Xcv* vorhanden sind. Auf dem Größten der vier Plasmide (pXCV183) konnten 15 Gene identifiziert werden, die möglicherweise ein weiteres putatives T4S-System kodieren. Dieses weist Ähnlichkeiten zum Dot/Icm T4S-System von den humanpathogenen Bakterien *Legionella pneumophila* und *Coxiella burnetii* auf. *Xcv* ist damit das erste bekannte pflanzenpathogene Bakterium, welches ein putatives T4BS-System besitzt. Für eine Vielzahl von pathogenen Bakterien konnte bereits die Notwendigkeit von T4S-Systemen für die Pathogenität gezeigt werden. Ob die identifizierten T4S-Systeme in *Xcv* funktional sind und einen Einfluss auf die Virulenz haben ist bisher gänzlich unbekannt.

#### 3.4.1 Der Einfluss des T4AS-Systems auf die Virulenz von *Xanthomonas*

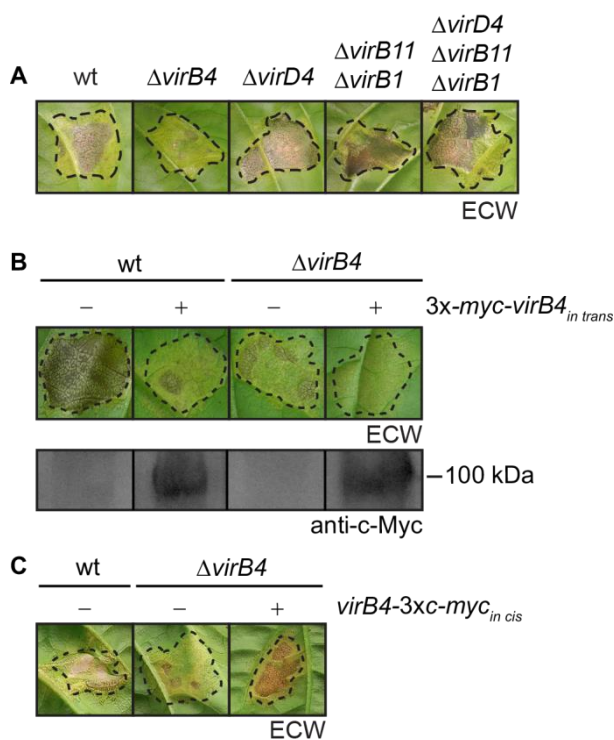
Da in der Regel ATPasen die Energie für die Sekretion bereitstellen und somit essentieller Bestandteil eines Sekretionssystems sind, wurden *Xcv*-Mutanten analysiert in denen die Gene *virB4*, *virD4* und/oder *virB11*, welche jeweils mögliche ATPasen kodieren, deletiert sind. Im Fall der Deletion von *virB11* wurde zusätzlich das Gen *virB1* deletiert, da die letzten 12 Basenpaare von *virB11* mit *virB1* überlappen (Abbildung 1.3). VirB1 ist eine lytische Transglycosylase und ermöglicht unter anderem in *A. tumefaciens* die Insertion des Sekretionssystems im Periplasma (Zupan *et al.*, 2007).

Die Infiltration der Stämme 85-10, 85-10 $\Delta$ *virD4*, 85-10 $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1* und 85-10 $\Delta$ *virD4* $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1* führte in suszeptiblen Pflanzen zu wässrigen Läsionen, welche im weiteren Infektionsverlauf nekrotisch wurden (Abbildung 3.4.1 A). Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine Deletion von *virD4* oder *virB11* und *virB1* keinen sichtbaren Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* hat. Eine *virB4*-Mutante löste, im Vergleich zum Wildtypstamm reduzierte Krankheitssymptome in ECW-Pflanzen aus (Abbildung 3.4.1 A). Basierend auf diesem Ergebnis kann spekuliert werden, dass die ATPase VirB4 möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur Virulenz von *Xcv* leistet.

Um bestätigen zu können, dass der oben genannte Virulenzeffekt tatsächlich auf den Verlust von *virB4* zurückzuführen ist, wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob die ektopische Expression von *virB4* den Phänotyp einer *virB4*-Mutante komplementieren kann. Dazu wurde *virB4* per PCR amplifiziert und anschließend in verschiedene pBRM-Derivate kloniert, die eine translationale Fusion von VirB4 mit einem C- oder N-terminalen Myc-Epitop erlauben, sowie eine VirB4-Variante ohne Epitop-Markierung. Das Gen *virB4* wurde in jedem Fall unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimiert.

Die erstellten *virB4*-Konstrukte wurden in den Wildtypstamm und die *virB4*-Mutante konjugiert. Vorläufige Experimente haben gezeigt, dass sowohl die ektopische Expression von *virB4-3x-myc* als auch *virB4* (ohne Epitop-kodierende Sequenz) den Phänotyp einer *virB4*-Mutante nicht oder nur partiell komplementieren (Daten nicht gezeigt). Eine *virB4*-Mutante, welche *3x-myc-virB4* exprimiert, löste ebenfalls keine Krankheitssymptome in Blättern von ECW-Pflanzen aus (Abbildung 3.4.1 B). Die jeweiligen VirB4-Protein-Derivate wurden in jedem Fall stabil synthetisiert. Eine ektopische Expression von *virB4* ermöglicht in diesem Fall demnach nicht die Komplementation des *virB4*-Mutanten-Phänotyps.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine Überexpression von *virB4* auf die Virulenz des Wildtypstammes hat, wurde der Stamm 85-10, welcher *3x-Myc-VirB4* synthetisierte, in ECW-Blätter infiltriert. Die Infiltration von 85-10, der *3x-myc-virB4* exprimiert, führte im Vergleich zum Wildtypstamm ohne Konstrukt zu reduzierten Krankheitssymptomen (Abbildung 3.4.1 B). Die erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Überexpression von *virB4* einen dominant-negativen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* haben könnte.



**Abbildung 3.4.1 Phänotypische Analyse von Stämmen mit Deletionen in Genen des T4AS-Systems.**

**A)** Die Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta$ *virB4* ( $\Delta$ *virB4*), 85-10 $\Delta$ *virD4* ( $\Delta$ *virD4*), 85-10 $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1* ( $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1*) und 85-10 $\Delta$ *virD4* $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1* ( $\Delta$ *virD4* $\Delta$ *virB11* $\Delta$ *virB1*) wurden in Blätter von ECW-Pflanzen mit einer Bakteriedichte von  $0,2 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert.

**B)** Die *virB4*-Mutante wurde nicht durch die ektopische Expression von *3x-myc-virB4*<sub>in trans</sub> komplementiert. Die Stämme 85-10 (wt) und 85-10 $\Delta$ *virB4*, welche kein Plasmid (-) oder *3x-myc-virB4*<sub>in trans</sub> (+) enthielten, wurden wie in A beschrieben in ECW-Pflanzen infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert.

**C)** Die *in cis* Integration von *virB4* komplementiert den Phänotyp einer *virB4*-Mutante. Die Stämme 85-10 (wt) und 85-10 $\Delta$ *virB4*, welche kein Plasmid (-) oder *virB4-3xc-myc*<sub>in cis</sub> (+) enthielten, wurden in ECW-Pflanzen mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert.

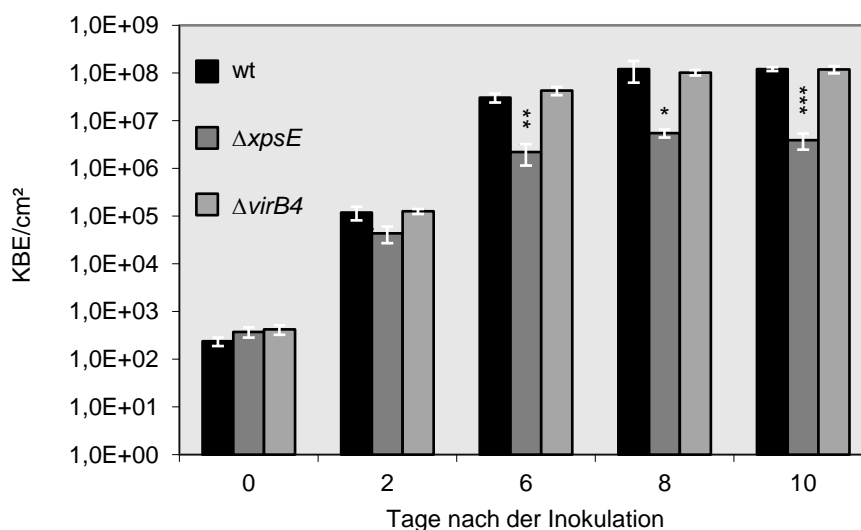
Krankheitssymptome auf ECW-Pflanzen wurden jeweils nach sieben Tagen fotografisch dokumentiert. Umrandungen in A, B und C weisen auf die Inokulationsstellen hin. Alle Versuchsergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Die hohe Kopienzahl des pBRM-Plasmids und die damit einhergehende erhöhte Transkriptmenge von *virB4* könnte die Ursache für den Überexpressionseffekt sein (siehe Abbildung 3.4.1 B). Um diesem möglichen Überexpressionseffekt entgegenzuwirken erfolgte als nächstes die Integration von *virB4* in das Genom eines 85-10 $\Delta$ *virB4*-Stammes. Die *in cis*-Integration erfolgte mit Hilfe des Vektors pLAND, in die *hpaF-hpaG*-Region des korrespondierenden *Xcv*-Stammes (Huguet *et al.*, 1998). Für die *hpaF-hpaG*-Region konnte bereits gezeigt werden, dass diese keinen Einfluss auf die Pathogenität von *Xcv* hat und somit



als möglicher Integrationsort von Genen dienen kann (Lorenz *et al.*, 2012, Noël *et al.*, 2002, Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Die Infiltration der *virB4*-Mutante führte wie erwartet zu reduzierten Krankheitssymptomen im Vergleich zum Wildtypstamm (Abbildung 3.4.1 C). Der Phänotyp einer *virB4*-Mutante wurde durch die *in cis*-Integration von *virB4-3xc-myc* vollständig komplementiert (Abbildung 3.4.1 C). Die Komplementationsanalysen lassen den Schluss zu, dass VirB4 einen wichtigen Beitrag zur Virulenz in *Xcv* leistet.

Um zu untersuchen, ob die reduzierten Krankheitssymptome einer *virB4*-Mutante mit einem geringeren Wachstum der Bakterien einhergehen, wurden *in planta* Wachstumsanalysen in Blättern von suszeptiblen Paprikapflanzen mit dem Stamm 85-10 $\Delta virB4$  durchgeführt. Als Kontrolle diente dabei der Wildtypstamm 85-10 sowie der Stamm 85-10 $\Delta xpsE$ , für welchen bereits gezeigt werden konnte, dass dieser ein reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm aufzeigt (Szczesny *et al.*, 2010). Das Gen *xpsE* kodiert eine ATPase, die eine essentielle Komponente des T2S-Systems darstellt (Szczesny *et al.*, 2010). Die Deletion von *xpsE* führte wie erwartet zu einem signifikant reduzierten Wachstum der Bakterien, im Vergleich zum Wildtypstamm (Abbildung 3.4.2). Im Gegensatz dazu wurde auch nach 10 Tagen für den Stamm 85-10 $\Delta virB4$  kein verändertes Wachstum der Bakterien im Vergleich zum Wildtypstamm festgestellt (Abbildung 3.4.2). Die *in planta* Wachstumsanalysen lassen somit vermuten, dass die Deletion von *virB4* keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *Xcv* hat.



**Abbildung 3.4.2 Die Deletion von *virB4* hat keinen signifikanten Einfluss auf das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Paprikapflanzen.**

Die Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta xpsE$  ( $\Delta xpsE$ ) und 85-10 $\Delta virB4$  ( $\Delta virB4$ ) wurden in Blätter von ECW-Paprikapflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $10^4$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Das bakterielle Wachstum wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht. Dargestellte Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung von drei Proben aus drei verschiedenen Pflanzen von einem repräsentativen Experiment. Der Grad der Signifikanz wird jeweils durch Sternchen (\*) markiert, bezieht sich auf den Wildtypstamm und wurde mittels t-Test errechnet. \*, Signifikant:  $p < 0,05$ ; \*\*, sehr signifikant:  $p < 0,01$ ; \*\*\*, hochsignifikant:  $p < 0,001$ . Das Versuchsergebniss wurde zweimal reproduziert.

### 3.4.2 Der Einfluss des T4BS-Systems auf die Virulenz von *Xanthomonas*

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass die Deletion der Gene *icmE*, *dotC* und *dotB* des putativen T4BS-Systems möglicherweise einen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* haben könnte (Solé und Büttner, unpubliziert). Eine Komplementation des *icmE*- und *dotCB*-Mutantenphänotyps war bisher jedoch nicht möglich.

Um dem möglichen Virulenzeffekt von *icmE*, *dotC* und *dotB* von *Xcv* weiter nach zu gehen, wurden Einzel-, Doppel- und Triple-Deletionsmutanten in Blättern von suszeptiblen ECW-Paprikapflanzen infiltriert und die Reaktionen mit dem Wildtypstamm 85-10 verglichen. Im Vergleich zum Wildtypstamm, verursachte wie erwartet die *icmE*-Mutante und die *dotCB*-Doppelmutante reduzierte Krankheitssymptome (Abbildung 3.4.3 A) (Solé und Büttner, unpubliziert). Die Infiltration einer *icmE-dotCB*-Triplemutante zeigte ebenfalls reduzierte Krankheitssymptome, die jedoch vergleichbar mit denen der *icmE*- und *dotCB*-Mutante waren (Abbildung 3.4.3 A). Da die Triplemutante ( $\Delta icmE \Delta dotCB$ ) keinen verstärkten Virulenzeffekt im Vergleich zur *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutante aufwies, wurde ein möglicher additiver Effekt durch die zusätzliche Deletion von *virB4* untersucht. Die Infiltration des Stammes 85-10 $\Delta virB4 \Delta icmE \Delta dotCB$  führte wie erwartet zu reduzierten Krankheitssymptomen im Vergleich zum Wildtypstamm, jedoch nicht zu reduzierten Symptomen im Vergleich zu allen anderen infiltrierten Mutanten-Stämmen (Abbildung 3.4.3 A). Den Ergebnissen zur Folge kann vermutet werden, dass beide T4S-Systeme nicht additiv wirken.

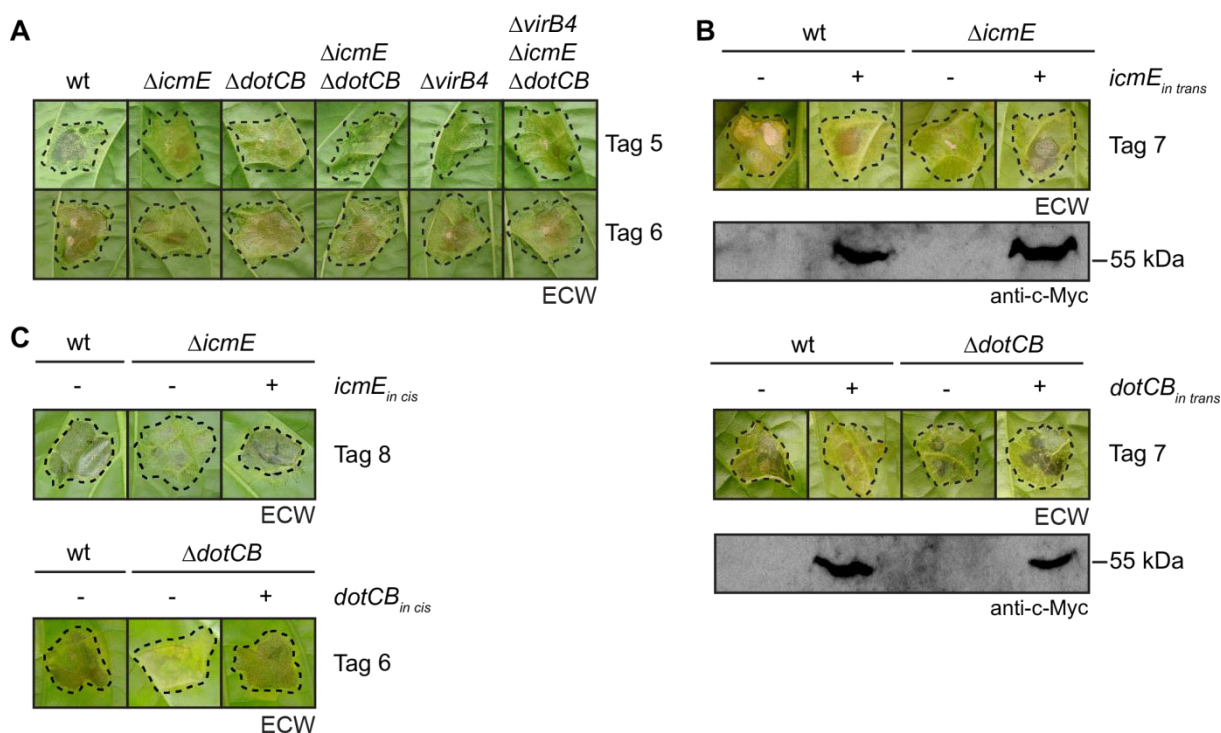
Um zu überprüfen, ob die Phänotypen der *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutante tatsächlich auf die Deletion der korrespondierenden Gene zurückzuführen sind wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Gene *icmE* bzw. *dotCB* unter der Kontrolle des XCV0160-Promotors in den korrespondierenden Mutanten sowie im Stamm 85-10 ektopisch exprimiert. Expressionstests haben gezeigt, dass der XCV0160-Promotor zu einer schwächeren Expression eines Zielgens, im Vergleich zum *lac*-Promotor führt (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Bei XCV0160 handelt es sich laut Genomanalyse des Stammes 85-10 um eine patatin-ähnliche Phospholipase.

Sowohl die *icmE*-Mutante, welche *IcmE*-3xc-Myc stabil synthetisierte, als auch die *dotCB*-Mutante, welche *DotCB*-3xc-Myc stabil synthetisierte lösten weiterhin reduzierte Krankheitssymptome im Vergleich zum Stamm 85-10 aus (Abbildung 3.4.3 B). Somit führte die ektopische Expression von *icmE* bzw. *dotCB* unter der Kontrolle des XCV0160-Promotors nicht zur Komplementation des *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutantenphänotyps.

Im Wildtypstamm führte die Überexpression von *icmE-3xc-myc* und *dotCB-3xc-myc* zu einem dominant-negativen Effekt, was sich in reduzierten Krankheitssymptomen im Vergleich zum Wildtypstamm ohne Konstrukt zeigte (Abbildung 3.4.3 B).

Aufgrund des dominant-negativen Effekts erfolgte die *in cis*-Integration von *icmE-3xc-myc* bzw. *dotCB-3xc-myc* in die *hpaF-hpaG*-Region des korrespondierenden Deletionsstammes. Die im Vergleich zum Wildtypstamm reduzierten Krankheitssymptome der *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutante wurden durch die *in cis*-Expression von *icmE-3xc-myc* bzw. *dotCB-3xc-myc* vollständig komplementiert (Abbildung 3.4.3 C).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Infektionsexperimente den Schluss zu, dass sowohl IcmE als auch DotC und/oder DotB einen Beitrag zur Virulenz von *Xcv* leisten und dass die Überexpression dieser Gene vermutlich einen negativen Effekt auf die Virulenz des Bakteriums ausübt.



**Abbildung 3.4.3 IcmE sowie DotC und/oder DotB haben einen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv*.**

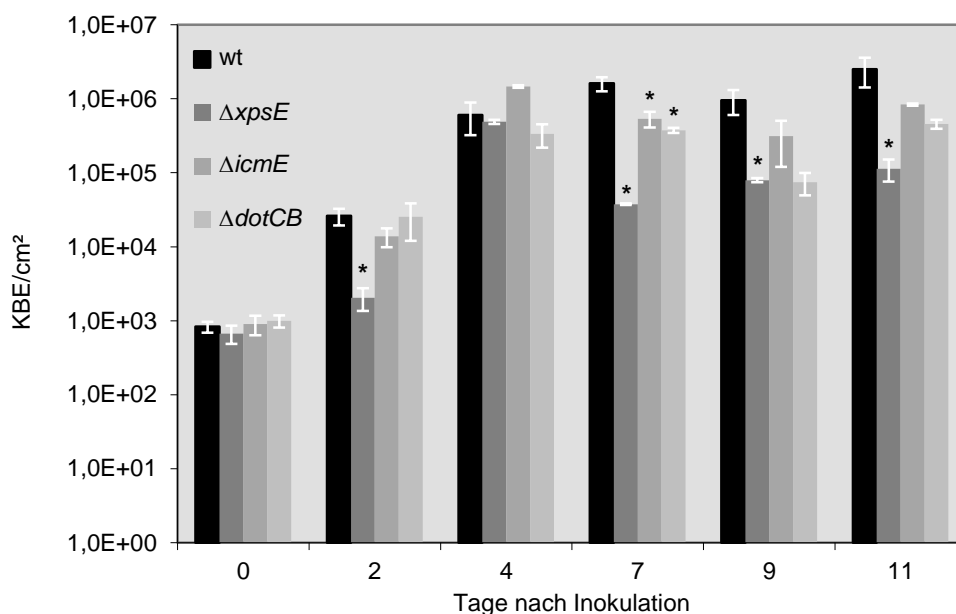
**A)** Phänotypische Analyse von Stämmen mit Deletionen in Genen des T4BS- und/oder T4AS-Systems im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10. Die *Xcv*-Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta$ *icmE* ( $\Delta$ *icmE*), 85-10 $\Delta$ *dotCB* ( $\Delta$ *dotCB*), 85-10 $\Delta$ *icmE* $\Delta$ *dotCB* ( $\Delta$ *icmE* $\Delta$ *dotCB*), 85-10 $\Delta$ *virB4* ( $\Delta$ *virB4*) und 85-10 $\Delta$ *virB4* $\Delta$ *icmE* $\Delta$ *dotCB* ( $\Delta$ *virB4* $\Delta$ *icmE* $\Delta$ *dotCB*) wurden in ECW-Paprikapflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $0,1 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert.

**B)** Die *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutante wurde nicht durch die ektopische Expression von *icmE* bzw. *dotCB* komplementiert. Die Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta$ *icmE* ( $\Delta$ *icmE*) und 85-10 $\Delta$ *dotCB* ( $\Delta$ *dotCB*), welche kein Plasmid (-) oder pICH45066\_P<sub>XCV0160</sub>-*icmE-3xc-myc* (+, *icmE*<sub>*in trans*</sub>) bzw. pICH45066\_P<sub>XCV0160</sub>-*dotCB-3xc-myc* (+, *dotCB*<sub>*in trans*</sub>) enthielten wurden mit einer bakteriellen Dichte von  $10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> in ECW-Paprikapflanzen infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert.

**C)** Die *in cis*-Integration von *icmE* bzw. *dotCB* komplementiert den Phänotyp einer *icmE*- bzw. *dotCB*-Mutante. Die Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta$ *icmE* ( $\Delta$ *icmE*) und 85-10 $\Delta$ *dotCB* ( $\Delta$ *dotCB*), welche kein Plasmid (-) oder pLAND-P<sub>XCV0160</sub>-*icmE-3xc-myc* (+, *icmE*<sub>*in cis*</sub>) bzw. pLAND-P<sub>XCV0160</sub>-*dotCB-3xc-myc* (+, *dotCB*<sub>*in cis*</sub>) enthielten, wurden mit einer bakteriellen Dichte von  $0,2 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> in ECW-Paprikapflanzen infiltriert.

Krankheitssymptome in A, B und C wurden zu den angegebenen Tagen fotografisch dokumentiert. Umrandungen in A, B und C weisen auf die Inokulationsstellen hin. Alle Versuchsergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Auf Grund der Beteiligung der Proteine IcmE und DotCB an der Virulenz von *Xcv* stellte sich auch hier die Frage, ob das bakterielle Wachstum durch die Abwesenheit von IcmE bzw. DotCB beeinflusst ist. *In planta* Wachstumskurven mit den Stämmen 85-10 $\Delta$ *icmE* sowie 85-10 $\Delta$ *dotCB* zeigten keinen stetig signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtypstamm (Abbildung 3.4.4). Wie erwartet wurde ein signifikant reduziertes Wachstum des Stammes 85-10 $\Delta$ *xpsE* im Vergleich zum Stamm 85-10 verzeichnet (Abbildung 3.4.4). Die *in planta* Wachstumsanalysen lassen vermuten, dass die Deletion von *icmE* bzw. *dotCB* das Wachstum von *Xcv* tendenziell nicht beeinflussen.



**Abbildung 3.4.4 Einfluss von IcmE und DotCB auf das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Paprikapflanzen.**

Die Stämme 85-10 (wt), 85-10 $\Delta$ *xpsE* (*xpsE*), 85-10 $\Delta$ *icmE* (*icmE*) und 85-10 $\Delta$ *dotCB* (*dotCB*) wurden in Blätter von ECW-Paprikapflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $10^4$  KBE ml<sup>-1</sup> infiltriert. Das bakterielle Wachstum wurde über einen Zeitraum von 11 Tagen untersucht. Dargestellte Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung von drei Proben aus drei verschiedenen Pflanzen von einem repräsentativen Experiment. Der Grad der Signifikanz wird jeweils durch Sternchen (\*) markiert, bezieht sich auf den Wildtypstamm und wurde mittels t-Test berechnet ( $p < 0,05$ ). KBE - koloniebildende Einheiten. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.5 Erste Hinweise auf T4S-Substrate in *Xanthomonas*?

Um Wirtszellprozesse zum Vorteil des Bakteriums zu manipulieren verwendet *Legionella* eine Kombination von verschiedenen Sekretionssystemen. Essentiell sind dabei das T4BS-System sowie das Lsp-T2S-System (Berger und Isberg 1993, Marra *et al.*, 1992, Rossier und Cianciotto 2001). Durch vergleichende Proteomanalysen wurden 20 Proteine im Überstand eines *Legionella*-Wildtypstammes, jedoch nicht in einer *lsp*-T2S-Mutante nachgewiesen (DebRoy *et al.*, 2006). Unter den 20 Proteinen konnten u. a. verschiedene T2S-Substrate, aber auch Proteine, wie IcmX, LvrE und ein VirK-ähnliches Protein identifiziert werden. IcmX und LvrE sind Komponenten die mit dem T4BS-System von *L. pneumophila* verknüpft sind (Matthews und Roy 2000, Segal *et al.*, 1999), wohingegen VirK mit dem T4AS-System von *A. tumefaciens* assoziiert ist (Kalogeraki und Winans 1998, Li *et al.*, 2005). Obwohl IcmX, LvrE und das VirK-ähnliche Protein mit dem T4S-System in Verbindung stehen, werden diese Proteine möglicherweise über das T2S-System sekretiert, sodass geschlussfolgert wurde, dass es möglicherweise eine Verbindung zwischen dem T2S- und T4S-System geben könnte (Cianciotto 2009).

In vorangegangenen Studien wurde festgestellt, dass die Sekretion der meisten vorhergesagten T2S-Substrate von *Xcv* lediglich reduziert oder unbeeinflusst im Hintergrund einer T2S-Mutante ist (Solé *et al.*, 2015, Szczesny *et al.*, 2010). Basierend auf diesen Ergebnissen sollte mittels *in vitro*-Sekretionsanalysen untersucht werden, ob die vollständige oder partielle Sekretion von T2S-Substraten auf das T4S-System zurückzuführen ist. Neben den partiell vom T2S-System abhängigen Substraten XCV0536, XCV0965, XCV4358 und XCV4360 wurden fünf weitere, vom T2S-System unabhängig sekretierte Substrate analysiert (Tabelle 3.2).

Die kodierenden Sequenzen der untersuchten Substrate enthalten eine 3x c-Myc-Epitop-markierende Sequenz für einen immunologischen Nachweis und lagen bereits zu Beginn der Arbeit vor. Die Sekretion der Substrate XCV0536, XCV0965, XCV4358 und XCV4360 wurde im Wildtypstamm (85-10) und im Stamm 85-10 $\Delta$ *xcsE* $\Delta$ *xpsE* $\Delta$ 4312 (Szczesny *et al.*, 2010) analysiert. Der Stamm 85-10 $\Delta$ *xcsE* $\Delta$ *xpsE* $\Delta$ 4312, in dem die ATPase kodierenden Gene des *xps* und *xcs*-T2S-Systems sowie das dazugehörige Homolog XCV4312 deletiert sind wird im weiteren als T2S-Mutante bezeichnet. Eine T2S-Mutante weist im Gegensatz zum Wildtypstamm reduzierte Krankheitssymptome nach Infiltration in ECW-Blätter auf (Szczesny *et al.*, 2010). Um den möglichen Einfluss des T4BS-Systems zu untersuchen wurden in der T2S-Mutante zusätzlich die Gene *dotCB* bzw. *icmE* deletiert. Der Stamm 85-10 $\Delta$ *xcsE* $\Delta$ *xpsE* $\Delta$ 4312 $\Delta$ *dotCB* wird im weiteren als T2ST4S<sub>*dotCB*</sub>-Mutante und der Stamm 85-10 $\Delta$ *xcsE* $\Delta$ *xpsE* $\Delta$ 4312 $\Delta$ *icmE* als T2ST4S<sub>*icmE*</sub>-Mutante bezeichnet. Infektionsexperimente haben gezeigt, dass sich die T2ST4S<sub>*dotCB*</sub>- und die T2ST4S<sub>*icmE*</sub>-Mutante von der T2S-Mutante phänotypisch nicht unterscheiden (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Die Sekretion der Substrate (Tabelle 3.2) wurde mittels *in vitro*-Sekretionsanalysen untersucht.

Tabelle 3.2 Eigenschaften der untersuchten T2S-Substrate

Substrat in <i>Xcv</i>	SP	vorhergesagte Funktion	Sekretion	Homologe Proteine in <i>Xanthomonas</i> spp. sowie bekannte Funktion	Referenz
XCV0536	+	Lipase	partiell T2-abhängig	Homolog von XOO526 (LipA), Virulenzfaktor in <i>Xcv</i>	(Rajeshwari <i>et al.</i> , 2005, Solé <i>et al.</i> , 2015, Tamir-Ariel <i>et al.</i> , 2007, Tamir-Ariel <i>et al.</i> , 2012)
XCV0965	+	Xylanase	partiell T2-abhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp., Homolog von XCC0857, Virulenzfaktor in <i>Xcv</i>	(Szczeny <i>et al.</i> , 2010)
XCV4358	+	Xylanase (XynB2)	partiell T2-abhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp., Homolog von XCC4118 und XOO4428 (XynB)	(Rajeshwari <i>et al.</i> , 2005, Ray <i>et al.</i> , 2000, Solé <i>et al.</i> , 2015)
XCV4360	+	Xylanase (XynB3)	partiell T2-abhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp., Homolog von XCC4118	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
XCV0031	+	Cellulase	T2-unabhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp., Homolog zu XOO0282 (notwendig für Virulenz von <i>Xoo</i> PXO99, Homolog zu EngXcB (notwendig für Cellulaseaktivität von <i>Xcc</i> )	(Hu <i>et al.</i> , 2007, Szczeny <i>et al.</i> , 2010)
XCV0889	+	Hydrolase-Esterase	T2-unabhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp.	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
XCV0670	+	Endoglukanase	T2-unabhängig	Homolog zu XOO4019 (CIsA), wird über das T2S-System von <i>Xoo</i> sekretiert	(Jha <i>et al.</i> , 2007)
XCV1823	+	Glukosidase	T2-unabhängig	Konserviert in <i>Xanthomonas</i> spp., Homolog zu XOO2356 (CelD), welches als Virulenzfaktor von <i>Xoo</i> identifiziert wurde	(Szczeny <i>et al.</i> , 2010, Wang <i>et al.</i> , 2008)
XCV4355	-	Xylanase (XynA)	T2-unabhängig	Homolog zu XCC4115	(Solé <i>et al.</i> , 2015)

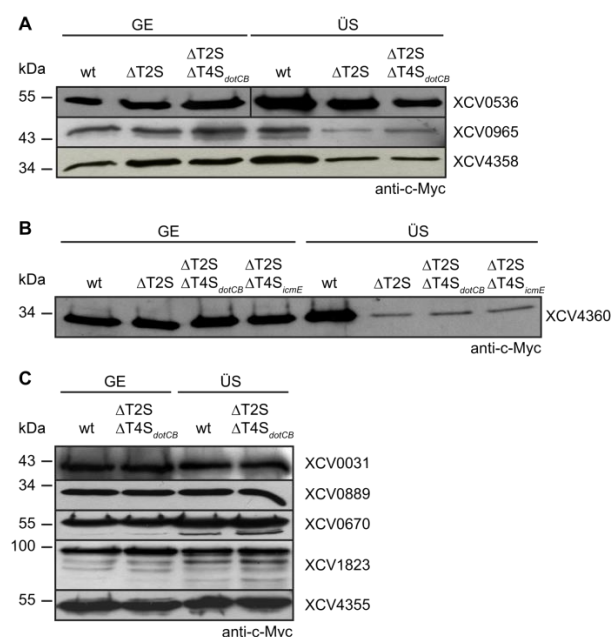
*Xcv*- *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcc*- *X. campestris* pv. *campestris*, *Xoo*- *X. oryzae* pv. *oryzae*. Signalpeptide (SP) wurden durch SignalP vorhergesagt und sind bei Vorhandensein mit einem + gekennzeichnet.

Mittels eines c-Myc-spezifischen Antikörpers wurden die Proteine XCV0536-3xc-Myc, XCV0965-3xc-Myc, XCV4358-3xc-Myc und XCV4360-3xc-Myc im Gesamtzellextrakt und im Überstand des Wildtypstammes, der T2S-Mutante sowie der T2ST4S<sub>dotCB</sub>-Mutante bzw. der T2ST4S<sub>icmE</sub>-Mutante (im Fall von XCV4360-3xc-Myc) detektiert (Abbildung 3.5.1 A und B). Das c-Myc-spezifische Signal im Überstand der T2S-, T2ST4S<sub>icmE</sub>- und T2ST4S<sub>dotCB</sub>-Mutante war dabei schwächer als im Wildtypstamm, was auf eine reduzierte Sekretion der Proteine XCV0536-3xc-Myc, XCV0965-3xc-Myc, XCV4358-3xc-Myc und XCV4360-3xc-Myc hindeutet (Abbildung 3.5.1 A und B). Die partielle Abhängigkeit der Substrate XCV0536, XCV0965, XCV4358 und XCV4360 vom T2S-System wurde bereits publiziert (Solé *et al.*, 2015).

Für die Substrate XCV0031, XCV0889, XCV0670, XCV1823 und XCV4355 wurde bereits gezeigt, dass diese unabhängig vom T2S-System sekretiert werden (Solé *et al.*, 2015, Szczeny *et al.*, 2010). Deswegen wurde im Folgenden die Sekretion dieser Substrate zwischen dem Wildtypstamm 85-10 und einer T2ST4S<sub>dotCB</sub>-Mutante analysiert. Sowohl im

Gesamtzellextrakt als auch im Überstand des Wildtypstammes und der T2ST4S<sub>dotCB</sub>-Mutante wurden die Substrate XCV0031-3xc-Myc, XCV0889-3xc-Myc, XCV0670-3xc-Myc, XCV1823-3xc-Myc und XCV4355-3xc-Myc in vergleichbaren Mengen detektiert (Abbildung 3.5.1 C).

Die Ergebnisse der Sekretionsanalysen lassen vermuten, dass die Sekretion der untersuchten Substrate nicht vom T4BS-System abhängig ist. Zwar wurde die Sekretion aller untersuchten Substrate zu 100 % reproduziert, jedoch bleibt zu beachten, dass die dargestellten Ergebnisse keine Lysiskontrolle aufweisen und somit eine bakterielle Lysis nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin kann eine Sekretion der untersuchten Substrate über das T4AS-System zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Deswegen sollte in zukünftigen Sekretionsanalysen eine T4AS-T4BS-Doppelmutante verwendet sowie entsprechende Lysiskontrollen mitgeführt werden.



**Abbildung 3.5.1** Das T4BS-System von *Xcv* hat vermutlich keinen Einfluss auf die Sekretion ausgewählter T2S-Substrate.

Dargestellt sind *in vitro*-Sekretionsanalysen ausgewählter T2S-abhängiger und -unabhängiger Substrate. Die Stämme 85-10 (wt), 85-10Δ*xcsE*Δ*xpsE*Δ4312 (ΔT2S), 85-10Δ*xcsE*Δ*xpsE*Δ4312Δ*dotCB* (ΔT2SΔT4S<sub>dotCB</sub>) und 85-10Δ*xcsE*Δ*xpsE*Δ4312Δ*icmE* (ΔT2SΔT4S<sub>icmE</sub>), welche das jeweils in der Abbildung dargestellte Expressionskonstrukt samt einer 3x *c-myc*-Epitopkodierenden Sequenz enthielten wurden in NYG-Medium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (GE) und Überstände (ÜS) wurden mittels Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers untersucht.

**A und B)** Die Sekretion der Substrate XCV0536-3xc-Myc, XCV0965-3xc-Myc, XCV4358-3xc-Myc und XCV4360-3xc-Myc ist gleichermaßen reduziert im Hintergrund einer T2S- sowie einer T2S-T4S-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm.

**C)** Die Sekretion der Substrate XCV0031-3xc-Myc, XCV0889-3xc-Myc, XCV0670-3xc-Myc, XCV1823-3xc-Myc und XCV4355-3xc-Myc ist im Wildtyp und einer T2SΔT4S<sub>dotCB</sub>-Mutante gleich. Im Fall von XCV0670 (ca. 56 kDa) und XCV1823 (ca. 98 kDa) konnten Abbauprodukte sowohl im GE als auch im ÜS detektiert werden. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

### 3.5.1 *In silico*-Analysen mittels des Vorhersageprogrammes S4TE identifizieren putative T4S-Substrate in *Xcv*

Auch wenn die Sekretion der analysierten T2S-Substrate vermutlich nicht vom T4BS-System abhängig ist, so lassen die bisher erhaltenen Daten aus Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 vermuten, dass *Xcv* ein oder sogar zwei funktionale T4S-Systeme besitzen könnte. Sollte dies der Fall sein liegt der Schluss nahe, dass über diese Systeme auch spezifische Substrate sekretiert oder transloziert werden könnten. Die Suche nach potentiellen Substraten, welche über das T4S-System von *Xcv* transportiert werden könnten erfolgte mit Hilfe des bioinformatischen Computerprogrammes „Searching algorithm for type-IV secretion system effectors“ (S4TE)

(Meyer *et al.*, 2013). S4TE ist in der Lage putative T4-Effektorproteine in Genomen von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien vorherzusagen. Grundlage für die Identifizierung von T4-Effektoren sind sogenannte Sequenzeigenschaften, wie beispielsweise eukaryotisch-ähnliche Domänen, Lokalisierungssignale für bestimmte Zellkompartimente und/oder individuelle N- oder C-terminale Eigenschaften in T4S-Substraten. Diese und weitere spezifische Sequenzeigenschaften sowie die Funktion von S4TE sind im Methodenteil Kapitel 2.2.6 näher erläutert. Zusätzliche Sequenzeigenschaften, welche durch die Analyse des umfangreichen Repertoires an T4S-Substraten in *L. pneumophila* abgeleitet wurden (Gomez-Valero *et al.*, 2011), sind ebenfalls mit in den Suchalgorithmus von S4TE einbezogen worden. Um eine Rangfolge zu generieren, beginnend mit den wahrscheinlichsten T4-Effektor-Kandidaten, verwendet S4TE die beiden Leistungsindizes  $SI_L$  („sensitivity index for *Legionella*“) und  $PI_L$  („positivity index for *Legionella*“) (siehe Kapitel 2.2.6). Der  $SI_L$ -Wert gibt Auskunft, in welchem Verhältnis Richtig-Positive Kandidaten mit derselben Kombination an Sequenzeigenschaften bereits in T4-Effektoren von *L. pneumophila* gefunden wurden. Im Gegensatz dazu beschreibt der  $PI_L$ -Wert den Nettoertrag der Richtig-Positiven und setzt diese ins Verhältnis zu den Falsch-Positiven Kandidaten. Proteine, deren  $SI_L$ - und  $PI_L$ -Wert 0 ist weisen keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten T4-Effektoren aus *L. pneumophila* auf („Neukombination“ der Sequenz-eigenschaften) und wurden durch das Programm gesondert hervorgehoben. Durch die *in silico*-Analyse des kompletten Genoms bzw. Proteoms von *Xcv* mit S4TE wurden 299 mögliche T4S-Substrate vorhergesagt. Eine vollständige Liste dieser putativen T4S-Substrate ist in der Tabelle 5.4 im Anhang zu finden.

Interessante Kandidaten stellen vor allem XCV-Proteine dar, die Homologien zu bekannten T4-Effektorproteinen aufweisen. Dazu zählen unter anderem XCV0025 (Rang 1), XCV1697 (Rang 2), XCV2208 (Rang 3), XCV0160 (Rang 7), XCV3492 (Rang 9), XCV3992 (Rang 281) oder XCV4220 (Rang 292) (siehe Tabelle 5.4). So wurde bereits gezeigt, dass Lpg2490 (Homolog zu XCV0025) ein Virulenzfaktor von *L. pneumophila* darstellt, der T4B-abhängig transloziert wird (de Felipe *et al.*, 2005). Ein weiteres T4-Effektorprotein, welches T4B-abhängig exportiert wird ist AM470 (Lockwood *et al.*, 2011), das Homologien zu XCV3492 und XCV4220 aufweist. Ein gutes Beispiel für einen Falsch-Positiven Kandidaten ist das Protein XCV0411 auf Rang 119, was dem Translokonprotein HrpF entspricht (Tabelle 5.4). HrpF wird T3-abhängig sekretiert (Büttner *et al.*, 2002) und ist daher kein T4S-Substrat.

### 3.5.2 Ein neues Reportersystem zur Untersuchung potentieller T4S-Substrate in *Xcv*

S4TE generierte eine Rangfolge der 299 putativen T4-Effektoren von *Xcv* basierend auf der Anzahl der enthaltenen Sequenzmotive in einem Protein sowie der beiden Leistungsindizes  $SI_L$  und  $PI_L$ . Zu beachten ist, dass die Vorhersagen Falschpositive Kandidaten beinhalten können (wie beispielsweise HrpF). Damit liefert die *in silico*-Analyse lediglich einen Hinweis



darauf, welche Proteine als potentielle T4S-Substrate für eine experimentelle Bestätigung in Frage kommen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst acht der identifizierten Substrate ausgewählt (Tabelle 3.3), um diese experimentell auf ihre Abhängigkeit hin zu untersuchen über ein T4S-System transportiert werden zu können. Die Auswahl der Kandidaten basierte auf einem hohen Rang (z. B. Rang 2, entspricht einer hohen Anzahl an übereinstimmenden Sequenzeigenschaften im Protein) sowie einer „Neukombination“ der Sequenzeigenschaften in einem Protein (SI<sub>L</sub>- und PI<sub>L</sub>-Wert jeweils 0).

**Tabelle 3.3 Ausgewählte, durch S4TE vorhergesagte T4S-Substrate in *Xcv***

Protein	SP	Rang <sup>2</sup>	vorhergesagte Funktion	Translokation via <i>A. tumefaciens</i> <sup>3</sup>	Homologie zu einem bekannten T4-Effektorprotein <sup>7</sup>
XCV1697 <sup>1</sup>	-	2	putative phagenähnliche Integrase	transloziert	Lpg2745 <sup>4</sup> , hypothetisches Protein
XCV2208 <sup>1</sup>	-	3	putatives Polyhydroxyalkanoat Granulum assoziiertes Protein	nicht transloziert	AM470 <sup>5</sup> , hypothetisches Protein
XCV0160 <sup>1</sup>	+	7	putative Patatin-ähnliche Phospholipase	transloziert	Lpg1426 <sup>4</sup> , hypothetisches Protein
XCV0792 <sup>1</sup>	-	9	putativer ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	transloziert	-
XCV0687 <sup>1</sup>	-	49	putative Peptidase	transloziert	-
XCV3492	+	235	hypothetisches Protein	nicht transloziert	AM470 <sup>5</sup> , hypothetisches Protein
XCV3992	-	281	hypothetisches Protein	nicht transloziert	Lpg2359 <sup>4</sup> , hypothetisches Protein
XCV4220	-	292	putative Proteinkinase	nicht transloziert	Lpg1483 <sup>4</sup> , NF-κB-aktivierendes Protein <sup>6</sup>

Signalpeptide (SP) wurden mittels SignalIP vorhergesagt und bei Vorhandensein durch ein + gekennzeichnet.

<sup>1</sup>Die Sequenzeigenschaften dieser Proteine weisen keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten T4S-Substraten aus *L. pneumophila* auf (SI<sub>L</sub>- und PI<sub>L</sub>-Wert jeweils 0).

<sup>2</sup>Das Ranking bezieht sich auf die Anzahl der im Protein vorhandenen Sequenzeigenschaften sowie dem SI<sub>L</sub>- und PI<sub>L</sub>-Wert („sensitivity index for *Legionella*“ und „positivity index for *Legionella*“) (siehe Material und Methoden 2.2.6). Ein hoher Rang (z. B. Rang 2) entspricht einer hohen Anzahl an übereinstimmenden Sequenzeigenschaften.

<sup>3</sup>Ergebnisse der Translokationsanalyse (siehe Abbildung 3.5.3 B). Die Translokation bezieht sich auf die Fähigkeit der C-terminalen 49 oder 50 Aminosäuren des jeweiligen Proteins den dTALE-2-Reporter, durch *A. tumefaciens* in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen zu translozieren.

<sup>4</sup>T4-Effektorprotein von *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. *Philadelphia 1*.

<sup>5</sup>T4-Effektorprotein von *Anaplasma marginale* str. *St. Maries*.

<sup>6</sup>Referenz: (Ge *et al.*, 2009).

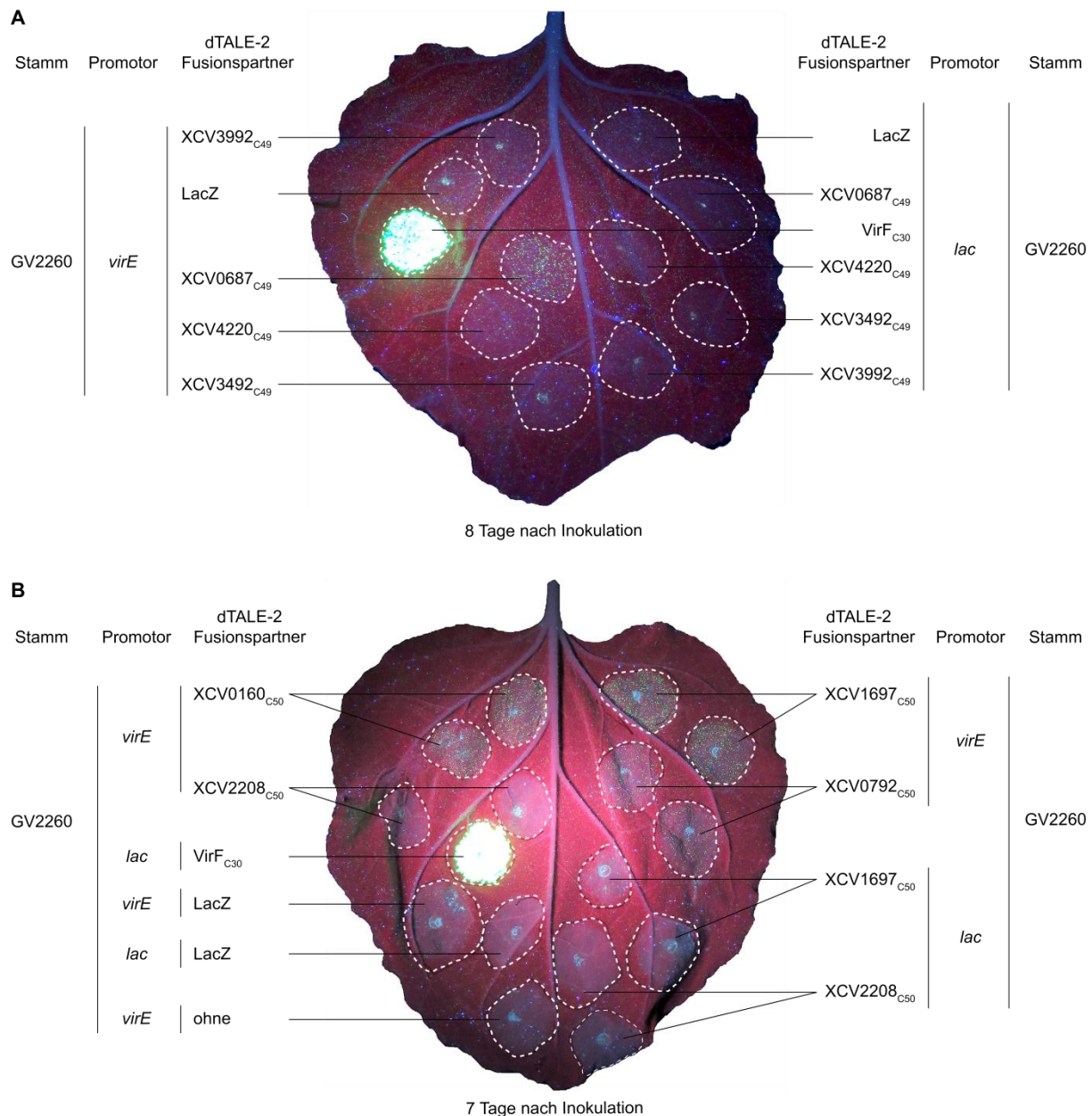
<sup>7</sup>Bereits publizierte T4-Effektorproteine (Chen *et al.*, 2010, Gomez-Valero *et al.*, 2011).

Ein wichtiges Merkmal von T4S-Substraten ist ein Translokationssignal, das sich in der Regel im C-terminalen Bereich des Proteins befindet (Lifshitz *et al.*, 2013, Nagai *et al.*, 2005, Vergunst *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieses Signals werden T4S-Substrate wahrscheinlich direkt oder indirekt vom T4S-System erkannt und anschließend transloziert. Handelt es sich bei den vorhergesagten Proteinen aus *Xcv* um T4S-Substrate sollte der C-terminale Bereich dieser Proteine demnach ein Signal enthalten, welches den Transport über das T4S-System ermöglicht.

Zur Analyse der Translokation wurde der „designer“ TAL-Effektor (dTALE-2) als Reporterprotein verwendet. An das 3'-Ende von dTALE-2 wurden die Codons, welche die C-terminalen 49 bzw. 50 Aminosäuren von XCV3992, XCV0687, XCV4220, XCV3492, XCV1697, XCV2208, XCV0160 und XCV0792 kodieren translational fusioniert (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.1.7). Als Negativkontrollen diente der dTALE-2 allein bzw. mit dem *lacZ*-Modul. Das Konstrukt dTALE-2-*virF*<sub>C30</sub> diente als Positivkontrolle, da bereits gezeigt werden konnte, dass in den C-terminalen 30 Aminosäuren des Effektorproteins VirF aus *A. tumefaciens* ein funktionales T4S-Signal enthalten ist (S. Marillonnet, unpubliziert) (Vergunst *et al.*, 2005). Die kodierenden Sequenzen der Fusionsproteine wurden entweder vom *lac*- oder vom *virE*-Promotor exprimiert. Der *virE*-Promotor eignet sich um die Expression von Hybridgenen in *A. tumefaciens* zu untersuchen (S. Marillonnet, unpubliziert). Da bekannt ist, dass *A. tumefaciens* ein funktionales T4AS-System besitzt wurden die erstellten Konstrukte zunächst in den *A. tumefaciens*-Stamm GV2260 elektroporiert. Die verwendeten Plasmide enthalten keine „left“ und „right boarder“, um einen T-DNA-Transfer über das T4AS-System von *A. tumefaciens* auszuschließen. Infiltriert wurden die GV2260-Stämme, welche die beschriebenen Expressionskonstrukte enthielten in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen.

Im Gegensatz zu dTALE-2 (ohne Fusionspartner) und dTALE-2-LacZ wurde dTALE-2-*VirF*<sub>C30</sub> durch den Stamm GV2260 transloziert, was zur einer GFP-Fluoreszenz an der Infektionsstelle von *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Blättern führte (Abbildung 3.5.2 A und B). Die Infiltration von GV2260-Stämmen, die dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> unter der Kontrolle des *virE*-Promotors exprimierten, führte zu einer punktuellen GFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.5.2 A und B). Daher kann vermutet werden, dass die C-terminalen 49 Aminosäuren von XCV0687 sowie die C-terminalen 50 Aminosäuren von XCV0160, XCV1697 und XCV0792 ein Translokations-signal enthalten, das die Translokation von dTALE-2 durch den Stamm GV2260 ermöglicht. GV2260-Stämme, die dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierten, führten nach der Infiltration in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Blätter dagegen zu keiner sichtbaren GFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.5.2 A und B). Es kann lediglich spekuliert werden, dass es im Fall des *lac*-Promotors möglicherweise zu einer schwächeren Expression der dTALE-2-Hybridgene im Vergleich zum *virE*-Promotor kam.

Keine sichtbare GFP-Fluoreszenz wurde nach der Infiltration von GV2260, der dTALE-2-XCV3992<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV4220<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV3492<sub>C49</sub> oder dTALE-2-XCV2208<sub>C50</sub> enthielt detektiert (Abbildung 3.5.2 A und B). Dabei spielte es keine Rolle, ob die jeweiligen dTALE-2-Hybridgene unter der Kontrolle des *lac*- oder des *virE*-Promotors standen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der C-terminale Bereich von XCV3992, XCV4220, XCV3492 und XCV2208 kein T4A-Translokationssignal enthält. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Substrate XCV3992, XCV4220, XCV3492 und XCV2208 ein Signal enthalten, welches nur die Translokation über ein T4BS-System vermittelt.



**Abbildung 3.5.2 C-terminale Bereiche putativer T4S-Substrate von *Xcv* vermitteln die Translokation von dTALE-2 durch *A. tumefaciens* in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen.**

**A)** Die C-terminalen 30 Aminosäuren von VirF sowie die C-terminalen 49 Aminosäuren von XCV0687 vermitteln die Translokation von dTALE-2 durch *A. tumefaciens*. GV2260-Stämme, welche die Hybridgene dTALE-2-*lacZ*, dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV4220<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV3492<sub>C49</sub> oder dTALE-2-XCV3992<sub>C49</sub> unter der Kontrolle des *lac*- oder *virE*-Promotors exprimierten, wurden in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $8 \times 10^8$  KBE/ml infiltriert. Als Positivkontrolle wurde ein GV2260-Stamm verwendet, welcher dTALE-2-*virF*<sub>C30</sub> unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierte.

**B)** Die C-terminalen 50 Aminosäuren von XCV0160, XCV1697 und XCV0792 vermitteln die Translokation von dTALE-2 durch *A. tumefaciens*. GV2260 Stämme, welche die Hybridgene dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> und dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> unter der Kontrolle des *virE*-Promotors exprimierten wurden, wie in A beschrieben infiltriert. Die Hybridgene dTALE-2-XCV2208<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub> wurden unter der Kontrolle des *lac*- oder des *virE*-Promotors in GV2260 exprimiert und der Stamm anschließend wie in A beschrieben infiltriert. Als Negativkontrollen diente der Stamm GV2260, welcher den dTALE-2 (ohne C-terminalen Fusionspartner = ohne) oder den dTALE-2 mit *lacZ*-Modul (LacZ) enthält. Es wurde die gleiche Positivkontrolle wie in A beschrieben verwendet.

Die GFP-Fluoreszenz wurde nach sieben bzw. acht Tagen mittels einer UV-Lampe visualisiert. Umrandungen in A und B weisen jeweils auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

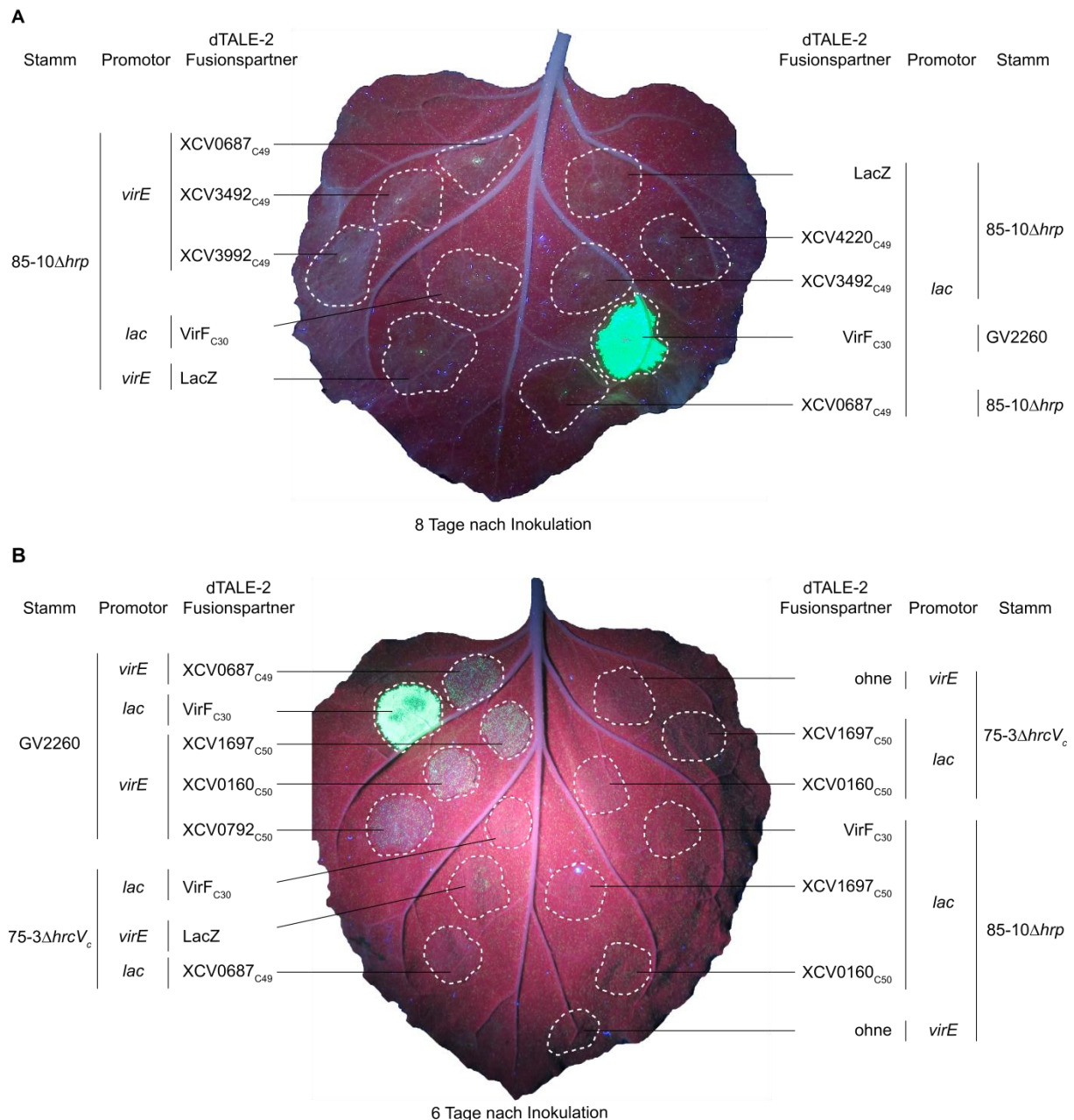
Als nächstes sollte untersucht werden, ob die entsprechenden dTALE-2-Fusionsproteine durch *Xcv* transloziert werden können. Für diese Analyse wurde zum einen der Stamm 85-10 und zum anderen der Stamm 75-3 verwendet. Unpublizierte Sequenzierdaten lassen vermuten, dass beide Stämme eine Vielzahl mobiler Elemente besitzen, genetisch jedoch nahezu identisch sind (Schmidtke und Bonas, unpubliziert). Der Stamm 75-3 enthält jedoch, im Gegensatz zum Stamm 85-10, die Gene XCV1517<sub>Stamm 75-3</sub>, XCV1518<sub>Stamm 75-3</sub> und XCV1519<sub>Stamm 75-3</sub>. Das Gen XCV1517<sub>Stamm 75-3</sub> kodiert möglicherweise eine lytische Transglycosylase. Bei XCV1518<sub>Stamm 75-3</sub> handelt es sich vermutlich um eine Pilin-Untereinheit, ähnlich TrbC von *E. coli* (Eisenbrandt *et al.*, 1999). Hingegen kodiert XCV1519<sub>Stamm 75-3</sub> vermutlich ein VirB3-ähnliches Protein. VirB3 ist an der inneren Membran lokalisiert und trägt vermutlich zu der Pilusassemblierung in T4AS-Systemen bei (Shirasu und Kado 1993, Waksman und Orlova 2014).

Da der dTALE-2 im N-terminalen Bereich ein T3S- und Translokationssignal aufweist (siehe Abbildung 3.1.10 A) wurden für die Analyse die T3-defizienten Stämme 85-10 $\Delta$ *hrp* (Hausner und Büttner, unpubliziert) bzw. 75-3 $\Delta$ *hrcV<sub>c</sub>* verwendet. In der 85-10 $\Delta$ *hrp*-Mutante sind die Operons *hrpB* bis *hrpF* und ein Teil des *hrpA*-Operons deletiert. Im Fall des Stammes 75-3 $\Delta$ *hrcV<sub>c</sub>* wurden die Codons 324 - 642 von *hrcV* deletiert. Sowohl 85-10 $\Delta$ *hrp* als auch 75-3 $\Delta$ *hrcV<sub>c</sub>* sind nicht mehr pathogen, was durch Infektionsexperimente in suszeptiblen und resistenten Paprikaliniern sowie in *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, dass das T3S-System in beiden Stämmen nicht mehr funktional ist.

Keines der getesteten dTALE-2-Fusionsproteine wurde durch den Stamm 85-10 $\Delta$ *hrp* bzw. 75-3 $\Delta$ *hrcV<sub>c</sub>* transloziert. Die infiltrierten Stämme führten daher zu keiner sichtbaren Reaktion in *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Blättern (Abbildung 3.5.3 A und B).

Im Gegensatz zu den *Xcv*-Stämmen lösten die GV2260-Stämme, welche das Fusionsprotein dTALE-2-VirF<sub>C30</sub> (Positivkontrolle), dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> enthielten, eine GFP-Fluoreszenz im Infektionsbereich der *gfp*-transgenen *N. benthamiana*-Blätter aus (Abbildung 3.5.3 B).

Da die dTALE-2-Fusionsproteine keine Epitop-Markierung besitzen konnte die Proteinsynthese nicht nachgewiesen werden und somit keine Aussage über die Proteinestabilität der Fusionsproteine in den entsprechenden Stämmen getroffen werden. Im Fall der *Xanthomonas*-Stämme ist zudem unklar, ob die T4S-Systeme in der Nicht-Wirtspflanze *N. benthamiana* funktional/aktiv sind. Weiterhin ist in *Xcv* bislang kein Substrat bekannt, das über das T4AS- oder T4BS-System transportiert wird und somit als Positivkontrolle dienen könnte. Diese kritischen Punkte sollten in zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden, in dem beispielsweise ein bekanntes homologes T4S-Substrat aus *X. axonopodis* pv. *citri* als eine mögliche Positivkontrolle mitgeführt wird. Dafür könnte zum Beispiel XCV3751 verwendet werden, dass ein Homolog des T4-Effektorproteins XAC2609 ist (Souza *et al.*, 2015).



**Abbildung 3.5.3 dTALE-2-Fusionsproteine werden über *A. tumefaciens*, nicht aber über die *Xcv*-Stämme 85-10 $\Delta$ hrp und 75-3 $\Delta$ hrcV<sub>c</sub> in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen transloziert.**

**A)** Der Stamm 85-10 $\Delta$ hrp transloziert nicht die in der Abbildung beschriebenen Fusionsproteine. Der Stamm 85-10 $\Delta$ hrp, welcher die Hybridgene dTALE-2-lacZ, dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub> oder dTALE-2-XCV3492<sub>C49</sub> unter der Kontrolle des lac- oder virE-Promotors exprimiert, wurde in Blätter *gfp*-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $8 \times 10^8$  KBE/ml infiltriert. Die Infiltration von 85-10 $\Delta$ hrp, mit dTALE-2-XCV3992<sub>C49</sub> unter der Kontrolle des virE-Promotors und die Infiltration von 85-10 $\Delta$ hrp, mit dTALE-2-XCV4220<sub>C49</sub> oder dTALE-2-virF<sub>C30</sub> unter der Kontrolle des lac-Promotors erfolgte wie oben beschrieben.

**B)** Der Stamm GV2260 transloziert dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> und dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> in *N. benthamiana*-Pflanzen. Vereinzelt ausgewählte dTALE-2-Fusionsproteine wurden jedoch nicht durch 75-3 $\Delta$ hrcV<sub>c</sub> bzw. 85-10 $\Delta$ hrp in *N. benthamiana*-Pflanzen transloziert. Die Hybridgene dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> und dTALE-2-XCV0792<sub>C50</sub> wurden unter der Kontrolle des virE-Promotors und dTALE-2-virF<sub>C30</sub> unter der Kontrolle des lac-Promotors in GV2260 exprimiert und die entsprechenden Stämme anschließend wie in A beschrieben infiltriert. Der Stamm 85-10 $\Delta$ hrp, welcher dTALE-2-virF<sub>C30</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> unter der Kontrolle des lac-Promotors bzw. den dTALE-2 (ohne C-terminalen Fusionspartner = ohne) unter der Kontrolle des virE-Promotors exprimiert, wurde wie in A beschrieben infiltriert. Der Stamm 75-3 $\Delta$ hrcV<sub>c</sub>, welcher dTALE-2-virF<sub>C30</sub>, dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub> oder dTALE-2-XCV0160<sub>C50</sub> unter der Kontrolle des lac-Promotors bzw. dTALE-2-lacZ oder den dTALE-2 (ohne C-terminalen Fusionspartner = ohne) unter der Kontrolle des virE-Promotors exprimiert wurde wie in A beschrieben infiltriert.

Die GFP-Fluoreszenz wurde nach sechs bzw. acht Tagen mittels einer UV-Lampe visualisiert. Umrandungen in A und B weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal reproduziert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifizierung von minimalen T3S- und Translokationssignalen in den T3S-Substraten AvrBs3, XopA und HrpB2

Eine Vielzahl von Bakterien nutzen T3S-Systeme für die Translokation bakterieller Effektorproteine, um mit der eukaryotischen Wirtszelle interagieren zu können. Die molekularen Mechanismen, die eine effiziente Translokation von Effektorproteinen ermöglichen, sind jedoch nur teilweise aufgeklärt. Eine entscheidende Rolle für die Translokation von Proteinen spielen T3S- und Translokationssignale. Reporter-basierte Translokationsstudien mit N-terminalen Derivaten der T3S-Substrate AvrBs3, XopA und HrpB2 haben gezeigt, dass das T3S- und Translokationssignal in den N-terminalen 10 - 40 Aminosäuren lokalisiert ist.

#### Die N-terminalen 30 Aminosäuren von AvrBs3 enthalten ein Translokationssignal

Die N-terminalen 30 Aminosäuren von AvrBs3 enthalten ein Translokationssignal, das jedoch nur in Abwesenheit von HpaB hinreichend für die Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2 ist (Abbildung 3.1.3 A). Eine mögliche Theorie wäre, dass das T3S-System spezifische Erkennungsstellen für Proteine, die transloziert und Proteine, die sekretiert werden sollen, besitzt. Effektoren, die transloziert werden sollen, würden durch HpaB zu der spezifischen Erkennungsstelle, die eine Translokation ermöglicht, vermittelt werden. In Abwesenheit von HpaB werden Effektoren jedoch reduziert sekretiert (Büttner *et al.*, 2004), sodass die Substratbindestelle für zu translozierende Proteine „frei“ wäre und möglicherweise durch Nicht-Effektorproteine besetzt werden kann. Bisher veröffentlichte Daten zeigen, dass die Nicht-Effektorproteine HrpF und XopA in Abwesenheit des T3S-Chaperons HpaB transloziert werden (Büttner *et al.*, 2004). Demnach ähnelt die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2, durch eine *hpaB*-Mutante, der eines Nicht-Effektorproteins. Die Translokation von Nicht-Effektorproteinen könnte im Wildtyp ebenfalls durch die stetige Translokation von Effektorproteinen indirekt verhindert werden.

Es kann bislang nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 durch den Wildtypstamm transloziert worden ist, die zu geringen Mengen des Fusionsproteins jedoch nicht hinreichend für eine makroskopisch sichtbare HR waren. Um dies genauer zu analysieren, könnte in zukünftigen Experimenten der Transkriptgehalt von *Bs3*, nach Infiltration des Stammes 85\* und 85\* $\Delta$ *hpaB*, welche AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 synthetisieren, mittels qRT-PCR-Analyse ermittelt werden.

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Aktivität von verschiedenen N-terminal eingekürzten AvrBs3-Derivaten mit Hilfe einer  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Reporteranalyse bestimmt. Dabei zeigte sich, dass AvrBs3 $\Delta$ N63 *in planta* eine 80 % höhere Aktivität aufweist als AvrBs3 $\Delta$ 2 (Schreiber *et al.*, 2015).

AvrBs3 $\Delta$ N63 fehlen im Gegensatz zu AvrBs3 $\Delta$ 2 nur die Aminosäuren 2 - 63. Vorläufige Experimente haben gezeigt, dass AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ N63 durch den Wildtyp und eine *hpaB*-Mutante transloziert wird (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Jedoch ist derzeit nicht bekannt, ob die höhere Aktivität von AvrBs3 $\Delta$ N63 oder der Aminosäurebereich 64 - 152 der Grund für die Translokation von AvrBs3<sub>1-30</sub>-AvrBs3 $\Delta$ N63 durch den Wildtypstamm sind.

#### T3S-Substrate können vermutlich getrennte und gemeinsame T3S- und Translokationssignale besitzen

Durch *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 1 - 10 von AvrBs3 und 1 - 20 von XopA ein funktionales T3S-Signal enthalten (Abbildung 3.1.1 A und 3.1.5 A), welches in beiden Fällen nicht hinreichend für die Translokation des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters ist (Abbildung 3.1.3 A) (J. Stuttmann, Diplomarbeit 2004). AvrBs3 ist das zweite Effektorprotein und XopA das erste Nicht-Effektorprotein von *Xcv*, die jeweils separate T3S- und Translokationssignale aufweisen.

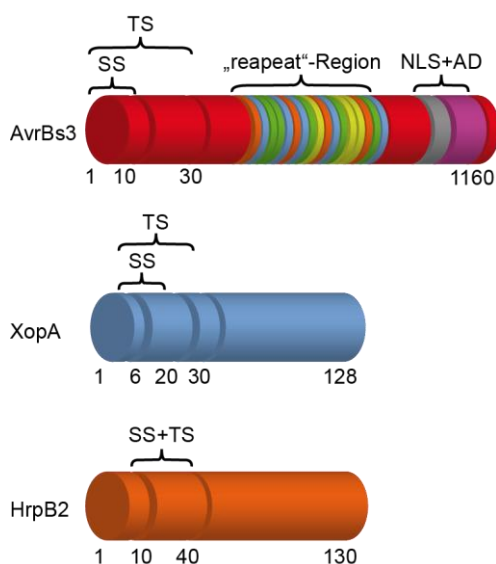
Ein getrenntes T3S- und Translokationssignal wurde auch in dem Effektorprotein AvrBs2 von *Xcv* mit Hilfe des Calmodulin-abhängigen Adenylatcyclase-Domäne (Cya)-Reporters nachgewiesen (auf den Cya-Reporter wird in Kapitel 4.1.4 näher eingegangen). Das T3S-Signal von AvrBs2 befindet sich in den N-terminalen 18 Aminosäuren, während für eine Translokation ein weiteres Signal im Aminosäurebereich 41 - 58 notwendig ist (Casper-Lindley *et al.*, 2002). Separate T3S- und Translokationssignale konnten ebenfalls in YopE (*Yersinia* spp.), BspR (*Bordetella bronchiseptica*), FliC und PopD (*Pseudomonas aeruginosa*) und DspA/E (*Erwinia amylovora*) identifiziert werden (Abe *et al.*, 2015, Ince *et al.*, 2015, Mudgett *et al.*, 2000, Oh *et al.*, 2010, Schesser *et al.*, 1996, Sory *et al.*, 1995, Tomalka *et al.*, 2012, Triplett *et al.*, 2009). Das minimale T3S-Signal in den N-terminalen 15 Aminosäuren des *Yersinia*-Effektorproteins YopE bestimmt die Sekretion des Proteins (Sorg *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist das minimale T3S- und Translokationssignal des Translokationsproteins PopD von *P. aeruginosa* nicht ausreichend für die Sekretion von PopD in Anwesenheit von Calcium. Für eine Translokationsspezifische Sekretion von PopD in Anwesenheit von Calcium sind zusätzliche Proteinregionen in unmittelbarer Nähe des T3S-Signals sowie im C-terminalen Bereich von PopD notwendig (Tomalka *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zu dem Effektorprotein AvrBs3 und dem Nicht-Effektorprotein XopA, enthält das „inner-rod“-Protein HrpB2 von *Xcv* vermutlich ein gemeinsames T3S- und Translokationssignal in den Aminosäuren 10 - 40 (Abbildung 3.1.8). Cya-Reporteranalysen mit N-terminalen Derivaten des Effektorproteins AvrPto aus dem Pflanzenpathogen *P. syringae* zeigten, dass AvrPto vermutlich ebenfalls ein gemeinsames T3S- und Translokationssignal in den N-terminalen 16 Aminosäuren enthält (Schechter *et al.*, 2004).

## Der Einfluss der ersten Aminosäuren im N-terminalen Proteinbereich auf die T3S und Translokation

Die Wichtigkeit der ersten Aminosäuren im N-terminalen Bereich eines Proteins für dessen Sekretion wurde beispielsweise für YopE aus *Y. enterocolitica* gezeigt. So wurde ein YopE-Derivat, in welchem die Codons 2 - 8 deletiert sind, nicht mehr sekretiert (Lloyd *et al.*, 2002). Die Aminosäuren 2 - 5 von XopA sind entbehrlich für die Sekretion bzw. Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2, während die Aminosäuren 2 - 10 und/oder 2 - 21 von XopA essentiell für eine erfolgreiche Translokation eines XopA-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteins sind (Abbildung 3.1.5 A und 3.1.6 A). Im Fall des „inner rod“-Proteins HrpB2 fördern die Aminosäuren 2 - 9 des Proteins die effiziente Translokation von AvrBs3 $\Delta$ 2, sind jedoch nicht essentiell (Abbildung 3.1.9 A).

Eine Zusammenfassung der für den Export wichtigen Aminosäuren in dem Effektorprotein AvrBs3, dem putativen Translokonprotein XopA und dem putativen „inner rod“-Protein HrpB2 sind in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der für den Export wichtiger Regionen in AvrBs3, XopA und HrpB2.**

**AvrBs3** enthält in den N-terminalen 10 Aminosäuren ein T3S-Signal (SS) und in den N-terminalen 30 Aminosäuren ein Translokationssignal (TS). Im Zentrum befindet sich die „repeat“-Region. C-terminal befinden sich die Kernlokalisierungssignale (NLS, grau) sowie die Aktivierungsdomäne (AD, lila).

**XopA** enthält ein funktionales SS im Aminosäurebereich 6 - 20 und ein TS im Aminosäurebereich 6 - 30.

**HrpB2** besitzt, im Gegensatz zu AvrBs3 und XopA, vermutlich ein gemeinsames SS und TS im Aminosäurebereich 10 - 40.

### **4.1.1 Die N-Terminalen Bereiche von AvrBs3, XopA und HrpB2 weisen nur teilweise vermeintlich typische Eigenschaften von T3S-Signalen auf**

Generell sind T3S-Signale auf Aminosäureebene nicht konserviert, jedoch werden spezifische Aminosäurekompositionen sowie ein unstrukturierter N-terminaler Proteinbereich vermutet (Arnold *et al.*, 2009, Buchko *et al.*, 2010, Löwer und Schneider 2009, Samudrala *et al.*, 2009, Schechter *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2013). Sekundärstrukturvorhersagen mittels Phyre-2 („protein homology/analogy recognition engine 2“) lassen vermuten, dass die Aminosäuren 1 - 68 von AvrBs3, 1 - 37 von XopA und 1 - 28 von HrpB2 unstrukturiert sind.

Im Hinblick auf die bereits bekannten vermeintlich typischen Eigenschaften von T3S- und Translokationssignalen, zeigen sich sowohl für AvrBs3, XopA als auch HrpB2 nur entfernt oder



keine Übereinstimmungen. So konnte in verschiedenen Studien ein erhöhter Gehalt an Serin und dagegen ein geringerer Prozentsatz an Tryptophan, Cystein, Tyrosin und Methionin im N-terminalen Bereich von T3S-Substraten festgestellt werden (Arnold *et al.*, 2009, Lloyd *et al.*, 2002, Löwer und Schneider 2009, Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002, Samudrala *et al.*, 2009, Schechter *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2013). Entgegen früherer Behauptungen konnte Leucin an bestimmten Aminosäurepositionen in T3S-Signalen selektiv festgestellt werden und ist nicht wie in Arnold *et al.*, 2009 beschrieben, komplett deletiert (Wang *et al.*, 2011).

Im Fall von AvrBs3 sind in den N-terminalen 30 Aminosäuren zu 6,7 % Leucin und Serin vertreten (im Vergleich zu 12,2 % Leucin und 5,4 % Serin im Gesamtprotein). Die N-terminalen 30 Aminosäuren von XopA weisen einen 6,7 %-igen Gehalt an Leucin und 16,7 %-igen Gehalt an Serin auf (im Vergleich zu 12,5 % Leucin und 13,3 % Serin im Gesamtprotein). Dabei befindet sich an Aminosäureposition 4 und 5 von XopA ein Serin und ein Leucin, die jedoch entbehrlich für die Sekretion und Translokation waren, was die Translokation von XopA $\Delta_{2-5}$ -AvrBs3 $\Delta_2$  gezeigt hat (Abbildung 3.1.5 A und 3.1.6 A). In den N-terminalen 40 Aminosäuren von HrpB2 sind zu 10 % Leucin und 5 % Serin vorhanden (im Vergleich zu 6,7 % Leucin und 8,9 % Serin im Gesamtprotein). Entscheidend für die Sekretion und Translokation von HrpB2 ist dagegen die Aminosäure Alanin an Position 11 (Abbildung 3.1.11 A) (S. Schulz, Dissertation 2013). Die vermeintlich spezifischen Aminosäurekompositionen in T3S-Signalen sind demnach nicht generell auf alle T3S-Substrate anwendbar.

Das *P. syringae* Effektorprotein AvrPto besitzt einen erhöhten Gehalt an Serin in den ersten 50 Aminosäuren, eine aliphatische Aminosäure an Position 3 und 4 sowie keine sauren Aminosäuren in den ersten 12 Aminosäureresten und weist damit die spezifischen Charakteristika eines T3S-Signals auf. Eine Mutation in all diesen charakteristischen Mustern des N-terminalen Bereichs von AvrPto verhinderte jedoch nicht dessen Sekretion und Translokation (Schechter *et al.*, 2012). Auch für andere T3S-Substrate konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der N-terminalen Region des Proteins deren Sekretion nicht signifikant beeinflusst. Eine Veränderung der ersten 18 Aminosäuren von AvrBs2 durch eine „frameshift“-Mutation verhinderte nicht die Translokation des Proteins durch das T3S-System von *Xcv* in die Pflanzenzelle (Mudgett *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen ließen Grund zur Annahme, dass sich das T3S-Signal auch in der mRNA befinden könnte (Anderson und Schneewind 1997). Da eine Einführung von Mutationen in *yopE*, die zu keiner Veränderung auf Aminosäureebene führten, nicht die Sekretion von YopE beeinflusste wird das Vorhandensein eines mRNA-T3S-Signals jedoch kontrovers diskutiert (Lloyd *et al.*, 2001). In flagellären Substraten wurden ebenfalls RNA-T3S-Signale identifiziert (Majander *et al.*, 2005, Singer *et al.*, 2014). So konnte das 173 bp-Fragment stromaufwärts von *fliC* die Sekretion der *E. coli* Enolase und Pebl von *Campylobacter jejuni* über das fT3S-System vermitteln (Majander *et al.*, 2005). Das Gen *fliC* kodiert das Filament des Flagellums (McClelland *et al.*, 2001), die Enolase ein Enzym in der Glycolyse (Lima *et al.*, 2009) und Pepl ist ein Zelladhäsion, welches von *C. jejuni* während des Infektionsprozesses verwendet wird

(Pei *et al.*, 1998). In *Salmonella* Typhimurium wurden ebenfalls RNA-T3S- und Translokationssignale in insgesamt fünf 25 bp großen RNA-Sequenzen im 5'-Bereich von T3-Effektoren identifiziert (Niemann *et al.*, 2013). Dabei ermöglichte der untranslatierte Bereich von *gtgA*, *cigR*, *gogB*, *sseL* und *steD* unter Beteiligung des Hfq-Proteins die Translokation des Cya-Reporters in tierische Zellen (Niemann *et al.*, 2013). Hfq ist ein RNA-Chaperon und Regulator, der eine Vielzahl an physiologischen Prozessen und mindestens 25 % der Gene von *S. Typhimurium* reguliert (Ansong *et al.*, 2009, Vogel und Luisi 2011). Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine große Flexibilität in T3S-Signalen. Es ist vorstellbar, dass eine Kombination aus einem mRNA-T3S-Signal, einem N-terminalen T3S-Signal, sowie die Beteiligung von T3S-Chaperonen eine optimale Sekretion bzw. Translokation eines Proteins gewährleisten könnte.

#### 4.1.2 Erkennung von T3S-Substraten mit Hilfe des T3S-Signals

Das T3S-System sekretiert mindestens drei verschiedene Arten von Substraten: Die frühen Substrate, wie „inner rod“- und Pilus-Proteine, die „mittleren“ Substrate (Translokatoren) und die „späten“ Substrate (Effektoren), wobei auch Regulatorproteine in einigen T3S-Systemen sekretiert werden können (Büttner 2012, Cornelis 2006, Galán *et al.*, 2014). „Inner rod“- und Pilus-Proteine werden als erstes durch den Basalapparat sekretiert, da diese Proteine die Grundlage für die Sekretion von „mittleren“ und „späten“ Substraten darstellen (Abbildung 4.2). Nach den „inner rod“- und Pilus-Proteinen werden wahrscheinlich die Translokatoren sekretiert, welche in der Regel die Voraussetzung für die Translokation von Effektorproteinen sind. Die verschiedenen T3S-Substrate müssen kontrolliert und zum richtigen Zeitpunkt sekretiert werden, was wahrscheinlich durch mindestens zwei Substratspezifitätswechsel ermöglicht wird (Büttner 2012). In *Xcv* ist für den ersten Wechsel in der Substratspezifität von „frühen“ zu „mittleren“ Substraten vermutlich eine Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne von HrcU zuständig (Lorenz *et al.*, 2008a, Schulz und Büttner 2011), während die Sekretion und/oder Translokation von HpaA wahrscheinlich den zweiten Substratspezifitätswechsel von „mittleren“ zu „späten“ Substraten initiiert (Abbildung 4.2) (Büttner *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2008b). Wie dagegen die N-terminalen T3S-Signale von „frühen“, „mittleren“ und „späten“ T3S-Substraten vom T3S-System erkannt, rekrutiert und spezifisch an Komponenten des T3S-Apparates binden können ist weitestgehend unbekannt. Die ATPase, der vorhergesagte C-Ring und die cytoplasmatischen Domänen von Mitgliedern der SctU- und SctV-Proteinfamilie wurden als Bindestellen für sekretierte T3S-Substrate beschrieben (Büttner 2012). Vorangegangene Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass HrpB2 und Effektorproteine von *Xcv* mit der putativen C-Ring-Komponente HrcQ und der cytoplasmatischen Domäne der IM-Komponente HrcV interagieren (Hartmann und Büttner 2013, Lorenz *et al.*, 2012). Weiterführende Studien haben gezeigt, dass die Aminosäuren 10 - 40 von HrpB2 wichtig für die Bindung an HrcU<sub>cc</sub> sind, sodass angenommen wird, dass

die Erkennung von HrpB2 durch Komponenten des T3S-Systems über das minimale T3S-Signal vermittelt wird (Abbildung 4.2 A) (Scheibner *et al.*, 2016). Die Bindung von HrpB2 an HrcU<sub>CC</sub> könnte wichtig für die anschließende Sekretion von HrpB2 in den Sekretionskanal sein, wodurch es seine Funktion als vorhergesagtes „inner rod“-Protein erfüllen könnte. Die Wichtigkeit des T3S-Signals für die Substraterkennung wurde auch für das *Y. enterocolitica*-Effektorprotein YopR durch eine Interaktion mit der ATPase YscN gezeigt (Sorg *et al.*, 2006). Jedoch scheint nicht generell das T3S-Signal die Bindestelle für T3S-Komponenten zu vermitteln. Im Fall des Filament-Proteins EspA von enteropathogenen *E. coli* (EPEC) scheint nicht das T3S-Signal, sondern das T3S-Chaperon CesAB durch die Bindung an EspA eine Interaktion mit der T3-ATPase EscN zu ermöglichen (Chen *et al.*, 2013).

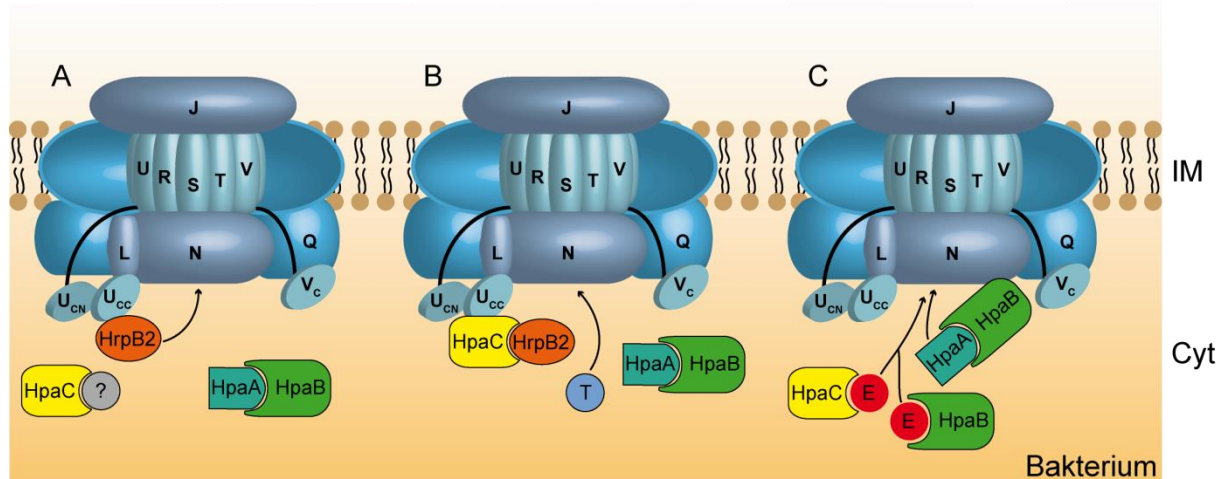
Die Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub>, ausgelöst durch HpaC, verhindert vermutlich die Sekretion und Translokation von HrpB2 (Abbildung 4.2 B) (Hausner und Büttner 2014, Lorenz *et al.*, 2008a, Schulz und Büttner 2011). Eine Interaktion zwischen HpaC und HrpB2 könnte ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf den Export von HrpB2 haben. Weiterhin kann spekuliert werden, dass auch das T3S-Chaperon HpaB und dessen Regulator HpaA die Translokation von HrpB2 kontrollieren (Abbildung 3.1.9) (Scheibner *et al.*, 2016). So könnte die reduzierte Sekretion von Effektoren, in Abwesenheit von HpaA und/oder HpaB indirekt die Sekretion und Translokation von Komponenten des T3S-Systems fördern. Dieses Phänomen wurde für die Translokationsproteine HrpF und XopA beschrieben, die in einer *hpaB*-Mutante transloziert worden sind (Büttner *et al.*, 2004).

Im Wildtyp wird durch die Bindung des Regulatorproteins HpaA an das T3S-Chaperon HpaB vermutlich die Sekretion von HrpF und XopA ermöglicht (Abbildung 4.2 B). Dabei sind die Aminosäuren 6 - 20 von XopA wahrscheinlich hinreichend für die Sekretion über das T3S-System (Abbildung 3.1.5). Ob das minimale T3S-Signal von XopA ebenfalls notwendig für eine mögliche Interaktion mit Komponenten des T3S-Apparates ist bleibt zu klären. Bisherige Interaktionsstudien haben gezeigt, dass XopA weder mit HrcU noch mit HrcQ interagiert (Lorenz *et al.*, 2012, Lorenz *et al.*, 2008a). Die Sekretion von XopA wird jedoch möglicherweise durch die Bindung an das T3S4-Protein HpaC gefördert (Büttner *et al.*, 2006). In Übereinstimmung damit wurde auch die effiziente Sekretion von HrpF durch HpaC begünstigt (Lorenz und Büttner 2011, Lorenz *et al.*, 2008a). Ob für die Bindung von XopA und HrpF an das T3S4-Protein HpaC das T3S-Signal notwendig ist, sollte in weiterführenden Studien analysiert werden. In einer früheren Studie über das Translokationsprotein PopD von *P. aeruginosa*, konnten drei Exportsignale identifiziert werden, von denen zwei für die Sekretion von PopD vor dem Export von Effektorproteinen erforderlich sind (Tomalka *et al.*, 2012). Sowohl der Sequenzbereich N-terminal der Chaperonbindestelle (Aminosäuren 35 - 45) als auch der C-terminale Bereich (Aminosäuren 270 - 295) von PopD enthalten ein sogenanntes Translokatorexportsignal. In zukünftigen Experimenten sollte daher ebenfalls der C-terminale Bereich der Translokationsproteine XopA und HrpF näher analysiert werden.

Im Gegensatz zu PopD besitzt XopA vermutlich keine Chaperon-Bindestelle, da eine direkte Interaktion von XopA mit dem T3S-Chaperon HpaB nicht nachgewiesen wurde (Büttner *et al.*, 2004). Somit ist weiterhin unklar, wie die Translokation von XopA durch HpaB verhindert wird. Denkbar wäre die Involvierung eines bisher noch unbekanntes Proteins, welches möglicherweise zusammen mit HpaB die Translokation von XopA verhindert. Eine weitere Erklärung wäre, dass aufgrund des stetigen Exportes von Effektorproteinen der Zugang von Nicht-Effektorproteinen zum T3S-Apparat indirekt verhindert wird.

Nachdem das T3S-System vollständig assembliert wurde erfolgt die Sekretion und Translokation von HpaA, wodurch HpaB „befreit“ wird und zusammen mit HpaC die effiziente Sekretion von Effektorproteinen ermöglicht (Abbildung 4.2 C) (Büttner *et al.*, 2004, Lorenz *et al.*, 2008a). Im Fall des Effektorproteins AvrBs3 ist das T3S- und Translokationssignal entbehrlich für die Interaktion mit der putativen C-Ring-Komponente HrcQ und der IM-Komponente HrcV (Hartmann und Büttner 2013, Lorenz *et al.*, 2012). Ob weitere T3-Komponenten, wie die ATPase HrcN von *Xcv*, an der Erkennung von T3S-Signalen beteiligt sind ist bislang unklar. Es wurde jedoch eine Bindung des T3S-Chaperons HpaB und des T3S4-Proteins HpaC, welche beide mit Effektorproteinen interagieren, an die ATPase HrcN nachgewiesen (Lorenz und Büttner 2009). Durch die Bindung eines Chaperons an ein Effektorprotein könnte eine Konformationsänderung des Effektor-Chaperon-Komplexes zu einem dreidimensionalen Erkennungssignal führen, welches spezifisch durch T3-Komponenten erkannt werden kann. Ähnliches wurde für den Effektor-Chaperon-Komplex SopB-SigE aus *Salmonella* gezeigt, wobei die Struktur des Komplexes wahrscheinlich entscheidend für die Bindung an die ATPase InvC ist (Roblin *et al.*, 2015).

Bis heute ist der Mechanismus der Erkennung von T3S-Substraten durch das T3S-System ein Diskussionsthema und nicht verstanden.



**Abbildung 4.2 Der Einfluss des T3S- und Translokationssignals sowie der Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC auf den Export von T3S-Substraten.**

In *Xcv* wird die Sekretion von HrpB2, Translokation- und Effektorproteinen durch die Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC kontrolliert. **A)** Während der frühen Phasen des T3S-Prozesses wird die cytoplasmatische Domäne von HrcU proteolytisch gespalten (HrcU<sub>CN</sub> und HrcU<sub>CC</sub>). HrcU<sub>CC</sub> interagiert mit dem T3S-Signal (Aminosäuren 1 - 40) des frühen Substrats HrpB2 (Scheibner *et al.*, 2016), wobei die Interaktion möglicherweise essentiell für die nachfolgende Sekretion von HrpB2 ist. Die Aktivität des Kontrollproteins HpaC wird während der frühen Phase des T3S-Prozesses vermutlich durch ein noch unbekanntes Protein (grau) unterdrückt, wodurch HrpB2 effizient sekretiert werden kann. **B)** Das T3S4-Protein HpaC induziert durch seine Bindung an HrcU<sub>CC</sub> vermutlich eine Konformationsänderung in HrcU<sub>CC</sub>. Die Konformationsänderung in HrcU<sub>CC</sub> hat möglicherweise einen Einfluss auf die Bindung von HrpB2 an HrcU<sub>CC</sub> und führt zu einem Wechsel in der T3S-Substratspezifität von HrpB2 zu Translokation- und Effektor-Proteinen. Durch die Bindung des Regulatorproteins HpaA an das T3S-Chaperon HpaB wird vermutlich zunächst die Sekretion von Translokationsproteinen (T), wie beispielsweise HrpF und XopA ermöglicht. Dabei sind die Aminosäuren 1 - 20 von XopA wahrscheinlich hinreichend für die Sekretion über das T3S-System. Ob dieser Aminosäurebereich ebenfalls notwendig für eine mögliche Interaktion mit Komponenten des T3S-Apparates ist bleibt zu klären. **C)** Nachdem das T3S-System vollständig assembliert wurde erfolgt der Wechsel von „frühen“ und „mittleren“ Substraten (Translokationsproteine) zu den „späten“ Substraten (Effektorproteine - E). Entscheidend dafür ist wahrscheinlich die Sekretion und Translokation von HpaA, wodurch HpaB „befreit“ wird und zusammen mit HpaC die effiziente Sekretion von Effektorproteinen ermöglicht. Für die Translokation des Effektorproteins AvrBs3 ist das T3S- und Translokationssignal (Aminosäuren 1 - 50) notwendig, das gleichzeitig mit dem T3S-Chaperon HpaB interagiert (Büttner *et al.*, 2004).

Cyt: Cytoplasma; IM: innere Membran; der Exportapparat ist im Querschnitt dargestellt und zeigt die T3S-Exportapparatkomponenten: U: HrcU; R: HrcR; S: HrcS; T: HrcT und V: HrcV; Cytoplasmatische Domänen der Exportapparatkomponenten: HrcU<sub>C</sub>: Cytoplasmatische Domäne von HrcU, welche am NPTH-Aminosäuremotiv gespalten ist und in der Domäne HrcU<sub>CN</sub> (U<sub>CN</sub>) und HrcU<sub>CC</sub> (U<sub>CC</sub>) resultiert; HrcV<sub>C</sub> (V<sub>C</sub>) cytoplasmatische Domäne von HrcV. Putative C-Ringkomponente HrcQ (Q), ATPase HrcN (N) mit Regulator HrcL (L), Innermembrankomponente HrcJ (J).

#### 4.1.3 Der AvrBs1ΔN58-Reporter eignet sich nicht zur Identifizierung von minimalen Translokationssignalen in T3S-Substraten

Der AvrBs1ΔN58-Reporter wurde in früheren Studien dazu verwendet in *Xcc* neue potentielle Effektorproteine, basierend auf einem funktionalen Translokationssignal, zu identifizieren (Jiang *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2013). Dazu wurden translationale Fusionen zwischen den ersten 58, 167 oder 217 Aminosäuren eines potentiellen Effektorproteins mit dem AvrBs1ΔN58-Reporter erstellt.

Ein direkter Vergleich von minimalen T3S- und Translokationssignalen eines Proteins auf die Fähigkeit hin verschiedene Reporterproteine zu translozieren wurde bislang nicht untersucht. Dabei können verschiedene Reporterproteine mit dem gleichen T3S- und/oder Translokationssignal eines T3S-Substrats unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die

Translokation des Fusionsproteins haben, wie der Vergleich zwischen dem AvrBs1 $\Delta$ N58- und dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter bewiesen hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter verwendet, um die mit dem AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter identifizierten T3S- und Translokationssignale von AvrBs3, XopA und HrpB2 zu verifizieren. Da das T3S-Signal von AvrBs3 (Aminosäurenbereich 1 - 10) und XopA (Aminosäurenbereich 1 - 25) die Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 vermittelte (Abbildung 3.2.2 A und 3.2.3 A), liegt die Vermutung nahe, dass der Reporter selbst ein internes translokations-förderndes Signal enthalten könnte. Die Translokation von AvrBs3<sub>1-10</sub>- und XopA<sub>1-25</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58 wurde durch die *hrpG*\*-Mutation, welche wahrscheinlich zu einer effektiveren Sekretion und Translokation von T3S-Substraten führt, begünstigt (Büttner *et al.*, 2004, Büttner *et al.*, 2007, Lorenz und Büttner 2009, Wengelnik *et al.*, 1999). Auch in einem *hrpG*-Wildtypstamm wird die Hypothese gestützt, dass AvrBs1 $\Delta$ N58 möglicherweise ein Signal enthält, welches die Translokation eines Fusionsproteins fördert. So vermittelten die N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 und die N-terminalen 30 Aminosäuren von XopA die Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 durch den Stamm 85-10 $\Delta$ avrBs1 (Abbildung 3.2.2 B und 3.2.3 B). Die N-terminalen 20 Aminosäuren von AvrBs3 enthalten jedoch nur ein T3S-Signal (beruhend auf dem Ergebnis von AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporteranalysen) und XopA wird nur in Abwesenheit des T3S-Chaperons HpaB transloziert (Abbildung 3.1.6 A) (Büttner *et al.*, 2004). Den Ergebnissen zur Folge müssen die Daten mit dem AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter also kritisch betrachtet werden. Welcher Bereich von AvrBs1 $\Delta$ N58 einen positiven Einfluss auf die Translokation haben könnte ist bislang unklar. T3-Exportsignale können sich auch im zentralen oder C-terminalen Bereich von Proteinen befinden (siehe Kapitel 1.2.2). So wäre es denkbar, dass neben dem N-terminalen Proteinbereich auch der zentrale oder C-terminale Bereich von AvrBs1 $\Delta$ N58 einen positiven Einfluss auf den Proteinexport haben könnte. C-terminale T3S-Signale bzw. sekretions-fördernde Domänen wurden bereits für YscU aus *Y. pseudotuberculosis*, Tir aus EPEC sowie SipB aus *S. Typhimurium* beschrieben (Allen-Vercoe *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2007, Login und Wolf-Watz 2015). Während die C-terminalen 15 Aminosäuren von YscU hinreichend für eine Sekretion von GST und einem YopE-Derivat (das kein funktionales T3S-Signal enthält) sind (Login und Wolf-Watz 2015), enthält der C-terminale Bereich von SipB (Aminosäurenbereich 300 - 593) und Tir (Aminosäurenbereich 519 - 524) ein sekretions-förderndes Signal, welches allein jedoch nicht ausreichend für eine Sekretion ist (Allen-Vercoe *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2007).

Vorläufige Experimente deuten darauf hin, dass die C-terminalen 25, 50 und 70 Aminosäuren von AvrBs1 vermutlich essentiell für die Auslösung einer AvrB1-spezifischen HR sind (Matus, Scheibner und Büttner, unpubliziert). Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass AvrBs1 ein zusätzliches T3S-Signal im C-terminalen Bereich besitzt, welches jedoch nur gemeinsam mit einem funktionalem T3S-Signal eine Translokation von AvrBs1 $\Delta$ N58 ermöglicht. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde HrpB2<sub>1-40</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58, jedoch nicht HrpB2<sub>1-30</sub>-AvrBs1 $\Delta$ N58 transloziert, da die N-terminalen 30 Aminosäuren von HrpB2 wahrscheinlich kein funktionales T3S-Signal enthalten (siehe Abbildung 3.2.4 A und B).

Ob der C-terminale Bereich von AvrBs1 $\Delta$ N58, der zur Auslösung einer AvrBs1-spezifischen HR wichtig zu sein scheint, gleichzeitig ein translokations-förderndes Signal enthält ist jedoch rein spekulativ.

Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass der AvrBs1 $\Delta$ N58-Reporter zwar zur Identifizierung von T3S-Signalen, jedoch vermutlich nicht zur Bestimmung eines minimalen Translokationssignals verwendet werden kann.

#### 4.1.4 Vor- und Nachteile verschiedener Reporterproteine zur Analyse der Proteinsekretion und -translokation

Da die Translokationsstudien mit AvrBs3 $\Delta$ 2- und AvrBs1 $\Delta$ N58-Fusionsproteinen keine einheitlichen Ergebnisse erbrachte, liegt es nahe die identifizierten T3S- und Translokationssignale mit weiteren Reporterproteinen zu verifizieren. In der Literatur ist die Adenylatcyclase-Domäne (Cya) von *B. pertussis* als eine der häufigsten verwendeten Reporterproteine zur Analyse der Translokation von bakteriellen Effektorproteinen beschrieben (Casper-Lindley *et al.*, 2002, Ladant und Ullmann 1999, Schechter *et al.*, 2004, Sory *et al.*, 1995). Dabei wird eine translationale Fusion zwischen der kodierenden Sequenz des vermeintlichen T3S- und Translokationssignals mit der kodierenden Sequenz der Calmodulin-aktivierenden Cya-Domäne generiert. Wird das Fusionsprotein über das T3S-System in die Wirtszelle transloziert, aktiviert das eukaryotische Calmodulin die Adenylatcyclase, was zu einer Umwandlung von ATP in zyklisches AMP (cAMP) führt (Abbildung 4.2). Die cAMP-Konzentration kann im Anschluss in einem Enzymimmunoassay gemessen und quantifiziert werden.

Der Cya-Reporter wurde ebenfalls zur Analyse der Translokationssignale XopA und AvrBs3 verwendet (Hartmann, Scheibner und Büttner, unpubliziert). Jedoch waren die Ergebnisse aus den jeweiligen Experimenten nicht reproduzierbar und die Quantifizierung der cAMP-Konzentration unterlag sehr starken Schwankungen. So konnte beispielsweise die Translokation von XopA-Cya durch eine *hpaB*-Mutante nachgewiesen werden, wobei sich die absoluten Werte um das bis zu 20-Fache unterschieden haben (Daten nicht gezeigt). Schechter und Kollegen stellten ebenfalls fest, dass die Menge an cAMP, welches durch die Cya-Fusionsproteine produziert wird, starken Schwankungen unterliegt und somit ein quantitativer Vergleich der Experimente untereinander nicht möglich ist (Schechter *et al.*, 2004). Gleichzeitig wird dem Cya-Reporter jedoch eine höhere Sensitivität, als den HR-Analysen zugesprochen (Casper-Lindley *et al.*, 2002, Schechter *et al.*, 2004). Auf Grund der geringen Reproduzierbarkeit, der hohen Standardabweichung, der Kosten sowie des erhöhten Zeitaufwands zur Aufarbeitung der Proben ist der Cya-Reporter, im Fall der Analyse von Translokationssignalen in Proteinen von *Xcv* jedoch nicht so gut wie der AvrBs3 $\Delta$ 2- oder dTALE-2 $\Delta$ N-Reporter.

Im Vergleich zum Cya-Reporter stellen Avr-Protein-Derivate eine gute Alternative zur Analyse der Sekretion und Translokation dar. Der Nachweis erfolgt in Pflanzen, welche das jeweilige

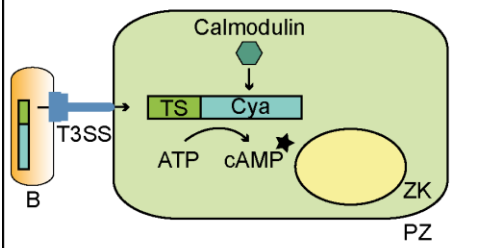
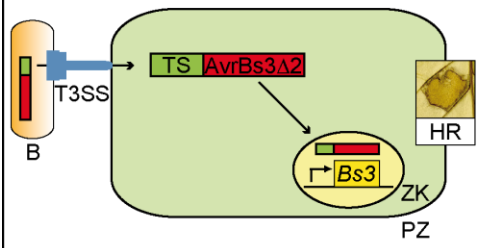
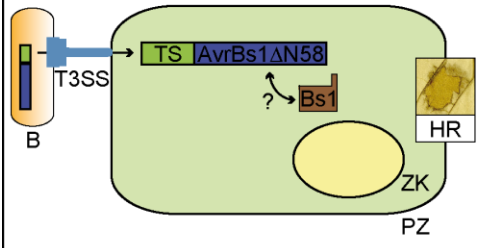
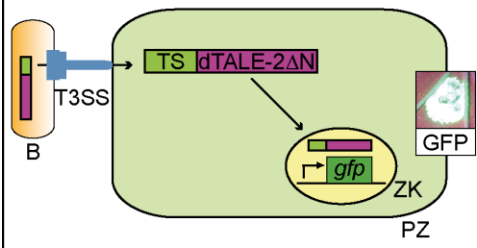
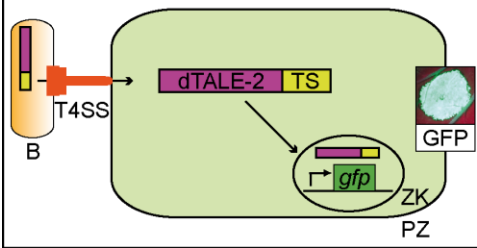
Avr-Protein erkennen können und in Folge dessen eine schnelle Zelltodreaktion (HR) auslösen (Abbildung 4.2). Ein quantitativer Nachweis der HR ist durch die Analyse der elektrischen Leitfähigkeit („ion leakage“) des Blattgewebes möglich (Stall *et al.*, 1974). Durch die HR kommt es zu einer Beschädigung der Zellmembran, wodurch Ionen aus den Blättern gelöst werden. Die relative Ionendurchlässigkeit der Plasmamembran ist daher ein Indiz für die Stärke der HR. Je größer die gemessene Zahl, umso größer der „ion leakage“ und umso stärker die ausgelöste HR. Da AvrBs3 einen direkten Einfluss auf die Transkription pflanzlicher Gene hat, kann in diesem Fall der Transkriptgehalt dieser Zielgene (z. B. *UPA20* oder *Bs3*) bestimmt werden, um indirekt die Translokation des Effektorproteins nachzuweisen und zu quantifizieren. Da Avr-Proteine selbst ein T3S- und Translokationssignal enthalten, ist es zunächst erforderlich die intrinsischen T3S- und Translokationssignale zu identifizieren, bevor Avr-Proteine als Reporterproteine zur Analyse von T3-Exportsignalen verwendet werden können. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Domänen im Effektorprotein selbst das zu untersuchende T3S- und Translokationssignal beeinflussen könnten.

Zum Nachweis des Proteintransports werden auch Fluoreszenz-basierte Reporter verwendet, welche auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) beruhen (Ehsani *et al.*, 2009, Gawthorne *et al.*, 2016, Van Engelenburg und Palmer 2010). Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde in der Literatur als Reporterprotein zur Analyse der Proteintranslokation über das T3S-System beschrieben (Enninga *et al.*, 2005, Jacobi *et al.*, 1998). Im direkten Gegensatz dazu stehen jedoch Studien von Akeda und Galán sowie Morello und Collmer in denen gezeigt wurde, dass ein GFP-Fusionsprotein nicht über das T3S-System transportiert werden kann (Akeda und Galán 2005, Morello und Collmer 2009). Unter der Verwendung eines „soluble-modified“-GFP (smGFP), einer modifizierten Variante des Original-GFP, wurden *in vitro*-Sekretionsanalysen im Wildtypstamm (85\*) und einer *hrp*-Mutante (85\* $\Delta$ *hrp*) durchgeführt. Dabei wurde sowohl das Fusionsprotein AvrBs3<sub>1-50</sub>-smGFP, als auch smGFP allein, durch die Stämme 85\* und 85\* $\Delta$ *hrp* sekretiert (Hausner und Büttner, unpubliziert). Diese Daten verdeutlichen, dass smGFP allein und unabhängig vom T3S-System von *Xcv* sekretiert werden kann und somit ungeeignet als Reporter für T3S- und Translokationsstudien ist.

Der „designer“-TALE (dTALE-2) und dessen Derivat (dTALE-2 $\Delta$ N) wurden zur Analyse von T3- und T4-Translokationssignalen verwendet. Der Vorteil von „designer“-TAL-Effektoren ist die benutzerdefinierte Modifizierung der RVDs („repeat-variable diresidues“) und die damit einhergehende selbstgewählte DNA-Zielsequenz (Morbiter *et al.*, 2010, Römer *et al.*, 2010). Der in dieser Arbeit verwendete dTALE-2 wurde so konstruiert, dass dieser spezifisch die Transkription von *gfp* in *gfp*-transgenen Pflanzen initiieren kann (Abbildung 4.2) (Weber *et al.*, 2011). Da es sich um ein Virus-basiertes Reportersystem handelt, ist der Nachweis der Proteintranslokation sehr sensitiv. Eine Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz wäre ebenfalls durch ein Spectrofluorometer möglich (Millwood *et al.*, 2003). Experimente mit den Reporterproteinen dTALE-2 und dem Derivat dTALE-2 $\Delta$ N zeichneten sich weiterhin durch



eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Die Nachteile des Reporters liegen zunächst in der Generierung des Reportersystems selbst (Erstellung des dTALE sowie der passenden Ziel-DNA und Generierung transgener Pflanzen). Wie auch im Fall von AvrBs3 und AvrBs1 kann der Einfluss intrinsischer Domänen des dTALEs auf das zu untersuchende T3S- und Translokationssignal nicht ausgeschlossen werden.

Reporterprotein zur Analyse der Translokation	Vorteile	Nachteile
<p><b>Adenylatcyclase-Domäne (Cya)</b></p> 	<p>Kleines Reporterprotein</p> <p>Hohe Sensitivität</p> <p>Quantitativer Nachweis</p>	<p>Schlechte Reproduzierbarkeit</p> <p>Hohe Standardabweichung</p> <p>Zeitaufwendig und kostenintensiv</p>
<p><b>Avirulenzproteine</b></p>  	<p>Sehr gut reproduzierbar</p> <p>Schnell und kostengünstig</p> <p>Quantitativer Nachweis</p> <p>Detektion <i>in vivo</i></p>	<p>Großes Reporterprotein</p> <p>Einfluss intrinsischer Domänen/ Signale</p> <p>Unterschiedliche Erkennungsmechanismen</p>
<p><b>designer TAL-Effektoren</b></p>  	<p>Sehr gut reproduzierbar</p> <p>Quantitativer Nachweis</p> <p>Hohe Sensitivität</p> <p>Detektion <i>in vivo</i></p> <p>Analyse von T3- und T4-Effektoren möglich</p>	<p>Großes Reporterprotein</p> <p>Einfluss intrinsischer Domänen/ Signale</p>

**Abbildung 4.2 Vor- und Nachteile von verschiedenen Reporterproteinen zur Analyse von Translokationssignalen.** B: Bakterium; PZ: Pflanzenzelle; ZK: Zellkern; HR: hypersensitive Reaktion; TS: Translokationssignal; ?: Die Erkennung von AvrBs1ΔN58 erfolgt direkt oder indirekt über das R-Protein Bs1.

#### 4.1.5 *Xanthomonas* außer Kontrolle: Eine Möglichkeit zur Analyse individueller Effektorproteine?

In *Xcv* spielen die Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC sowie T3S- und Translokationssignale eine entscheidende Rolle für die effiziente und geordnete Sekretion und Translokation von T3S-Substraten. Infektionsexperimente haben gezeigt, dass eine *hpaABC*-Mutante keine makroskopisch sichtbaren Reaktionen auf Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen auslöst, sodass der Verlust der Kontrollproteine mit einem Verlust der Pathogenität von *Xcv* einhergeht (Abbildung 3.1.11) (Scheibner *et al.*, 2016). Durch die Abwesenheit von HpaA und/oder HpaB kommt es zu einer reduzierten Sekretion von Effektorproteinen, was möglicherweise indirekt die Sekretion und Translokation von T3S-Komponenten fördern könnte. Ähnliches wurde für die putativen Translokonproteine HrpF und XopA, die durch eine *hpaB*-Mutante transloziert worden sind, postuliert (Büttner *et al.*, 2004). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, führte die zusätzliche Deletion von *hpaA* und *hpaB* in einer *hpaC*-Mutante zu einer signifikant erhöhten Translokation von HrpB<sub>2x40</sub>-AvrBs3Δ2 (Abbildung 3.1.9 A) (Scheibner *et al.*, 2016). Das T3S- und Translokationssignal von HrpB2 vermittelte außerdem die Translokation eines TAL-Reporters in *N. benthamiana*-Zellen durch eine *hpaABC*-Mutante (Abbildung 3.1.11).

Im Bereich der Phytopathologie ist die Übertragung von T3-Effektoren in die pflanzliche Wirtszelle von zentraler Bedeutung. Da das T3S-System pflanzenpathogener Bakterien ein großes Repertoire an Effektorproteinen während der Infektion überträgt und diese teilweise redundante Funktionen besitzen (Kvitko *et al.*, 2009), ist eine gezielte Analyse einzelner Effektoren und deren funktionelle Charakterisierung oft mühsam oder gar unmöglich. Die Übertragung individueller Effektoren mit Hilfe eines Translokationssignals von einem Nicht-Effektor durch einen *Xcv*-Stamm, der entweder keine Effektoren mehr besitzt (Multi-Effektor-Mutante) oder dessen Translokation an nativen Effektoren stark beeinträchtigt ist (*hpaABC*-Mutante), ermöglicht die Aufklärung die durch Effektoren hervorgerufenen Modifikationen von Wirtszellprozessen.

#### 4.2 Die Translokation von Proteinen ohne das Translokonprotein HrpF

Allgemein bekannt ist, dass für die Translokation von Effektoren über das T3S-System in die eukaryotische Wirtszelle ein Translokon benötigt wird. Da eine *hrpF*-Mutante Proteine *in vitro* über das T3S-System sekretiert, jedoch keine Krankheitssymptome bzw. keine HR in suszeptiblen bzw. resistenten Pflanzen auslöst, wird vermutet das *hrpF* einen Translokator kodiert (Büttner *et al.*, 2002, Rossier *et al.*, 2000). Speziell für AvrBs3 wurde bereits eine HrpF-abhängige Translokation beschrieben (Szurek *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde erstmals eine partiell Translokon-unabhängige Translokation der Effektorproteine AvrBs3 und dTALE-2 durch das pflanzenpathogene Bakterium *Xcv* nachgewiesen, was die bisher beschriebene Translokon-abhängige Translokation von AvrBs3 in Frage stellt. Möglicherweise können die

Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Nachweisverfahren für die Translokation erklärt werden. Während durch den in Szurek *et al.* durchgeführten „nuclear targeting assay“ die Translokation von AvrBs3 mittels Immunfärbung (AvrBs3-Lokalisierung im Zellkern von Mesophyllzellen) nachgewiesen wurde, erfolgte in dieser Arbeit der Nachweis über Infektionsexperimente sowie Analysen des Transkriptgehaltes von *UPA20* und *Bs3*. Dabei stellen sowohl das Virus-basierte Reportersystem zur Analyse der Translokation von dTALE-2 als auch die Transkriptanalysen möglicherweise sensitivere Nachweismethoden als die Immunfärbung dar.

Es stellt sich die Frage, wie AvrBs3 bzw. dTALE-2 ohne Translokation in die Pflanzenzelle übertragen/aufgenommen werden kann. Die Proteine müssen zum einen die pflanzliche Zellwand und zum anderen die pflanzliche Plasmamembran überwinden. Um zu überprüfen, ob die Aufnahme von dTALE-2 unabhängig von *Xcv* möglich ist wurden Kulturüberstände (aus *in vitro*-Sekretionsanalysen) von 85\*, der den dTALE-2 synthetisierte und sekretierte, in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Vorläufige Ergebnisse zeigten dabei jedoch keine detektierbare GFP-Fluoreszenz (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Dies könnte auf eine zu geringe Proteinausbeute (aus der *in vitro*-Sekretionsanalyse) zurückzuführen sein. Um diesem Problem entgegenzuwirken, könnte der dTALE-2 beispielsweise mit einer His<sub>6</sub>-Markierung in *E. coli* exprimiert und anschließend über eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix immobilisiert und nachfolgend eluiert werden. Das stark angereicherte Protein könnte gereinigt und dann in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert werden.

Eine Translokation-unabhängige Übertragung eines T3-Effektorproteins wurde bislang in den tierpathogenen Bakterien EPEC und *Y. enterocolitica* beschrieben (Michgehl *et al.*, 2006, Rüter *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Effektorproteine Tir (EPEC) und YopM (*Y. enterocolitica*) normalerweise über das T3S-System transloziert werden (Cornelis 2002, Kenny *et al.*, 1997). Doch sowohl rekombinantes Tir als auch natives Tir, das durch eine EPEC-Mutante transloziert wurde, die keine Translokationspore mehr ausbilden kann, konnte durch Autointegration in die Wirtszellmembran aufgenommen werden (Michgehl *et al.*, 2006). YopM ist das zweite Effektorprotein, welches in die Wirtszelle ohne Beteiligung weiterer Faktoren eindringen kann (Rüter *et al.*, 2010). Durch die Analyse verschiedener Tir- und YopM-Derivate wurden Proteinbereiche identifiziert, welche für die T3-unabhängige Translokation essentiell sind. Die Autointegration von Tir ist abhängig von der C-terminalen Region (Aminosäuren 390 - 550) des Proteins und nicht von der N-terminalen Region (Aminosäuren 1 - 200) in der das T3S-Signal lokalisiert ist (Abe *et al.*, 1999, Crawford und Kaper 2002, Michgehl *et al.*, 2006). Im Fall von YopM wurden zwei N-terminale  $\alpha$ -Helices identifiziert, welche die Translokation vermitteln (Rüter *et al.*, 2010). Der molekulare Mechanismus der Autointegration ist in beiden Fällen jedoch nicht bekannt. Für YopM konnte gezeigt werden, dass endozytische Prozesse eine Aufnahme in die eukaryotische Zelle begünstigen (Rüter *et al.*, 2010). Die Aufnahme von extrazellulären Proteinen (wie Tir oder YopM) ohne eine Beteiligung bakterieller Proteine, ähnelt dem Tat-Protein von HIV-1 („Human immunodeficiency virus“) oder Antennapedia von *Drosophila*. Diese beiden Proteine enthalten

eine Protein-Transduktions-Domäne (PTD), die eine Durchquerung von biologischen Membranen in einem Temperatur-, Rezeptor- und Endosomen-unabhängigen Weg ermöglicht (Lindgren *et al.*, 2000). Eine endocytotische Aufnahme der Proteine kann jedoch ebenfalls in Betracht gezogen werden (Green *et al.*, 2003).

Im Fall von AvrBs3 könnte das Protein zunächst mit Hilfe des Pilus, der die pflanzliche Zellwand durchdringt, bis zur Plasmamembran der Wirtszelle gelangen. Von dort aus könnte das Protein über Endozytose in die Pflanzenzelle aufgenommen werden. Die Aufnahme von extrazellulären Proteinen und einer Vielzahl sogenannter zellpenetrierender Peptide (CPPs- „cell penetrating peptides“) wird oft durch Endozytose gewährleistet (Conner und Schmid 2003, Lundberg *et al.*, 2003, Richard *et al.*, 2003). CPPs sind kurze Peptide, bestehend aus nicht mehr als 30 Aminosäuren und besitzen die Fähigkeit Zellmembranen zu passieren (Zorko und Langel 2005). Um die Theorie der endozytotischen Aufnahme von AvrBs3 näher zu untersuchen könnten in zukünftigen Experimenten beispielsweise cytoskelettale Proteine, welche für die Endocytose wichtig sind, blockiert werden. Dies könnte durch die Zugabe von Cytochalasin D (inhibiert die Aktin-Polymerisation), Nocodazol (inhibiert die Tubulin-Polymerisation) oder Phenylarsinioxid (hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose) erfolgen (Hoebeke *et al.*, 1976, Moss und Ward 1991, Urbanik und Ware 1989).

#### Besitzt AvrBs3/dTALE-2 ein Motiv, das zu einer Translokation-unabhängigen Translokation führt?

In vorläufigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass weder das N-terminale Deletionsderivat dTALE-2 $\Delta$ N noch HrpB<sub>21-40</sub>-dTALE-2 durch eine *hrpF*-Mutante transloziert wird (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Somit könnte möglicherweise der N-terminale Proteinbereich von dTALE-2 (entspricht auch dem N-terminalen Bereich von AvrBs3) wichtig für die Translokation-unabhängige Translokation sein. Zudem kann spekuliert werden, dass die Translokation-unabhängige Translokation von dTALE-2 nicht die Folge einer generellen Überexpression des Proteins ist. Weitere Analysen müssen jedoch erfolgen, um das Phänomen der Translokation-unabhängigen Translokation von AvrBs3 bzw. dTALE-2 zu entschlüsseln.

Sollte der N-terminale Bereich von AvrBs3 tatsächlich ein Motiv (ähnlich einer PTD) besitzen, die eine Translokation-unabhängige Translokation ermöglicht, könnte diese genutzt werden, um beliebige Proteine in pflanzliche Zielzellen zu transferieren und anschließend zu analysieren. Ein ähnliches Szenario wurde bereits für das Effektorprotein YopM gezeigt. Die zwei N-terminalen  $\alpha$ -Helices vermittelten den Transport sowohl von GFP als auch von YopE in HeLa-Zellen (Rüter *et al.*, 2010). Neben der in Kapitel 4.1.5 beschriebenen *hpaABC*-Mutante könnte für die Übertragung individueller Proteine in die Pflanzenzelle auch eine *hrpF*-Mutante verwendet werden. In diesem Fall müsste das Protein von Interesse mit der bislang putativen PTD von AvrBs3 fusioniert sein. Dadurch wäre eine spezifische Analyse und Charakterisierung eines ausgewählten Proteins von Interesse *in planta* möglich. Voraussetzung dafür wäre jedoch zunächst die Identifizierung einer PTD in AvrBs3.

### 4.3.1 Das T4S-System von *Xanthomonas*: ein weiterer Virulenzfaktor?

*Xcv* ist das bisher einzig bekannte pflanzenpathogene Bakterium, welches Gene für zwei putative T4S-Systeme (T4AS- und T4BS-System) besitzt. In Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Ergebnisse über den Einfluss beider potentiellen Sekretionssysteme auf die Virulenz von *Xcv* nachgewiesen.

Die Deletion von *virB4* führte zu einer reduzierten Virulenz, jedoch nicht zu einem veränderten Wachstum von *Xcv in planta* (Abbildung 3.3.1 und 3.3.2). Die ATPase VirB4 ist in allen bisher bekannten T4AS-Systemen vorhanden und essentiell für die Funktionalität des Systems (Cascales und Christie 2004, Zechner *et al.*, 2012). Für *Brucella abortus* konnte gezeigt werden, dass die NTP-Bindedomäne essentiell für die Funktion von VirB4 ist (Watarai *et al.*, 2002). So könnte in zukünftigen Experimenten die kodierende Region der Walker A und B NTP-bindenden Domänen in *virB4* von *Xcv* mutiert und anschließend im Hinblick auf die Fähigkeit eine *virB4*-Mutante zu komplementieren, untersucht werden. NTP-Bindende Proteine könnten verschiedene Aufgaben, wie die Bereitstellung von Energie für den Sekretionstransport oder ein Art Signalgeber zum Öffnen des Sekretionskanals durch eine Kinaseaktivität im Sekretionsprozess übernehmen.

Im Gegensatz zu VirB4 sind die ATPase VirB11 und das Kopplungsprotein VirD4 nicht universell in T4AS-Systemen vertreten (Alvarez-Martinez und Christie 2009, Christie *et al.*, 2014, Zechner *et al.*, 2012). Trotz des Vorhandenseins in *Xcv*, wurde keine signifikante Beteiligung dieser Proteine am Infektionsprozess von Paprikapflanzen festgestellt (Abbildung 3.3.1 A). Möglicherweise sind diese Gene/Proteine unter anderen Bedingungen aktiv, wie beispielsweise in einer Konkurrenzsituation, wie sie für *Xac* beschrieben worden ist. So wurde die Sekretion des T4-Substrats XAC2609 nur in Gegenwart von *E. coli*-Zellen nachgewiesen und wurde durch eine Deletion von *virD4* (XAC2623) verhindert (Souza *et al.*, 2015). Weiterhin könnte auch ein anderes noch unbekanntes VirB- oder Membran-Protein die Funktion von VirD4 übernehmen, wie es für den Effektortransport in *Brucella suis* (besitzt kein VirD4-Kopplungsprotein) vermutet wird (Alvarez-Martinez und Christie 2009, de Jong *et al.*, 2008).

Die lytische Transglycosylase VirB1 scheint ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* zu haben, wie Infektionsexperimente mit einer *virB11-virB1*-Doppelmutante zeigten (Abbildung 3.3.1 A). Für *B. abortus* wurde ebenfalls gezeigt, dass VirB1 eine untergeordnete Rolle für die Virulenz spielt (den Hartigh *et al.*, 2008). Lytische Transglycosylasen gehören zur Familie der Lysozym-ähnlichen Proteine (Mushegian *et al.*, 1996). Charakteristisch für diese Proteine sind ein konserviertes lytisches Transglycosylasemotiv und die Assoziation mit T3S- oder T4S-Systemen. Es kann spekuliert werden, dass diese Proteine möglicherweise Peptidoglycan degradieren können, um so die Assemblierung des Sekretionssystems im Periplasma zu ermöglichen (Mushegian *et al.*, 1996, Zahrl *et al.*, 2005). Es wurde zudem beschrieben, dass lytische Transglycosylasen verschiedener T4S-Systeme und sogar verschiedener Sekretionssysteme

untereinander austauschbar sind (Hoppner *et al.*, 2004, Zahrl *et al.*, 2005), wodurch erklärt werden könnte warum VirB1 von *Xcv* keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz hat. Sollte das T4AS-System *Xanthomonas* dabei unterstützen sich gegen andere Bakterienspezies zu wehren, wie es kürzlich von Souza *et al.* in einer *Xac/E. coli*-Ko-Kultur gezeigt wurde (Souza *et al.*, 2015), könnte in zukünftigen Experimenten beispielsweise ein interbakterieller Wachstumsvergleich durchgeführt werden. Dazu könnte ein *Xcv*-Stamm sowie ein *E. coli*-Stamm verwendet werden, die jeweils zwei verschiedene Selektionsmarker tragen. Während einer Ko-Kultivierung beider Stämme in einer Flüssigkultur könnten nach spezifischen Zeitabständen Proben entnommen werden und auf selektiven Nähragarplatten mit verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert werden. Danach müsste das Verhältnis zwischen *Xanthomonas*- und *E. coli*-Wachstum kalkuliert werden und mit *Xanthomonas*- und *E. coli*-Stämmen verglichen werden, die nicht in einer Konkurrenzsituation gewachsen sind. Im Fall des *Xac/E. coli*-Ko-Kultivierungsexperiments konnte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, wie *Xac* T4-abhängig *E. coli*-Zellen lysiert (Souza *et al.*, 2015).

Für die Analyse des T4BS-System von *Xcv* wurde gezeigt, dass die Deletion der Gene *icmE* sowie *dotCB* zu einer reduzierten Virulenz der Bakterien führten (siehe Abbildung 3.3.3). In zukünftigen Experimenten sollte der Stamm 85-10 $\Delta$ *dotCB* durch die *in cis*-Integration von *dotC* oder *dotB* komplementiert werden, da bislang nicht unterschieden werden kann, ob die Deletion von *dotC* und/oder *dotB* den Phänotyp in Blättern von ECW-Pflanzen hervorgerufen hat. Das Gen *dotC* kodiert ein Lipoprotein, lokalisiert in der äußeren Membran des Bakteriums (Kubori *et al.*, 2014, Kubori und Nagai 2016, Nagai und Kubori 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen im Lipobox-Motiv von DotC einen partiellen Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* haben (Yerushalmi *et al.*, 2005). Für die mit VirB11 phylogenetisch verwandte ATPase DotB konnte ebenfalls eine wichtige Beteiligung am Infektionsprozess von *C. burnetii* nachgewiesen werden. So führte eine Deletion von *dotB* in *C. burnetii* dazu, dass das Bakterium keine T4S-Substrate sekretieren konnte und zu keiner erfolgreichen Infektion tierischer Zellen in der Lage war (Beare *et al.*, 2012). Weiterhin wurde ein intrazellulärer Wachstumsdefekt in Abwesenheit von *dotB* festgestellt (Beare *et al.*, 2012). Das *in planta*-Wachstum von *Xcv* wird dagegen in Abwesenheit von *dotB* und *dotC* nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 3.3.4).

Die ektopische Expression der Gene *icmE* und *dotCB* (selbiges traf auch auf *virB4* zu) hatte einen negativen Einfluss auf die Virulenz des Wildtypstammes. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression bestimmter Gene einen negativen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums haben kann. So führte eine Überexpression von *hrcQ* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors im Wildtypstamm bzw. in einer *hrcQ*-Mutante zu reduzierten Krankheitsymptomen bzw. keiner vollständigen Komplementation (Lorenz *et al.*, 2012).

Sowohl DotB als auch IcmE haben wahrscheinlich einen Einfluss auf die bakterielle Konjugation in *Legionella* (Segal *et al.*, 1999, Vogel *et al.*, 1998). Ob dies auch auf *Xcv* zutrifft bleibt zu klären. Vorläufige Experimente zeigten jedoch, dass *Xcv* keine Plasmide ohne einen

entsprechenden Helferstamm aufnehmen kann. Für dieses Experiment wurde eine Konjugation mit einem Donor (*E. coli*-Stamm, der pBRM enthält) und einem Rezipient (*Xcv* 85-10, ohne Plasmid), ohne einen entsprechenden Helferstamm, über Nacht angesetzt (Kapitel 2.2.1.9). Da der *Xcv*-Stamm 85-10 nach der Konjugation nicht auf selektiven NYG-Agarplatten (mit Gentamycin) gewachsen ist, wurde der Vektor pBRM vermutlich nicht durch *Xcv* aufgenommen. In Zukunft könnte getestet werden, ob *Xcv* die Übertragung des Vektors pBRM in einen *E. coli*-Stamm ohne Plasmid ermöglicht. Auf Grund von Homologien zu dem *A. tumefaciens* Protein VirB10 und einer topologischen Ähnlichkeit zu TonB aus *E. coli* wird für die Komponente IcmE weiterhin eine Funktion zur Energieübertragung von der inneren zur äußeren Bakterienmembran auf die Translokationspore IcmK vermutet (Sutherland *et al.*, 2013, Vincent *et al.*, 2006).

Zur weiteren Analyse des T4S-Systems von *Xcv* sollten Transkriptstudien durchgeführt werden, um herauszufinden unter welchen Bedingungen das jeweilige T4S-System aktiv ist. Bisherige Analysen zum Transkriptgehalt T4-spezifischer Gene in Komplexmedium (NYG) ergaben, dass die Gene *icmE*, *dotC* und *virD4* im Stamm 85-10 bzw. 85\* eine niedrige Basalexpression aufweisen und die Gene nicht durch *hrpG\** induziert werden (Hartmann und Büttner, unpubliziert). Der Transkriptgehalt spezifischer Gene, wie beispielsweise *virB4*, *icmE*, *dotC* und *dotB* sollte jedoch unter weiteren Bedingungen (wie z. B. *in planta* und in interbakteriellen Konkurrenzsituationen) untersucht werden. Mit dem Wissen, unter welchen Bedingungen das jeweilige T4S-System von *Xcv* aktiv ist, können weitere Experimente zur Aufklärung der Funktion dieser T4S-Systeme geplant werden. Über die genaue Funktion von T4S-Systemen in pflanzenpathogenen Bakterien ist mit Ausnahme von *A. tumefaciens* bislang nicht viel bekannt. Bisher wurde für das T4AS-System von *Xac* eine bakterienabtötende Wirkung beschrieben. So ist beispielsweise das gereinigte T4-Effektorprotein XAC2609 in der Lage Peptidoglycan von *Micrococcus luteus* zu degradieren sowie das Wachstum von *Bacillus subtilis*-Kulturen zu verzögern und *B. subtilis*-Zellen zu lysieren (Souza *et al.*, 2015). Da Pflanzen von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt werden könnte das T4S-System Bakterien einen Wachstumsvorteil gegenüber bakteriellen Konkurrenten verschaffen und so eine erfolgreiche Besiedlung der Wirtspflanzen gewährleisten.

### 4.3.2 Die Identifizierung von T4S-Substraten in *Xanthomonas*

Aufgrund der Beteiligung der T4S-Systeme an der Virulenz von *Xcv* kann vermutet werden, dass auch spezifische Substrate über diese Systeme transportiert werden. Die Translokation von T4S-Substraten in die Wirtszelle ist ein essentieller Prozess für eine Vielzahl von intrazellulären tierpathogenen Bakterien, wie *Legionella* oder *Coxiella*, um Wirtszellprozesse zum Vorteil des Bakteriums zu modellieren (Christie *et al.*, 2014, Hubber und Roy 2010, Newton *et al.*, 2013). Der erste Ansatzpunkt zur Identifizierung möglicher T4S-Substrate in *Xcv* bestand in der Analyse von T2S-Substraten von *Xcv*, da einige T2S-Substrate auch in Abwesenheit eines funktionalen Xcs- und Xps-T2S-Systems vollständig oder partiell sekretiert wurden (Abbildung 3.5.1) (Solé *et al.*, 2015, Szczesny *et al.*, 2010). Zudem wurde ein Zusammenspiel des T2S-Systems mit dem T4S-System in *L. pneumophila* vermutet (Cianciotto 2009). Jedoch war die Sekretion von XCV0536, XCV0965, XCV4358, XCV4360, XCV0031, XCV0889, XCV0670, XCV1823 und XCV4355 nicht vom T4BS-System abhängig (Abbildung 3.5.1). Wie werden diese Substrate also sekretiert? Eine Beteiligung des T4AS-Systems an der Sekretion der in dieser Arbeit untersuchten Substrate kann bisher nicht ausgeschlossen werden. Bakterielle Virulenzfaktoren können beispielsweise auch über äußere Membranvesikel in das extrazelluläre Milieu exportiert werden (Llobes *et al.*, 2013). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde festgestellt, dass *Xcv* äußere Membranvesikel bilden kann und die Substrate XCV0536, XCV4358, XCV4360 und XCV4355 in diesen Vesikeln vorhanden sind (Solé *et al.*, 2015).

Um dennoch erste Hinweise auf mögliche T4S-Substrate in *Xcv* zu erhalten wurde eine *in silico*-Analyse mittels S4TE unter Einbeziehung des kompletten Genoms und Proteoms von *Xcv* durchgeführt. Im Gegensatz zu S4TE nutzen andere bioinformatische Vorhersageprogramme, wie zum Beispiel T4EffPred (<http://bioinfo.tmmu.edu.cn/T4EffPred/prediction.html>) (Zou *et al.*, 2013) oder T4SEpre (<http://biocomputer.bio.cuhk.edu.hk/T4DB/T4SEpre.php>) (Wang *et al.*, 2014) nur eine beschränkte Anzahl an Algorithmen, um eine begrenzte Anzahl an Sequenzmotiven in Proteinsequenzen zu identifizieren und anschließend mögliche T4S-Substrate vorherzusagen. Des Weiteren sind die Algorithmen meist nur für spezifische  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Proteobakterien konzipiert. Doch je mehr spezifische Eigenschaften in die *in silico*-Analyse einfließen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einen positiven „Treffer“ zu erhalten. T4EffPred ist im Gegensatz zu S4TE in der Lage zwischen T4AS- und T4BS-Substraten, mit einer Wahrscheinlichkeitsrate von 76,6 % bzw. 89,7 %, zu unterscheiden (Zou *et al.*, 2013). Von den in dieser Arbeit getesteten putativen T4S-Substraten (Tabelle 3.3) wurde jedoch lediglich XCV3992 als potentielles T4S-Substrat durch T4EffPred vorhergesagt. Bioinformatische Vorhersageprogramme sind eine vielversprechende und effektive Methode, um putative bakterielle Effektorproteine zu identifizieren und die Anzahl an potentiellen und damit zu untersuchenden T4-Effektorproteinen in einem Organismus einzugrenzen. *In silico*-Vorhersagen von T4-Effektorproteinen wurden bereits erfolgreich in den tierpathogenen



Bakterien *L. pneumophila* sowie *C. burnetii*, angewandt und wurden oftmals auch experimentell bestätigt (Burstein *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2010, Schroeder *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2011). Erst kürzlich wurde das Sekretom von 39 verschiedenen *Brucella* spp. mittels S4TE analysiert, wobei einige der vorhergesagten T4S-Substrate bereits zuvor als T4-Effektorproteine identifiziert wurden (Sankarasubramanian *et al.*, 2016).

In S4TE sind alle bereits verwendeten Sequenzmotive enthalten, die bisher zur Identifizierung von T4S-Substraten in  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien verwendet wurden (Meyer *et al.*, 2013). S4TE prognostizierte in *Xcv* insgesamt 299 Gene, dessen kodierenden Sequenzen als potentielle T4S-Substrate in Frage kommen könnten (Tabelle 5.4). Die funktionelle Charakterisierung der vorhergesagten T4S-Substrate und deren Interaktion mit dem entsprechenden Wirtsorganismus könnten die Rolle und die Funktion der T4S-Systeme von *Xcv* weiter aufdecken.

### **4.3.3 Potentielle T4S-Substrate von *Xanthomonas* können durch *Agrobacterium tumefaciens* in *N. benthamiana* transloziert werden**

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reporter-basierte Translokationsanalyse etabliert, um die Translokation von potentiellen T4S-Substraten durch *Xcv* oder *A. tumefaciens* nachzuweisen. Der Reporterassay basiert dabei auf einer Idee von Dr. Sylvestre Marillonnet (IPB Halle). In anderen Organismen wie *L. pneumophila*, *C. burnetii*, *B. abortus* und *Anaplasma marginale* wurden neue T4-Effektoren neben bioinformatischen Vorhersageprogrammen ebenfalls durch die Verwendung von Reporterproteinen identifiziert bzw. verifiziert (Burstein *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2010, Lifshitz *et al.*, 2013, Lockwood *et al.*, 2011, Marchesini *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2011). Auf Grund der erfolgreichen Verwendung des dTALE-2 für die Analyse der T3-abhängigen Translokation (Kapitel 3.1.4) wurde der dTALE-2 ebenfalls zur Analyse der Translokation von T4S-Substraten verwendet.

Computergestützte und experimentelle Untersuchungen an Effektoren des T4BS-Systems von *Legionella* und *Coxiella* haben gezeigt, dass sich das Translokationssignal in der Regel in den C-terminalen 35 Aminosäuren eines Proteins befindet (Lifshitz *et al.*, 2013). Im Fall des T4AS-Systems konnte ein Translokationssignal in den C-terminalen 50 Aminosäuren von VirE2 und VirE3 sowie in den C-terminalen 19 Aminosäuren von VirF identifiziert werden (Atmakuri *et al.*, 2003, Simone *et al.*, 2001, Vergunst *et al.*, 2003, Vergunst *et al.*, 2005). In Übereinstimmung damit ergab die Analyse der dTALE-2-Reporterfusionsproteine, dass die C-terminalen 49 Aminosäuren von XCV0687 sowie die C-terminalen 50 Aminosäuren von XCV0160, XCV0792 und XCV1697 ein Signal enthalten, das die Translokation des dTALE-2 durch *A. tumefaciens* ermöglichte (Abbildung 3.5.3 B). Im Vergleich zur Positivkontrolle (dTALE-2-VirF<sub>C30</sub>) war die detektierte GFP-Fluoreszenz jedoch nur punktuell nachweisbar. Möglicherweise werden größere Aminosäurebereiche der gewählten XCV-Substrate benötigt, um eine effiziente Translokation von dTALE-2 zu gewährleisten. Im Fall von *Bartonella*-Effektor-Proteinen (Bep) wurde beispielsweise ein zweiteiliges T4-Translokationssignal

beschrieben. Dabei wird neben einem positiv geladenen C-terminalen Proteinbereich eine sogenannte „Bep intracellular delivery“ (BID)-Domäne für eine effiziente Translokation benötigt (Schulein *et al.*, 2005).

Über die Diskrepanz in den Ergebnissen bei der Verwendung des *lac*- (konstitutive Expression des Hybridgens) oder des *virE*-Promotors (induziert die Expression des Hybridgens durch Wirtszellkontakt) kann nur spekuliert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Vergleich zum *virE*-Promotor die Expression der Hybridgene dTALE-2-XCV0687<sub>C49</sub> und dTALE-2-XCV1697<sub>C50</sub>, unter der Kontrolle des *lac*-Promotors schwächer ist oder zu Proteininstabilitäten führte. Eine mögliche Konsequenz wäre eine reduzierte oder keine Translokation der Fusionsproteine in *gfp*-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen, wodurch in der Folge keine makroskopisch sichtbare GFP-Fluoreszenz detektiert werden kann.

Die Fusionsproteine dTALE-2-XCV2208<sub>C50</sub>, dTALE-2-XCV3492<sub>C49</sub>, dTALE-2-XCV3992<sub>C49</sub> und dTALE-2-XCV4220<sub>C49</sub> wurden nicht durch *A. tumefaciens* transloziert (Abbildung 3.5.2). XCV2208 und XCV3492 weisen Homologien zu dem T4B-Effektor AM470 von *A. marginale* auf (Lockwood *et al.*, 2011), während XCV3992 Homologien zu dem T4BS-Substrat Lpg2359 von *L. pneumophila* (Gomez-Valero *et al.*, 2011) aufzeigt (Tabelle 5.4). Sollte es sich bei XCV2208, XCV3492 und XCV3992 um spezifische T4BS-Substrate handeln, wäre dies eine Erklärungsmöglichkeit warum die Fusionsproteine nicht durch *A. tumefaciens*, das kein T4BS-System besitzt, transloziert wurden.

Im 85-10- bzw. 75-3-Stammhintergrund wurde keine Translokation der untersuchten dTALE-2-Fusionsproteine beobachtet (Abbildung 3.5.3). Der Stamm 75-3 ist genetisch nahezu identisch mit dem Stamm 85-10, enthält jedoch im Gegensatz zu 85-10 u. a. ein Gen, das vermutlich ein VirB3-ähnliches Protein kodiert (XCV1519<sub>Stamm 75-3</sub>). VirB3 ist an der inneren Membran lokalisiert und trägt vermutlich zu der Pilusassemblierung in T4AS-Systemen bei (Shirasu und Kado 1993, Waksman und Orlova 2014).

Eine weitere Möglichkeit, warum die dTALE-2-Fusionsproteine nicht durch die *Xcv*-Stämme transloziert wurden, könnte an der Inaktivität des T4S-Systems in einer Nicht-Wirtspflanze begründet sein. Denkbar wäre auch, dass die potentiellen T4S-Substrate lediglich eine Art Relikt darstellen. Ähnliches wurde für T3S-Signale in Proteinen von Bakterien ohne T3S-System beschrieben (Arnold *et al.*, 2009, Löwer und Schneider 2009). Da jedoch ein Einfluss des T4AS- und T4BS-Systems auf die Virulenz von *Xcv* nachgewiesen wurde (Abbildung 3.4.1 C und 3.4.3 C) ist es unwahrscheinlich, dass keine spezifischen Substrate über diese Sekretionssysteme transportiert werden.

### Eigenschaften von T4-Translokationssignalen

Die meisten bekannten T4-Effektorproteine sind hydrophil und besitzen eine positive Ladung sowie eine gehäufte Anzahl an alkalischen Aminosäuren in den C-terminalen 25 Aminosäuren (Lockwood *et al.*, 2011, Nagai *et al.*, 2005, Niu *et al.*, 2010, Rikihisa und Lin 2010, Vergunst *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2011). All diese Eigenschaften treffen auch auf die Substrate XCV0160, XCV0687 und XCV0792 zu (Anhang, Tabelle 5.4), deren C-terminaler Bereich vermutlich auch ein funktionales T4A-Translokationssignal aufweist. Der C-terminale Bereich von XCV1697 weist nicht die gleiche Hydrophilizität auf wie XCV0160, XCV0687 und XCV0792. Dennoch vermittelte auch der C-terminale Bereich von XCV1697 die Translokation des dTALE-2 durch *A. tumefaciens* (Abbildung 3.5.3 B).

Wie im Fall von T3S-Signalen ist das T4-Translokationssignal sowohl in T4AS- als auch T4BS-Substraten häufig in unstrukturierten Proteinbereichen lokalisiert (Nagai *et al.*, 2005, Vergunst *et al.*, 2005). Laut Phyre-2-Analysen weisen die C-terminalen 50 Aminosäuren von XCV1697 lediglich in den letzten sieben Aminosäuren einen unstrukturierten Bereich auf. Im C-terminalen Bereich von XCV0792 werden dagegen  $\beta$ -Stränge und  $\alpha$ -Helices vorhergesagt und keine unstrukturierten Bereiche. Die C-terminalen 50 Aminosäuren von XCV0160 weisen zwei größere und im Fall von XCV0687 zwei kleinere unstrukturierte Bereiche auf. Interessanterweise werden für XCV0160 weitere unstrukturierte Bereiche im N-terminalen Bereich des Proteins vorhergesagt.

Im Gegensatz zu den meisten T4S-Substraten besitzt XCV0160 ein N-terminales Sec-Signal. Das Sec-Signal könnte zunächst den Transport von XCV0160 durch das Sec-System über die innere Bakterienmembran ins Periplasma ermöglichen, um anschließend mittels des C-terminalen T4-Translokationssignals durch das T4S-System transportiert zu werden. Auch wenn das T4S-System generell als ein Ein-Schritt-Transportprozess betrachtet wird, kann ein periplasmatischer Zwischenschritt nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein solches Szenario wird für BPE123 von *B. abortus*, das Pertussistoxin von *B. pertussis*, das DotA-Protein von *L. pneumophila* und das Cytotoxin CagA von *Helicobacter pylori*, welche alle ein N-terminales Sec-Signal besitzen vermutet (Burns *et al.*, 2004, Hohlfeld *et al.*, 2006, Marchesini *et al.*, 2011, Nagai und Roy 2001). Vorläufige *in vitro*-Sekretionsanalysen haben ergeben, dass XCV0160-3xc-Myc durch den *Xcv*-Stamm 85-10 unabhängig vom T4BS-System sekretiert wird (Scheibner und Büttner, unpubliziert). Ob die Sekretion von XCV0160-3xc-Myc in einer Mutante, die in beiden T4S-Systemen defizient ist, verhindert wird bleibt zu klären. In zukünftigen Projekten sollte die Sekretion weiterer putativer T4S-Substrate als Vollängenproteine durch den Stamm 85-10 und 75-3 bzw. durch eine entsprechende T4AS- und/oder T4BS-Systemmutante untersucht werden. Da C-terminale Epitop-Markierungen die Sekretion von T4S-Substraten negativ beeinflussen könnten, sollten potentielle T4S-Substrate von *Xcv* mit einer N-terminalen Epitop-Markierung analysiert werden. Dafür eignet sich der in dieser Arbeit generierte Vektor pBRNM (Kapitel 2.2.1.7), der zu einer translationalen Fusion eines 3x Myc-Epitop im N-terminalen Bereich des Genprodukts führt. Im Fall von *in vitro*-Sekretionsstudien müsste zudem beachtet werden, unter welchen Bedingungen das jeweilige T4S-System aktiv ist (siehe Kapitel 4.3.1).

## Literaturverzeichnis

- Abe, A., de Grado, M., Pfuetzner, R. A., Sanchez-Sanmartin, C., Devinney, R., Puente, J. L., Strynadka, N. C. und Finlay, B. B.** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol* **33**:1162-1175.
- Abe, A., Nishimura, R., Tanaka, N., Kurushima, J. und Kuwae, A.** 2015. The *Bordetella* secreted regulator BspR is translocated into the nucleus of host cells via its N-terminal moiety: Evaluation of bacterial effector translocation by the *Escherichia coli* type III secretion system. *PLoS One* **10**:e0135140.
- Akeda, Y. und Galan, J. E.** 2004. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* **186**:2402-2412.
- Akeda, Y. und Galán, J. E.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911-915.
- Al-Quadani, T., Price, C. T., London, N., Schueler-Furman, O. und AbuKwaik, Y.** 2011. Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm. *Trends Microbiol* **19**:573-579.
- Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C. und Farah, C. S.** 2005. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* **187**:2315-2325.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C. und Cornelis, G. R.** 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**:4534-4542.
- Allen-Vercoe, E., Toh, M. C., Waddell, B., Ho, H. und DeVinney, R.** 2005. A carboxy-terminal domain of Tir from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC O157:H7) required for efficient type III secretion. *FEMS Microbiol Lett* **243**:355-364.
- Alvarez-Martinez, C. E. und Christie, P. J.** 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:775-808.
- Aly, K. A. und Baron, C.** 2007. The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**:3766-3775.
- Amyot, W. M., deJesus, D. und Isberg, R. R.** 2013. Poison domains block transit of translocated substrates via the *Legionella pneumophila* lcm/Dot system. *Infect Immun* **81**:3239-3252.
- Anderson, D. M. und Schneewind, O.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**:1140-1143.
- Ansong, C., Yoon, H., Porwollik, S., Mottaz-Brewer, H., Petritis, B. O., Jaitly, N., Adkins, J. N., McClelland, M., Heffron, F. und Smith, R. D.** 2009. Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS One* **4**:e4809.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H. W., Horn, M. und Rattei, T.** 2009. Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog* **5**:e1000376.
- Atmakuri, K., Cascales, E. und Christie, P. J.** 2004. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**:1199-1211.
- Atmakuri, K., Ding, Z. und Christie, P. J.** 2003. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**:1699-1713.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** 1996. Current protocols in molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory, NY
- Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J. und Radman, M.** 2008. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* **319**:1533-1536.

- Backert, S. und Selbach, M.** 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* **10**:1573-1581.
- Bange, G., Kummerer, N., Engel, C., Bozkurt, G., Wild, K. und Sinning, I.** 2010. FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:11295-11300.
- Bardill, J. P., Miller, J. L. und Vogel, J. P.** 2005. IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **56**:90-103.
- Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U. Z. und Bornke, F.** 2009. The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Mol Plant Microbe Interact* **22**:655-664.
- Beare, P. A., Larson, C. L., Gilk, S. D. und Heinzen, R. A.** 2012. Two systems for targeted gene deletion in *Coxiella burnetii*. *Appl Environ Microbiol* **78**:4580-4589.
- Beijersbergen, A., Dulk-Ras, A. D., Schilperoort, R. A. und Hooykaas, P. J.** 1992. Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **256**:1324-1327.
- Beijersbergen, A., Smith, S. J. und Hooykaas, P. J.** 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **32**:212-218.
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F. und Gross, D. C.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:266-292.
- Berger, C., Robin, G. P., Bonas, U. und Koebnik, R.** 2010. Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiology* **156**:1963-1974.
- Berger, K. H. und Isberg, R. R.** 1993. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **7**:7-19.
- Bergeron, J. R., Worrall, L. J., Sgourakis, N. G., DiMaio, F., Pfuetzner, R. A., Felise, H. B., Vuckovic, M., Yu, A. C., Miller, S. I., Baker, D. und Strynadka, N. C.** 2013. A refined model of the prototypical *Salmonella* SPI-1 T3SS basal body reveals the molecular basis for its assembly. *PLoS Pathog* **9**:e1003307.
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A. und Christie, P. J.** 2013. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol* **164**:620-639.
- Bhavsar, A. P., Guttman, J. A. und Finlay, B. B.** 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* **449**:827-834.
- Birtalan, S. C., Phillips, R. M. und Ghosh, P.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**:971-980.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. und Sansonetti, P.** 1999. The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**:683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. und Allaoui, A.** 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* **39**:652-663.
- Blocker, A. J., Deane, J. E., Veenendaal, A. K., Roversi, P., Hodgkinson, J. L., Johnson, S. und Lea, S. M.** 2008. What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:6507-6513.
- Boch, J. und Bonas, U.** 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* **48**:419-436.
- Boch, J., Bonas, U. und Lahaye, T.** 2014. TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist* **204**:823-832.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J. und Stall, R. E.** 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**:88.

- Boyer, H. W. und Roulland-Dussoix, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**:459-472.
- Brunings, A. M. und Gabriel, D. W.** 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* **4**:141-157.
- Buchko, G. W., Niemann, G., Baker, E. S., Belov, M. E., Smith, R. D., Heffron, F., Adkins, J. N. und McDermott, J. E.** 2010. A multi-pronged search for a common structural motif in the secretion signal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III effector proteins. *Mol Biosyst* **6**:2448-2458.
- Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxtel, R., Cornelis, G. R., Tommassen, J. und Koster, M.** 2004. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**:5366-5375.
- Burns, D. L., Fiddner, S., Cheung, A. M. und Verma, A.** 2004. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits in vivo and their interaction with the ptl transport apparatus. *Infect Immun* **72**:5365-5372.
- Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G. und Pupko, T.** 2009. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* **5**:e1000508.
- Buscher, B. A., Conover, G. M., Miller, J. L., Vogel, S. A., Meyers, S. N., Isberg, R. R. und Vogel, J. P.** 2005. The DotL protein, a member of the TraG-coupling protein family, is essential for Viability of *Legionella pneumophila* strain Lp02. *J Bacteriol* **187**:2927-2938.
- Büttner, D.** 2012. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**:262-310.
- Büttner, D. und Bonas, U.** 2002. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**:5313-5322.
- Büttner, D. und Bonas, U.** 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**:107-133.
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D. und 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. und 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., Klusener, B. und Bonas, U.** 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **184**:2389-2398.
- Büttner, D., Noël, L., Stuttmann, J. und Bonas, U.** 2007. Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**:1063-1074.
- Cambronne, E. D. und Roy, C. R.** 2007. The *Legionella pneumophila* LcmSW complex interacts with multiple Dot/Lcm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**:e188.
- Canteros, B. I.** 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ph.D. thesis. University of Florida, Gainesville, FL.
- Cascales, E. und Christie, P. J.** 2004. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**:1170-1173.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E. T. und Staskawicz, B. J.** 2002. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:8336-8341.
- Chandran Darbari, V. und Waksman, G.** 2015. Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Biochem* **84**:603-629.
- Chandran, V.** 2013. Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem Soc Trans* **41**:17-28.

- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J. und Waksman, G.** 2009. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**:1011-1015.
- Chang, J. H., Desveaux, D. und Creason, A. L.** 2014. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **52**:317-345.
- Chen, C., Banga, S., Mertens, K., Weber, M. M., Gorbashieva, I., Tan, Y., Luo, Z. Q. und Samuel, J. E.** 2010. Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:21755-21760.
- Chen, L., Ai, X., Portaliou, A. G., Minetti, C. A., Remeta, D. P., Economou, A. und Kalodimos, C. G.** 2013. Substrate-activated conformational switch on chaperones encodes a targeting signal in type III secretion. *Cell Rep* **3**:709-715.
- Cheng, L. W. und Schneewind, O.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J Biol Chem* **274**:22102-22108.
- Chithrashree, C. und Srinivas, C.** 2016. Role of antioxidant scavenging enzymes and extracellular polysaccharide in pathogenicity of rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *African J of Biotech* **11**:13186-13193.
- Chiu, H. J., Lin, W. S. und Syu, W. J.** 2003. Type III secretion of EspB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Microbiol* **180**:218-226.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. und Cascales, E.** 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**:451-485.
- Christie, P. J., Whitaker, N. und Gonzalez-Rivera, C.** 2014. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* **1843**:1578-1591.
- Cianciotto, N. P.** 2009. Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol* **4**:797-805.
- Claros, M. G.** 1995. MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci* **11**:441-447.
- Conner, S. D. und Schmid, S. L.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**:37-44.
- Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:742-752.
- Cornelis, G. R.** 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**:811-825.
- Cornelis, G. R. und Van Gijsegem, F.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**:735-774.
- Crago, A. M. und Koronakis, V.** 1998. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* **30**:47-56.
- Crawford, J. A. und Kaper, J. B.** 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **46**:855-868.
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Harris, D., Churcher, C., Bentley, S. D., Parkhill, J., Thomson, N. R. und Avison, M. B.** 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* **9**:R74.
- Cui, J. und Shao, F.** 2011. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends Biochem Sci* **36**:532-540.

- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A. *et al.*, 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-463.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. und Fielding, A. H. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* **3**:3323-3328.
- de Felipe, K. S., Pampou, S., Jovanovic, O. S., Pericone, C. D., Ye, S. F., Kalachikov, S. und Shuman, H. A. 2005. Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol* **187**:7716-7726.
- de Jong, M. F., Sun, Y. H., den Hartigh, A. B., van Dijk, J. M. und Tsolis, R. M. 2008. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **70**:1378-1396.
- Dean, P. 2011. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* **35**:1100-1125.
- Deane, J. E., Graham, S. C., Mitchell, E. P., Flot, D., Johnson, S. und Lea, S. M. 2008. Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol* **69**:267-276.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. und Leemans, J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**:4777-4788.
- DebRoy, S., Dao, J., Soderberg, M., Rossier, O. und Cianciotto, N. P. 2006. *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:19146-19151.
- den Hartigh, A. B., Rolan, H. G., de Jong, M. F. und Tsolis, R. M. 2008. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol* **190**:4427-4436.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U. und Cornelis, G. R. 2010. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**:1928-1940.
- Diepold, A. und Wagner, S. 2014. Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol Rev* **38**:802-822.
- Dodds, P. N. und Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**:539-548.
- Dohlich, K., Zumsteg, A. B., Goosmann, C. und Kolbe, M. 2014. A substrate-fusion protein is trapped inside the type III secretion system channel in *Shigella flexneri*. *PLoS Pathog* **10**:e1003881.
- Dong, X., Zhang, Y. J. und Zhang, Z. 2013. Using weakly conserved motifs hidden in secretion signals to identify type-III effectors from bacterial pathogen genomes. *PLoS One* **8**:e56632.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L. und Zhu, G. 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol* **53**:1-8.
- Dumas, F., Duckely, M., Pelczar, P., Van Gelder, P. und Hohn, B. 2001. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:485-490.
- Dym, O., Albeck, S., Unger, T., Jacobovitch, J., Branzburg, A., Michael, Y., Frenkiel-Krispin, D., Wolf, S. G. und Elbaum, M. 2008. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:11170-11175.



- Ehsani, S., Rodrigues, C. D. und Enninga, J.** 2009. Turning on the spotlight--using light to monitor and characterize bacterial effector secretion and translocation. *Curr Opin Microbiol* **12**:24-30.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I. und Lanka, E.** 1999. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem* **274**:22548-22555.
- Engler, C., Kandzia, R. und Marillonnet, S.** 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**:e3647.
- Enninga, J., Mounier, J., Sansonetti, P. und Tran Van Nhieu, G.** 2005. Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods* **2**:959-965.
- Ensminger, A. W.** 2016. *Legionella pneumophila*, armed to the hilt: justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world. *Curr Opin Microbiol* **29**:74-80.
- Escolar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. und Bonas, U.** 2001. Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol* **2**:287-296.
- Escoll, P., Mondino, S., Rolando, M. und Buchrieser, C.** 2016. Targeting of host organelles by pathogenic bacteria: a sophisticated subversion strategy. *Nat Rev Microbiol* **14**:5-19.
- Faulkner, C. und Robatzek, S.** 2012. Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Curr Opin Plant Biol* **15**:699-707.
- Feldman, M. F. und Cornelis, G. R.** 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**:151-158.
- Fenselau, S. und 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.
- Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* **9**:275-296.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. und Waksman, G.** 2009. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**:266-268.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C. und Wagner, S.** 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**:415-438.
- Garita-Cambronero, J., Palacio-Bielsa, A., Lopez, M. M. und Cubero, J.** 2016. Draft genome sequence for virulent and avirulent strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus* spp. in Spain. *Stand Genomic Sci* **11**:12.
- Gawthorne, J. A., Audry, L., McQuitty, C., Dean, P., Christie, J. M., Enninga, J. und Roe, A. J.** 2016. Visualizing translocation and localization of bacterial type III effector proteins using a genetically encoded reporter system. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.03418-15.
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., Liu, L. und Shao, F.** 2009. A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the I-kappaB family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:13725-13730.
- Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:771-795.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Cazalet, C. und Buchrieser, C.** 2011. Comparative and functional genomics of *Legionella* identified eukaryotic like proteins as key players in host-pathogen interactions. *Front Microbiol* **2**:208.
- Green, I., Christison, R., Voyce, C. J., Bundell, K. R. und Lindsay, M. A.** 2003. Protein transduction domains: are they delivering? *Trends Pharmacol Sci* **24**:213-215.
- Greenberg, J. T. und Yao, N.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**:201-211.
- Gürlebeck, D., Szurek, B. und Bonas, U.** 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J* **42**:175-187.

- Guttman, C., Davidov, G., Shaked, H., Kolusheva, S., Bitton, R., Ganguly, A., Miller, J. F., Chill, J. H. und Zarivach, R. 2013. Characterization of the N-terminal domain of BteA: a *Bordetella* type III secreted cytotoxic effector. *PLoS One* **8**:e55650.
- Guttman, D. S., Vinatzer, B. A., Sarkar, S. F., Ranall, M. V., Kettler, G. und Greenberg, J. T. 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**:1722-1726.
- Hamann, T. 2012. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front Plant Sci* **3**:77.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C. und Baron, C. 2000. VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **182**:4505-4511.
- Hare, S., Bayliss, R., Baron, C. und Waksman, G. 2006. A large domain swap in the VirB11 ATPase of *Brucella suis* leaves the hexameric assembly intact. *J Mol Biol* **360**:56-66.
- Hartmann, N. und Büttner, D. 2013. The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* spp. is involved in substrate docking during type III secretion. *Mol Plant Microbe Interact* **26**:1176-1189.
- Hartmann, N., Schulz, S., Lorenz, C., Fraas, S., Hause, G. und Büttner, D. 2012. Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* **158**:1334-1349.
- Hausner, J. und Büttner, D. 2014. The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates. *Microbiol* **160**:576-588.
- Hausner, J., Hartmann, N., Lorenz, C. und Büttner, D. 2013. The periplasmic HrpB1 protein from *Xanthomonas* spp. binds to peptidoglycan and to components of the type III secretion system. *Appl Environ Microbiol* **79**:6312-6324.
- Hayward, A. 1993. The hosts of *Xanthomonas*, p 1-119, *Xanthomonas*. Springer.
- He, S. Y., Nomura, K. und Whittam, T. S. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**:181-206.
- Hicks, S. W. und Galan, J. E. 2013. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat Rev Microbiol* **11**:316-326.
- Hoebeke, J., Van Nijen, G. und De Brabander, M. 1976. Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* **69**:319-324.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G. V., Haas, R. und Fischer, W. 2006. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* **59**:1624-1637.
- Holland, I. B., Schmitt, L. und Young, J. 2009. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Molecular Membrane Biology* **22**:29-39.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. und Macnab, R. M. 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella* Typhimurium. *J Mol Biol* **211**:465-477.
- Hoppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A. N. und Baron, C. 2004. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **186**:1415-1422.
- Hu, J., Qian, W. und He, C. 2007. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *eglXoB* endoglucanase gene is required for virulence to rice. *FEMS Microbiol Lett* **269**:273-279.
- Huang, L., Boyd, D., Amyot, W. M., Hempstead, A. D., Luo, Z. Q., O'Connor, T. J., Chen, C., Machner, M., Montminy, T. und Isberg, R. R. 2011. The E Block motif is associated with *Legionella pneumophila* translocated substrates. *Cell Microbiol* **13**:227-245.
- Hubber, A. und Roy, C. R. 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**:261-283.

- Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379-433.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. und 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.
- Hwang, H. H., Gelvin, S. B. und Lai, E. M. 2015. Editorial: "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". *Front Plant Sci* **6**:265.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. und Schmidt, M. A. 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**:669-679.
- Ince, D., Sutterwala, F. S. und Yahr, T. L. 2015. Secretion of flagellar proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion-injectisome system. *J Bacteriol* **197**:2003-2011.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J. und Heidtman, M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**:13-24.
- Jacobi, C. A., Roggenkamp, A., Rakin, A., Zumbihl, R., Leitritz, L. und Heesemann, J. 1998. *In vitro* and *in vivo* expression studies of *yopE* from *Yersinia enterocolitica* using the *gfp* reporter gene. *Mol Microbiol* **30**:865-882.
- Jakubowski, S. J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V. und Christie, P. J. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **187**:3486-3495.
- Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G. und Christie, P. J. 2009. *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol* **71**:779-794.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E. und Christie, P. J. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol* **341**:961-977.
- Jha, G., Rajeshwari, R. und Sonti, R. V. 2007. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* **20**:31-40.
- Jiang, B. L., He, Y. Q., Cen, W. J., Wei, H. Y., Jiang, G. F., Jiang, W., Hang, X. H., Feng, J. X., Lu, G. T., Tang, D. J. und Tang, J. L. 2008. The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. *Res Microbiol* **159**:216-220.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. und Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**:755-762.
- Jones, J. D. und Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.
- Kalogeraki, V. S. und Winans, S. C. 1998. Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. *J Bacteriol* **180**:5660-5667.
- Karlinsey, J. E., Lonner, J., Brown, K. L. und Hughes, K. T. 2000. Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell* **102**:487-497.
- Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K. T., Kato, T. und Namba, K. 2013. Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body. *Sci Rep* **3**:3369.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**:648-651.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R. und Bonas, U. 2009. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 $\Delta$ rep16. *Plant J* **59**:859-871.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. und Finlay, B. B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.

- Kerr, J. E. und Christie, P. J.** 2010. Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 type IV secretion system. *J Bacteriol* **192**:4923-4934.
- Kim, B. H., Kim, H. G., Kim, J. S., Jang, J. I. und Park, Y. K.** 2007. Analysis of functional domains present in the N-terminus of the SipB protein. *Microbiology* **153**:2998-3008.
- Kim, J. G., Taylor, K. W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E. A. und Mudgett, M. B.** 2008. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell* **20**:1915-1929.
- Kimbrough, T. G. und Miller, S. I.** 2000. Contribution of *Salmonella Typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:11008-11013.
- Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity [Defense reaction of plants to pathogens]. *Phytopathogenic Prokaryotes* **2**:149-177.
- Knoop, V., Staskawicz, B. und Bonas, U.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol* **173**:7142-7150.
- Koncz, C. und Schell, J.** 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG* **204**:383-396.
- Koraimann, G.** 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**:2371-2388.
- Kousik, C. und Ritchie, D. F.** 1998. Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant disease* **82**:181-186.
- Kubori, T., Hyakutake, A. und Nagai, H.** 2008. *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol* **67**:1307-1319.
- Kubori, T., Koike, M., Bui, X. T., Higaki, S., Aizawa, S. und Nagai, H.** 2014. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella pathogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:11804-11809.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. und Aizawa, S. I.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-605.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. und Aizawa, S. I.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-605.
- Kubori, T. und Nagai, H.** 2016. The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol* **29**:22-29.
- Kuroda, T., Kubori, T., Thanh Bui, X., Hyakutake, A., Uchida, Y., Imada, K. und Nagai, H.** 2015. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep* **5**:10912.
- Kvitko, B. H., Park, D. H., Velasquez, A. C., Wei, C. F., Russell, A. B., Martin, G. B., Schneider, D. J. und Collmer, A.** 2009. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog* **5**:e1000388.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.
- Ladant, D. und Ullmann, A.** 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* **7**:172-176.
- Lai, E. M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E. und Kado, C. I.** 2002. Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol* **184**:327-330.
- Lai, E. M. und Kado, C. I.** 1998. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**:2711-2717.

- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X. und Galán, J. E. 2011. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**:1188-1191.
- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P. J., Lloyd, S. A., Wolf-Watz, H. und Forsberg, A. 2002. Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol* **184**:4500-4509.
- Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J. und Frost, L. S. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**:1-15.
- Lee, P. C. und Rietsch, A. 2015. Fueling type III secretion. *Trends Microbiol* **23**:296-300.
- Lefebvre, M. D. und Galán, J. E. 2014. The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a Salmonella type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:817-822.
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J.-G. und De Ley, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review* **50**:308-356.
- Li, J., Wolf, S. G., Elbaum, M. und Tzfira, T. 2005. Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol* **13**:295-298.
- Li, R. F., Lu, G. T., Li, L., Su, H. Z., Feng, G. F., Chen, Y., He, Y. Q., Jiang, B. L., Tang, D. J. und Tang, J. L. 2014. Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ Microbiol* **16**:2053-2071.
- Lifshitz, Z., Burstein, D., Peeri, M., Zusman, T., Schwartz, K., Shuman, H. A., Pupko, T. und Segal, G. 2013. Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:E707-715.
- Lilic, M., Vujanac, M. und Stebbins, C. E. 2006. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell* **21**:653-664.
- Lima, T., Auchincloss, A. H., Coudert, E., Keller, G., Michoud, K., Rivoire, C., Bulliard, V., de Castro, E., Lachaize, C., Baratin, D., Phan, I., Bougueleret, L. und Bairoch, A. 2009. HAMAP: a database of completely sequenced microbial proteome sets and manually curated microbial protein families in UniProtKB/Swiss-Prot. *Nucleic Acids Res* **37**:D471-478.
- Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A. und Langel, U. 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **21**:99-103.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J. und Sebo, P. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **34**:1076-1112.
- Llobes, R., Bernadac, A., Houot, L. und Pommier, S. 2013. Non classical secretion systems. *Res Microbiol* **164**:655-663.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. und Wolf-Watz, H. 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**:520-531.
- Lloyd, S. A., Sjöström, M., Andersson, S. und Wolf-Watz, H. 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Molecular Microbiology* **43**:51-59.
- Lockwood, S., Voth, D. E., Brayton, K. A., Beare, P. A., Brown, W. C., Heinzen, R. A. und Broschat, S. L. 2011. Identification of *Anaplasma marginale* type IV secretion system effector proteins. *PLoS One* **6**:e27724.
- Login, F. H. und Wolf-Watz, H. 2015. YscU/FlhB of *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a C-terminal type III secretion signal. *J Biol Chem* **290**:26282-26291.
- Lohou, D., Lonjon, F., Genin, S. und Vaillau, F. 2013. Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Front Plant Sci* **4**:435.

- Lonjon, F., Turner, M., Henry, C., Rengel, D., Lohou, D., van de Kerkhove, Q., Cazale, A. C., Peeters, N., Genin, S. und Vailliau, F. 2016. Comparative secretome analysis of *Ralstonia solanacearum* type 3 secretion-associated mutants reveals a fine control of effector delivery, essential for bacterial pathogenicity. *Mol Cell Proteomics* **15**:598-613.
- Loquet, A., Sgourakis, N. G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D., Becker, S. und Lange, A. 2012. Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* **486**:276-279.
- Lorenz, C. und 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.
- Lorenz, C. und Büttner, D. 2011. Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol Microbiol* **79**:447-467.
- Lorenz, C., Hausner, J. und Büttner, D. 2012. HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. *PLoS One* **7**:e51063.
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U. und Büttner, D. 2008b. 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. und Büttner, D. 2008a. HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* **4**:e1000094.
- Lountos, G. T., Austin, B. P., Nallamsetty, S. und Waugh, D. S. 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.
- Löwer, M. und Schneider, G. 2009. Prediction of type III secretion signals in genomes of gram-negative bacteria. *PLoS One* **4**:e5917.
- Lundberg, M., Wikstrom, S. und Johansson, M. 2003. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* **8**:143-150.
- Luo, W. und Donnenberg, M. S. 2011. Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J Bacteriol* **193**:2972-2980.
- Macho, A. P. 2016. Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytol* **210**:51-57.
- Majander, K., Anton, L., Antikainen, J., Lang, H., Brummer, M., Korhonen, T. K. und Westerlund-Wikstrom, B. 2005. Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nat Biotechnol* **23**:475-481.
- Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Salcedo, S. P., Gorvel, J. P. und Comerci, D. J. 2011. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**:1261-1274.
- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., Perret, X. und Broughton, W. J. 2003. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant Microbe Interact* **16**:743-751.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M. und Galan, J. E. 2006. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**:637-640.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E. und Unger, V. M. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**:1040-1042.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. und 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.
- Marra, A., Blander, S. J., Horwitz, M. A. und Shuman, H. A. 1992. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:9607-9611.

- Mattei , P. J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I. und Dessen, A.** 2011. Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**:414-426.
- Matthews, M. und Roy, C. R.** 2000. Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* lcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect Immun* **68**:3971-3982.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. und Wilson, R. K.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
- Melotto, M., Underwood, W. und He, S. Y.** 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* **46**:101-122.
- Menard, R., Sansonetti, P. J. und Parsot, C.** 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**:5899-5906.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C. Q., Al Sady, B., Clark, E. T. und Staskawicz, B. J.** 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **41**:801-814.
- Meyer, D., Cunnac, S., Gueneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., Boucher, C. und Arlat, M.** 2006. PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol* **188**:4903-4917.
- Meyer, D. F., Noroy, C., Moumene, A., Raffaele, S., Albina, E. und Vachier, N.** 2013. Searching algorithm for type IV secretion system effectors 1.0: a tool for predicting type IV effectors and exploring their genomic context. *Nucleic Acids Res* **41**:9218-9229.
- Michgehl, S., Heusipp, G., Greune, L., Ruter, C. und Schmidt, M. A.** 2006. Esp-independent functional integration of the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) into host cell membranes. *Cell Microbiol* **8**:625-633.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Millwood, R. J., Halfhill, M. D., Harkins, D., Russotti, R. und Stewart, C. N., Jr.** 2003. Instrumentation and methodology for quantifying GFP fluorescence in intact plant organs. *Biotechniques* **34**:638-643.
- Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P. D. und Namba, K.** 2012. Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol Microbiol* **83**:775-788.
- Minamino, T. und Macnab, R. M.** 2000. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* **182**:4906-4914.
- Minamino, T. und MacNab, R. M.** 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**:1052-1064.
- Minamino, T. und Namba, K.** 2008. Distinct roles of the Flil ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**:485-488.
- Minsavage, G., Dahlbeck, D., Whalen, M., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. und Stall, R.** 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*—pepper interactions. *Mol Plant Microbe In* **3**:41-47.
- Moncalian, G., Cabezon, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J. M., Goni, F. M. und de La Cruz, F.** 1999. Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J Biol Chem* **274**:36117-36124.

- Montagner, C., Arquint, C. und Cornelis, G. R.** 2011. Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. *J Bacteriol* **193**:6923-6928.
- Morbitzer, R., Romer, P., Boch, J. und Lahaye, T.** 2010. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:21617-21622.
- Morello, J. E. und 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.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. und Sasakawa, C.** 2006. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**:599-607.
- Moss, A. L. und Ward, W. F.** 1991. Multiple pathways for ligand internalization in rat hepatocytes. II: Effect of hyperosmolarity and contribution of fluid-phase endocytosis. *J Cell Physiol* **149**:319-323.
- Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Rossier, O., Bonas, U. und Staskawicz, B. J.** 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13324-13329.
- Mueller, C. A., Broz, P. und Cornelis, G. R.** 2008. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* **68**:1085-1095.
- Müller, M.** 2005. Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **156**:131-136.
- Müller, O. A., Grau, J., Thieme, S., Prochaska, H., Adlung, N., Sorgatz, A. und Bonas, U.** 2015. Genome-wide identification and validation of reference genes in infected tomato leaves for quantitative RT-PCR analyses. *PLoS One* **10**:e0136499.
- Mushegian, A. R., Fullner, K. J., Koonin, E. V. und Nester, E. W.** 1996. A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:7321-7326.
- Nagai, H., Cambronne, E. D., Kagan, J. C., Amor, J. C., Kahn, R. A. und Roy, C. R.** 2005. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:826-831.
- Nagai, H. und Kubori, T.** 2011. Type IVB secretion systems of *Legionella* and other gram-negative bacteria. *Front Microbiol* **2**:136.
- Nagai, H. und Roy, C. R.** 2001. The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J* **20**:5962-5970.
- Nakano, N., Kubori, T., Kinoshita, M., Imada, K. und Nagai, H.** 2010. Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVB and type II/III secretion systems. *PLoS Pathog* **6**:e1001129.
- Natale, P., Bruser, T. und Driessen, A. J.** 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**:1735-1756.
- Newton, H. J., McDonough, J. A. und Roy, C. R.** 2013. Effector protein translocation by the *Coxiella burnetii* Dot/Icm type IV secretion system requires endocytic maturation of the pathogen-occupied vacuole. *PLoS One* **8**:e54566.
- Niemann, G. S., Brown, R. N., Mushamiri, I. T., Nguyen, N. T., Taiwo, R., Stufkens, A., Smith, R. D., Adkins, J. N., McDermott, J. E. und Heffron, F.** 2013. RNA type III secretion signals that require Hfq. *J Bacteriol* **195**:2119-2125.
- Ninio, S., Zuckman-Cholon, D. M., Cambronne, E. D. und Roy, C. R.** 2005. The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol* **55**:912-926.
- Niu, H., Kozjak-Pavlovic, V., Rudel, T. und Rikihisa, Y.** 2010. *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction. *PLoS Pathog* **6**:e1000774.



- Noël, L., Thieme, F., Gabler, J., Büttner, D. und Bonas, U. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **185**:7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und Bonas, U. 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology* **184**:1340-1348.
- Notti, R. Q. und Stebbins, C. E. 2016. The structure and function of type III secretion systems. *Microbiol Spectr* **4**.
- Oh, C. S., Carpenter, S. C., Hayes, M. L. und Beer, S. V. 2010. Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **156**:1211-1220.
- Parsot, C. 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **6**:7-14.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D. F. und Hughes, K. T. 2008. Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**:489-492.
- Pei, Z., Burucoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, X. Z., Kopecko, D. J., Bourgeois, A. L., Fauchere, J. L. und Blaser, M. J. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun* **66**:938-943.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D. J., Tam, V. C., Chancey, S. T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L. M., Janes, M. D., Buell, C. R., Tang, X., Collmer, A. und Alfano, J. R. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7652-7657.
- Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. und Alfano, J. R. 2005. The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *J Bacteriol* **187**:649-663.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M. A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M. und Rott, P. 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* **10**:616.
- Planet, P. J., Kachlany, S. C., DeSalle, R. und Figurski, D. H. 2001. Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread *tadA* subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2503-2508.
- Prakash, A., Yogeeshwari, S., Sircar, S. und Agrawal, S. 2011. Protein domain of unknown function 3233 is a translocation domain of autotransporter secretory mechanism in gamma proteobacteria. *PLoS One* **6**:e25570.
- Purcell, M. und Shuman, H. A. 1998. The *Legionella pneumophila* *icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect Immun* **66**:2245-2255.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D. J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B. L., Zeng, S., Gu, W. Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G. P., Tang, J. L. und He, C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**:757-767.
- Radics, J., Konigsmair, L. und Marlovits, T. C. 2014. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol* **21**:82-87.
- Rajeshwari, R., Jha, G. und Sonti, R. V. 2005. Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* **18**:830-837.
- Ray, S. K., Rajeshwari, R. und Sonti, R. V. 2000. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**:394-401.

- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. und Lebleu, B.** 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**:585-590.
- Rikihisa, Y. und Lin, M.** 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**:59-66.
- Robinson, C. und Bolhuis, A.** 2004. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694**:135-147.
- Roblin, P., Dewitte, F., Villeret, V., Biondi, E. G. und Bompard, C.** 2015. A *Salmonella* type three secretion effector/chaperone complex adopts a hexameric ring-like structure. *J Bacteriol* **197**:688-698.
- Rocco, F., De Gregorio, E., Colonna, B. und Di Nocera, P. P.** 2009. *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: a start-up comparison. *Int J Med Microbiol* **299**:535-546.
- Rodgers, L., Gamez, A., Riek, R. und 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.
- Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W. L., Doyle, J. J. und Collmer, A.** 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:13142-13147.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. und Lahaye, T.** 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* **318**:645-648.
- Römer, P., Recht, S., Strauss, T., Elsaesser, J., Schornack, S., Boch, J., Wang, S. und Lahaye, T.** 2010. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol* **187**:1048-1057.
- Ronald, P. C. und Staskawicz, B. J.** 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol Plant Microbe Interact* **1**:191-198.
- Ross, J. A. und Plano, G. V.** 2011. A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC. *J Bacteriol* **193**:2276-2289.
- Rossier, O. und Cianciotto, N. P.** 2001. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **69**:2092-2098.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U.** 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* **38**:828-838.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. und Bonas, U.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9368-9373.
- Rüter, C., Buss, C., Scharnert, J., Heusipp, G. und Schmidt, M. A.** 2010. A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *Journal of Cell Science* **123**:2190-2198.
- Ryan, R. P., Vorholter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. und Dow, J. M.** 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* **9**:344-355.
- Sal-Man, N., Deng, W. und Finlay, B. B.** 2012. Escl: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem J* **442**:119-125.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning, vol 2. Cold spring harbor laboratory press New York.
- Samudrala, R., Heffron, F. und McDermott, J. E.** 2009. Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathog* **5**:e1000375.

- Sankarasubramanian, J., Vishnu, U. S., Dinakaran, V., Sridhar, J., Gunasekaran, P. und Rajendhran, J.** 2016. Computational prediction of secretion systems and secretomes of *Brucella*: identification of novel type IV effectors and their interaction with the host. *Molecular BioSystems* **12**:178-190.
- Sanowar, S., Singh, P., Pfuetzner, R. A., Andre, I., Zheng, H., Spreter, T., Strynadka, N. C., Gonen, T., Baker, D., Goodlett, D. R. und Miller, S. I.** 2010. Interactions of the transmembrane polymeric rings of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion system. *MBio* **1**.
- Savvides, S. N., Yeo, H. J., Beck, M. R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R. und Waksman, G.** 2003. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J* **22**:1969-1980.
- Schechter, L. M., Roberts, K. A., Jamir, Y., Alfano, J. R. und Collmer, A.** 2004. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J Bacteriol* **186**:543-555.
- Schechter, L. M., Valenta, J. C., Schneider, D. J., Collmer, A. und Sakk, E.** 2012. Functional and computational analysis of amino acid patterns predictive of type III secretion system substrates in *Pseudomonas syringae*. *PLoS One* **7**:e36038.
- Scheibner, F.** 2012. Funktionelle Charakterisierung der putativen Translokonproteine HrpF und XopA aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Masterarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Scheibner, F., Schulz, S., Hausner, J., Marillonnet, S. und Büttner, D.** 2016. Type III-dependent translocation of HrpB2 by a non-pathogenic *hpaABC* mutant of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas*. *Appl Environ Microbiol* doi:[10.1128/AEM.00537-16](https://doi.org/10.1128/AEM.00537-16).
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E. und Wolf-Watz, H.** 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J Bacteriol* **178**:7227-7233.
- Schlumberger, M. C., Muller, A. J., Ehrbar, K., Winnen, B., Duss, I., Stecher, B. und Hardt, W. D.** 2005. Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:12548-12553.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C. und Baron, C.** 1999. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **181**:7485-7492.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. und Dessen, A.** 2003. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* **22**:4957-4967.
- Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J. E. und Marlovits, T. C.** 2010. Topology and organization of the *Salmonella* Typhimurium type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**:e1000824.
- Schraidt, O. und Marlovits, T. C.** 2011. Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science* **331**:1192-1195.
- Schreiber, T. und Bonas, U.** 2014. Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero. *Nucleic Acids Res* **42**:7160-7169.
- Schreiber, T., Sorgatz, A., List, F., Bluher, D., Thieme, S., Wilmanns, M. und Bonas, U.** 2015. Refined requirements for protein regions important for activity of the TALE AvrBs3. *PLoS One* **10**:e0120214.
- Schroeder, G. N., Petty, N. K., Mousnier, A., Harding, C. R., Vogrin, A. J., Wee, B., Fry, N. K., Harrison, T. G., Newton, H. J., Thomson, N. R., Beatson, S. A., Dougan, G., Hartland, E. L. und Frankel, G.** 2010. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* **192**:6001-6016.
- Schuch, R. und Maurelli, A. T.** 2001. MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J Bacteriol* **183**:6991-6998.

- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T. A., Schmid, M. C., Schroder, G., Vergunst, A. C., Carena, I. und Dehio, C.** 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:856-861.
- Schulte, R. und Bonas, U.** 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J Bacteriol* **174**:815-823.
- Schulz, S.** 2013. Molekulare Charakterisierung der Typ III-sekretionsassoziierten Proteine HrpB2 und HpaC. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schulz, S. und Büttner, D.** 2011. Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Infect Immun* **79**:2998-3011.
- Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Kruger, A., Lee, J., Muller, O., Scheel, D., Szczesny, R., Thieme, F. und Bonas, U.** 2012. Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol* **195**:894-911.
- Segal, G., Russo, J. J. und Shuman, H. A.** 1999. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **34**:799-809.
- Sexton, J. A., Miller, J. L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T. E. und Vogel, J. P.** 2004. *Legionella pneumophila* DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun* **72**:5983-5992.
- Shirasu, K. und Kado, C. I.** 1993. Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **111**:287-294.
- Shirasu, K., Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B. und Kado, C. I.** 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol Microbiol* **11**:581-588.
- Simone, M., McCullen, C. A., Stahl, L. E. und Binns, A. N.** 2001. The carboxy-terminus of VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* is required for its transport to host cells by the virB-encoded type IV transport system. *Mol Microbiol* **41**:1283-1293.
- Singer, H. M., Erhardt, M. und Hughes, K. T.** 2014. Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates. *Mol Microbiol* **93**:505-520.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. und Kijne, J. W.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* **6**:2897-2903.
- Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A. K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M. und Büttner, D.** 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. *J Bacteriol* **197**:2879-2893.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Muller, S. A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A. und Cornelis, G. R.** 2007. YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J* **26**:3015-3024.
- Sorg, J. A., Blaylock, B. und Schneewind, O.** 2006. Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:16490-16495.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. und Cornelis, G. R.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:11998-12002.
- Souza, D. P., Andrade, M. O., Alvarez-Martinez, C. E., Arantes, G. M., Farah, C. S. und Salinas, R. K.** 2011. A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS Pathog* **7**:e1002031.

- Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N. S., Alegria, M. C., Barbosa, L. R., Salinas, R. K., Guzzo, C. R. und Farah, C. S. 2015. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun* **6**:6453.
- Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B., Baker, D., Miller, S. I. und Strynadka, N. C. 2009. A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **16**:468-476.
- Stall, R. E., Bartz, J. A. und Cook, A. A. 1974. Decreased hypersensitivity to *xanthomonads* in pepper after inoculations with virulent cells of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* **64**:731-735.
- Stamm, L. M. und Goldberg, M. B. 2011. Microbiology. Establishing the secretion hierarchy. *Science* **331**:1147-1148.
- Stavrinos, J., Ma, W. und Guttman, D. S. 2006. Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathog* **2**:e104.
- Studholme, D. J., Kemen, E., MacLean, D., Schornack, S., Aritua, V., Thwaites, R., Grant, M., Smith, J. und Jones, J. D. 2010. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. *FEMS Microbiol Lett* **310**:182-192.
- Stuttman, J. 2004. Analyse des Typ III-Proteinexports sowie eines Typ III-Sekretionschaperons von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sutherland, M. C., Binder, K. A., Cualing, P. Y. und Vogel, J. P. 2013. Reassessing the role of DotF in the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *PLoS One* **8**:e65529.
- Sutherland, M. C., Nguyen, T. L., Tseng, V. und Vogel, J. P. 2012. The *Legionella* lcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathog* **8**:e1002910.
- Szczesny, R., Büttner, D., Escolar, L., Schulze, S., Seiferth, A. und Bonas, U. 2010. Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol* **187**:1058-1074.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U. und Büttner, D. 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187**:983-1002.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. und Van den Ackerveken, G. 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**:523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. und Bonas, U. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**:13-23.
- Tamir-Ariel, D., Navon, N. und Burdman, S. 2007. Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *J Bacteriol* **189**:6359-6371.
- Tamir-Ariel, D., Rosenberg, T., Navon, N. und Burdman, S. 2012. A secreted lipolytic enzyme from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is expressed in planta and contributes to its virulence. *Mol Plant Pathol* **13**:556-567.
- Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Bastaki, M. N., Sarris, P. F., Charova, S. N., Kokkinidis, M. und Panopoulos, N. J. 2010. Playing the "Harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes. *Annu Rev Phytopathol* **48**:347-370.
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F. und Cabezon, E. 2005. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:8156-8161.
- Terashima, H., Kojima, S. und Homma, M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**:39-85.

- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. und 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. und 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.
- Tomalka, A. G., Stopford, C. M., Lee, P. C. und Rietsch, A. 2012. A translocator-specific export signal establishes the translocator-effector secretion hierarchy that is important for type III secretion system function. *Mol Microbiol* **86**:1464-1481.
- Triplett, L. R., Melotto, M. und Sundin, G. W. 2009. Functional analysis of the N terminus of the *Erwinia amylovora* secreted effector DspA/E reveals features required for secretion, translocation, and binding to the chaperone DspB/F. *Mol Plant Microbe Interact* **22**:1282-1292.
- Tsai, C. L., Burkinshaw, B. J., Strynadka, N. C. und Tainer, J. A. 2015. The *Salmonella* type III secretion system virulence effector forms a new hexameric chaperone assembly for export of effector/chaperone complexes. *J Bacteriol* **197**:672-675.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. und Setubal, J. C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**:S2.
- Urbanik, E. und Ware, B. R. 1989. Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch Biochem Biophys* **269**:181-187.
- Van Engelenburg, S. B. und Palmer, A. E. 2010. Imaging type-III secretion reveals dynamics and spatial segregation of *Salmonella* effectors. *Nat Meth* **7**:325-330.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. und Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**:169-170.
- VanRheenen, S. M., Dumenil, G. und Isberg, R. R. 2004. IcmF and DotU are required for optimal effector translocation and trafficking of the *Legionella pneumophila* vacuole. *Infect Immun* **72**:5972-5982.
- Veenendaal, A. K., Hodgkinson, J. L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S. F. und Blocker, A. J. 2007. The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol* **63**:1719-1730.
- Vergunst, A. C., van Lier, M. C., den Dulk-Ras, A. und Hooykaas, P. J. 2003. Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant Physiol* **133**:978-988.
- Vergunst, A. C., van Lier, M. C., den Dulk-Ras, A., Stuve, T. A., Ouweland, A. und Hooykaas, P. J. 2005. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:832-837.
- Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Buford, E. C., Miller, J. L. und Vogel, J. P. 2006. Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **62**:1278-1291.
- Vogel, J. und Luisi, B. F. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**:578-589.
- Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K. und Isberg, R. R. 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**:873-876.
- Vorholter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. und Puhler, A. 2008. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* **134**:33-45.

- Waksman, G. und Orlova, E. V.** 2014. Structural organisation of the type IV secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **17**:24-31.
- Wang, J., So, B., Kim, J., Park, Y., Lee, B. und Kang, H.** 2008. Genome-wide identification of pathogenicity genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by transposon mutagenesis. *Plant pathology* **57**:1136-1145.
- Wang, Y., Sun, M., Bao, H. und White, A. P.** 2013. T3\_MM: a Markov model effectively classifies bacterial type III secretion signals. *PLoS One* **8**:e58173.
- Wang, Y., Sun, M., Bao, H., Zhang, Q. und Guo, D.** 2013. Effective identification of bacterial type III secretion signals using joint element features. *PLoS One* **8**:e59754.
- Wang, Y., Wei, X., Bao, H. und Liu, S. L.** 2014. Prediction of bacterial type IV secreted effectors by C-terminal features. *BMC Genomics* **15**:50.
- Wang, Y., Zhang, Q., Sun, M. A. und Guo, D.** 2011. High-accuracy prediction of bacterial type III secreted effectors based on position-specific amino acid composition profiles. *Bioinformatics* **27**:777-784.
- Watabe, M., Yamaguchi, M., Kitamura, S. und Horino, O.** 1993. Immunohistochemical studies on localization of the extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in infected rice leaves. *Canadian J Microbio* **39**:1120-1126.
- Watarai, M., Makino, S. und Shirahata, T.** 2002. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiology* **148**:1439-1446.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. und Cornelis, G. R.** 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:10493-10497.
- Weber, E., Berger, C., Bonas, U. und Koebnik, R.** 2007. Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure. *Mol Plant Microbe Interact* **20**:559-567.
- Weber, E., Gruetzner, R., Werner, S., Engler, C. und Marillonnet, S.** 2011. Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. *PLoS One* **6**:e19722.
- Weber, E. und Koebnik, R.** 2005. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **187**:6175-6186.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T. K., Bonas, U. und 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. und Bonas, U.** 1996c. 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. und Bonas, U.** 1996b. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J Bacteriol* **178**:1061-1069.
- Wengelnik, K., Rossier, O. und Bonas, U.** 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol* **181**:6828-6831.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U.** 1996a. 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.
- Werner, S., Breus, O., Symonenko, Y., Marillonnet, S. und Gleba, Y.** 2011. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:14061-14066.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J. und 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.
- Wood, S. E., Jin, J. und Lloyd, S. A.** 2008. YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol* **190**:4252-4262.

- Xu, R. Q., Blanvillain, S., Feng, J. X., Jiang, B. L., Li, X. Z., Wei, H. Y., Kroj, T., Lauber, E., Roby, D., Chen, B., He, Y. Q., Lu, G. T., Tang, D. J., Vasse, J., Arlat, M. und Tang, J. L. 2008. AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol* **190**:343-355.
- Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E. und Waksman, G. 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**:1461-1472.
- Yerushalmi, G., Zusman, T. und Segal, G. 2005. Additive effect on intracellular growth by *Legionella pneumophila* Icm/Dot proteins containing a lipobox motif. *Infect Immun* **73**:7578-7587.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. und Namba, K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**:643-650.
- Yuan, J., Zweers, J. C., van Dijl, J. M. und Dalbey, R. E. 2010. Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell Mol Life Sci* **67**:179-199.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstein, C., Zarfel, G. E. und Koraimann, G. 2005. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**:3455-3467.
- Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I., Finlay, B. B. und Strynadka, N. C. 2008. Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**:124-127.
- Zechner, E. L., Lang, S. und Schildbach, J. F. 2012. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**:1073-1087.
- Zhang, W., Rong, C., Chen, C. und Gao, G. F. 2012. Type-IVC secretion system: a novel subclass of type IV secretion system (T4SS) common existing in gram-positive genus *Streptococcus*. *PLoS One* **7**:e46390.
- Zhao, S., Mo, W. L., Wu, F., Tang, W., Tang, J. L., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R. und Feng, J. X. 2013. Identification of non-TAL effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Chinese strain 13751 and analysis of their role in the bacterial virulence. *World J Microbiol Biotechnol* **29**:733-744.
- Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gatley, J. und Luo, Z. Q. 2011. Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* **6**:e17638.
- Zorko, M. und Langel, U. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:529-545.
- Zou, L., Nan, C. und Hu, F. 2013. Accurate prediction of bacterial type IV secreted effectors using amino acid composition and PSSM profiles. *Bioinformatics* **29**:3135-3142.
- Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D. und Zambryski, P. 2007. VirB1\* promotes T-pilus formation in the *vir*-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **189**:6551-6563.



## 5. Anhang

Tabelle 5.1 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
OneShot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HB101	Helferstamm für die Konjugation. pRK2013 trägt die tra-Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates, Kan <sup>R</sup>	(Boyer und Roulland-Dussoix 1969)
DH5α(λpir)	<i>recA hsdR17</i> (rK mK + ) φ80 <i>dlacZ</i> M15 [λpir]	(Menard <i>et al.</i> , 1993)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58ΔT-DNA), Rif <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	(Koncz und Schell 1986, Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
GV2260	Ti-Plasmid: pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA), Rif <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Deblaere <i>et al.</i> , 1985)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Paprika-Wildtypstamm (enthält <i>avrBs1</i> jedoch nicht <i>avrBs3</i> ), Rif <sup>R</sup>	(Canteros 1990)
85-10Δ <i>icmE</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>icmE</i> , Rif <sup>R</sup>	Solé und Büttner, unpubliziert
85-10Δ <i>dotCB</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>dotC</i> und <i>dotB</i> , Rif <sup>R</sup>	Solé und Büttner, unpubliziert
85-10Δ <i>icmE</i> Δ <i>dotCB</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>icmE</i> und <i>dotCB</i> , Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit
85-10 Δ <i>virB4</i> Δ <i>icmE</i> Δ <i>dotCB</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>virB4</i> , <i>icmE</i> und <i>dotCB</i> , Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit
85-10Δ <i>virB4</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>virB4</i> , Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit
85-10Δ <i>virD4</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>virD4</i> , Rif <sup>R</sup>	Solé, Scheibner und Büttner, unpubliziert
85-10Δ <i>virB11</i> Δ <i>virB1</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>virB11</i> und <i>virB1</i> , Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit
85-10Δ <i>virB4</i> Δ <i>virB11</i> Δ <i>virB1</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>virB4</i> , <i>virB11</i> und <i>virB1</i> , Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit
85-10Δ <i>xpsE</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>xpsE</i>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
85-10ΔT2S	Derivat von 85-10, Deletion von <i>xpsE</i> , <i>xcsE</i> und XCV4312, Rif <sup>R</sup>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
85-10ΔT2SΔ <i>icmE</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>xpsE</i> , <i>xcsE</i> , XCV4312 und <i>icmE</i> , Rif <sup>R</sup>	Solé, unpubliziert
85-10ΔT2SΔ <i>dotCB</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>xpsE</i> , <i>xcsE</i> , XCV4312 und <i>dotCB</i> , Rif <sup>R</sup>	Solé, unpubliziert
85-10Δ <i>avrBs1</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>avrBs1</i> , Rif <sup>R</sup>	Büttner, unpubliziert
85-10Δ <i>hpaB</i>	Derivat von 85-10, Deletion von <i>hpaB</i> , Rif <sup>R</sup>	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
85-10Δ <i>hrp</i>	Derivat von 85-10, Deletion des <i>hrp</i> -Genclusters, Rif <sup>R</sup>	Hausner und Büttner, unpubliziert
75-3Δ <i>hrcV</i> 85*	Derivat von 75-3, Deletion der Codons 324-642 von <i>hrcV</i> , Rif <sup>R</sup> Derivat von 85-10 mit Punktmutation in <i>hrpG</i> ( <i>hrpG</i> *). Bedingt konstitutive Aktivierung der <i>hrp</i> -Gene. Rif <sup>R</sup>	Diese Arbeit (Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
85*Δ <i>hrpF</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hrpF</i> , Rif <sup>R</sup>	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
85*Δ <i>hpaB</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hpaB</i> , Rif <sup>R</sup>	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
85*Δ <i>hpaB</i> Δ <i>hrcV</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hpaB</i> und <i>hrcV</i> , Rif <sup>R</sup>	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
85*Δ <i>avrBs1</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>avrBs1</i> , Rif <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
85*Δ <i>avrBs1</i> Δ <i>hpaB</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>avrBs1</i> und <i>hpaB</i> , Rif <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
85*Δ <i>avrBs1</i> Δ <i>hpaC</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>avrBs1</i> und <i>hpaC</i> , Rif <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
85*Δ <i>hpaB</i> Δ <i>hrpF</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hpaB</i> und <i>hrpF</i> , Rif <sup>R</sup>	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
85*Δ <i>hpaC</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hpaC</i> , Rif <sup>R</sup>	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
85*Δ <i>hpaA</i> Δ <i>hpaB</i> Δ <i>hpaC</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hpaA</i> , <i>hpaB</i> und <i>hpaC</i> , Rif <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
85*Δ <i>hpaA</i> Δ <i>hpaB</i> Δ <i>hpaC</i> Δ <i>hrcN</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hpaA</i> , <i>hpaB</i> , <i>hpaC</i> und <i>hrcN</i> , Rif <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
85*Δ <i>hrcV</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hrcV</i> , Rif <sup>R</sup>	(Rossier <i>et al.</i> , 2000)
85*Δ <i>hrcN</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hrcN</i> , Rif <sup>R</sup>	(Lorenz und Büttner 2009)
85*Δ <i>hrpE</i>	Derivat von 85*, Deletion der Codons 9-93 in <i>hrpE</i> , Rif <sup>R</sup>	(Weber <i>et al.</i> , 2005)
85*Δ <i>hrpF</i> Δ <i>xopA</i>	Derivat von 85*, Deletion von <i>hrpF</i> und <i>xopA</i> , Rif <sup>R</sup>	Scheibner und Büttner, unpubliziert

Kan - Kanamycin, Rif - Rifampicin, Amp - Ampicillin, Gent - Gentamicin, <sup>r</sup> - resistent

Tabelle 5.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pICH41021	Level -1-Vektor, Klonierungsvektor, <i>SmaI</i> , Amp <sup>R</sup>	Marillonnet, unpubliziert
pICH41308	Level 0-Vektor für ORFs, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Spec <sup>R</sup> (AATG/GCTT)	Marillonnet, unpubliziert
pICH41331	Level 0-Vektor für Promotoren, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Spec <sup>R</sup> (GGAG/CGCT)	Marillonnet, unpubliziert
pAGM1287	Level 0-Vektor für ORFs, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Spec <sup>R</sup> (AATG/TTCCG)	Marillonnet, unpubliziert
pAGM1301	Level 0-Vektor für C-terminalen Fusionspartner, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Spec <sup>R</sup> (TTCCG/GCTT)	Marillonnet, unpubliziert
pICH47732	Level 1-Vektor für Promotoren, enthält von <i>BsaI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> (TGCC/GCAA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH50422	Level 1-Vektor enthält <i>lac</i> -Promotor, welcher von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiert ist, Amp <sup>R</sup> (TGCC/GCAA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH50251	Level 1-Vektor für ORFs, Binärvektor, enthält von <i>BsaI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> (GCAA/ACTA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH41744	Level 2-Vektor, End-Linker, Spec <sup>R</sup> (ACTA/GGGA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH45066	Level 2-Vektor, Binärvektor, ColE1, pVS1 Ori, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Kan <sup>R</sup> (TGCC/GGGA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH77739	Level 2-Vektor, Binärvektor, OriV, enthält von <i>BpI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Kan <sup>R</sup> (TGCC/GGGA)	Marillonnet, unpubliziert
puc57	Klonierungsvektor, <i>SmaI</i> , Amp <sup>R</sup>	Genscript, USA
pBRM	„Golden Gate“-kompatibles pBR1MCS-5 Derivat, <i>lac</i> -Promotor, enthält von <i>BsaI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , Gent <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	(Szczeny <i>et al.</i> , 2010)
pBRM(Stopp)	pBBR1MCS-5-Derivat, mit Stoppcodon stromaufwärts der c-Myc-kodierenden Sequenz, Gent <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	Büttner und Jordan, unpubliziert
pBRM-P(Stopp)	pBBR1MCS-5-Derivat, mit Stoppcodon stromaufwärts der c-Myc-kodierenden Sequenz, Gent <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	Büttner und Jordan, unpubliziert
pBRM-P-Intermediat	pBRM-Derivat, keine Erkennungssequenzen für Typ IIs-Restriktionsenzyme, Gent <sup>R</sup>	Hausner und Büttner, unpubliziert
pBRNM	pBBR1MCS-5-Derivat, mit 3x c-Myc-kodierender Sequenz vor <i>LacZ</i> -kodierender Sequenz, mit Stoppcodon stromabwärts der <i>LacZ</i> -kodierenden Sequenz, Gent <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	Diese Arbeit
pOGG2	Derivat des Suizidvektors pOK1, <i>lac</i> -Promotor, enthält von Sequenzen von <i>hpaG</i> und <i>hpaF</i> , welche <i>lacZ</i> flankieren, „Golden Gate“-kompatibel, Spec <sup>R</sup> (CGAC/CCAT)	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pLAND	Derivat des Suizidvektors pOK1, Eigenschaften siehe pOGG2, Spec <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	(Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
pLAND-P	Derivat des Suizidvektors pOK1, Eigenschaften siehe pOGG2, jedoch ohne <i>lac</i> -Promotor, Spec <sup>R</sup> (ATTC/GGTG)	(Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
pGGA7	Binärvektor mit 35S-Promotor, C-terminalem 4x-c-Myc-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette, „Golden Gate“-Kompatibel, Spec <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pGGA3	Binärvektor mit 35S-Promotor, C-terminalem FLAG-Epitop, <i>ccdB</i> – Kasette, „Golden Gate“-kompatibel, Spec <sup>R</sup> (TATG/GGTG)	S. Thieme und U. Bonas, unpubliziert
pBR356	pBBR1MCS-5-Derivat, kodiert AvrBs3Δ2 mit Deletion der Codons 1-152, <i>lac</i> -Promotor, enthält von <i>BsaI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , „Golden Gate“-kompatibel, Gent <sup>R</sup> (TATG/GATC)	Lorenz und Büttner, unpubliziert
pBRM_avrBs1ΔN58	pBRM-P-Intermediat-Derivat, kodiert AvrBs1ΔN58 mit Deletion der Codons 1-58, <i>lac</i> -Promotor, enthält von <i>BsaI</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> , „Golden Gate“-kompatibel, Gent <sup>R</sup> (TATG/GATC)	Diese Arbeit
pJet1.2:N356	Kodiert die N-terminale Region von AvrBs3 (AvrBs3 <sub>153-287</sub> ), Amp <sup>R</sup> (TATG/GAAC)	Hahn und Bonas, unpubliziert
pUC_avrBs3 ΔN152	pUC57-Derivat, kodiert die N-terminale Region von AvrBs3 (AvrBs3 <sub>153-287</sub> ), Amp <sup>R</sup> (GATC/GAAC)	Diese Arbeit
pJet1.2:rep-avrBs3	Kodiert die „repeat“-Region von AvrBs3, Amp <sup>R</sup> (GAAC/AGCA)	(Schreiber und Bonas 2014)
pJet1.2:AR-avrBs3	Kodiert die AR-Region von AvrBs3, Amp <sup>R</sup> (AGCA/TCGC)	Sorgatz und Bonas, unpubliziert
pJet1.2:CTM-avrBs3	Kodiert die C-terminale Region von AvrBs3 (ohne Stopp), Amp <sup>R</sup> (TCGC/GGTG)	Sorgatz und Bonas, unpubliziert
pBRM_avrBs3 <sub>1-10</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-10</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_avrBs3 <sub>1-20</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-20</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_avrBs3 <sub>1-30</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-30</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Büttner und Jordan, unpubliziert
pBRM_avrBs3 <sub>1-40</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-40</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Büttner und Jordan, unpubliziert
pBRM_avrBs3 <sub>1-50</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-50</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Büttner und Jordan, unpubliziert
pBRM_avrBs3 <sub>1-30</sub> -avrBs3ΔN63	pBRM-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-30</sub> -AvrBs3ΔN63, Gent <sup>R</sup>	Scheibner und Matus, unpubliziert

pBRM_avrBs3	pBRM-Derivat, kodiert AvrBs3-FLAG, Gent <sup>R</sup>	Sorgatz und Bonas, unpubliziert
pDSM100	pDSK604-Derivat, Kodiert AvrBs1-3xc-Myc, Spec <sup>R</sup>	(Escobar <i>et al.</i> , 2001)
pBRM_avrBs1	pBRM-Derivat, kodiert AvrBs1, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGGA7_avrBs1ΔN58	pGGA7-Derivat, kodiert AvrBs1ΔN58-3xc-Myc(Stopp), Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_AvrBs3 <sub>1-10</sub> avrBs1ΔN58	pBRM_avrBs1ΔN58-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-10</sub> -AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_AvrBs3 <sub>1-20</sub> avrBs1ΔN58	pBRM_avrBs1ΔN58-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-20</sub> -AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_AvrBs3 <sub>1-30</sub> avrBs1ΔN58	pBRM_avrBs1ΔN58-Derivat, kodiert AvrBs3 <sub>1-30</sub> -AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_KK-avrBs1ΔN58	pBRM_avrBs1ΔN58-Derivat, kodiert KK-AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA <sub>Δ2-5</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>Δ2-5</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	F. Scheibner, Masterarbeit 2012
pBRM_xopA <sub>Δ2-10</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>Δ2-10</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	F. Scheibner, Masterarbeit 2012
pBRM_xopA <sub>Δ2-21</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>Δ2-21</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	F. Scheibner, Masterarbeit 2012
pBRM_xopA <sub>1-20</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>1-20</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA <sub>1-25</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>1-25</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA <sub>1-30</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA <sub>1-30</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA-avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert XopA-AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	Hoffmeister und Büttner, unpubliziert
pBRM_xopA <sub>1-25</sub> -avrBs1ΔN58	pBR156M-Derivat, kodiert XopA <sub>1-25</sub> -AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA <sub>1-30</sub> -avrBs1ΔN58	pBR156M-Derivat, kodiert XopA <sub>1-30</sub> -AvrBs1ΔN58, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_xopA <sub>1-30</sub> -avrBs1	pBRM-Derivat, kodiert XopA <sub>1-30</sub> -AvrBs1, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_hrpB2 <sub>1-40</sub> -avrBs1	pBRM-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-40</sub> -AvrBs1, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_hrpB2 <sub>1-40</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-40</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM_hrpB2 <sub>1-30</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-30</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM_hrpB2 <sub>1-25</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-25</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM_hrpB2 <sub>1-20</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-20</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM_hrpB2 <sub>9-40</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>9-40</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM_hrpB2 <sub>10-40</sub> -avrBs3Δ2	pBR356-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>10-40</sub> -AvrBs3Δ2, Gent <sup>R</sup>	(Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pBRM-P(Stopp)_P <sub>hrpF</sub> hrpF	pBRM-P(Stopp)-Derivat, kodiert HrpF mit nativem Promotor, Gent <sup>R</sup>	F. Scheibner, Masterarbeit 2012
pAGB130	Level -1-Modul, enthält <i>hrpB2</i> <sub>1-40</sub> , Amp <sup>R</sup> (AATG/TCAG)	Diese Arbeit
pAGB132	Level -1-Modul, enthält <i>hrpB</i> <sub>10-40</sub> , Amp <sup>R</sup> (AATG/TCAG)	Diese Arbeit
pAGB131	Level -1-Modul, enthält <i>hrpB2</i> <sub>11-40</sub> , Amp <sup>R</sup> (AATG/TCAG)	Diese Arbeit
pICH41021	Level -1-Modul, enthält ΔN63 des dTALE-2, Amp <sup>R</sup> (TCAG/AATC)	Diese Arbeit
pICH73079	Level -1-Modul, enthält Rep1 des dTALE-2, Amp <sup>R</sup> (AATC/CTTA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH73081	Level -1-Modul, enthält Rep2 des dTALE-2, Amp <sup>R</sup> (CTTA/AGAA)	Marillonnet, unpubliziert
pICH73093	Level -1-Modul, enthält Rep3 des dTALE-2, Amp <sup>R</sup> (AGAA/TCGG)	Marillonnet, unpubliziert
pICH72151	Level -1-Modul, enthält C-terminalen Bereich des dTALE-2 (C-ter), Amp <sup>R</sup> (TCGG/GCTT)	Marillonnet, unpubliziert
pICH73103	Level 0-Modul, enthält dTALE-2, Spec <sup>R</sup> (AATG/GCTT)	Marillonnet, unpubliziert
pAGB128	pICH77739-Derivat, kodiert dTALE-2, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB146	pICH77739-Derivat, kodiert KK-dTALE-2ΔN, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB143	pICH77739-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>1-40</sub> -dTALE-2ΔN, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB145	pICH77739-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>10-40</sub> -dTALE-2ΔN, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB144	pICH77739-Derivat, kodiert HrpB2 <sub>11-40</sub> -dTALE-2ΔN, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pOGG2_hrcV <sub>Δ324-642</sub>	pOGG2-Derivat, beinhaltet die flankierenden Regionen von <i>hrcV</i> <sub>324-642</sub> , Spec <sup>R</sup>	(Hartmann und Büttner 2013)
pOGG2_icmE	pOGG2-Derivat, beinhaltet die flankierenden Regionen von <i>icmE</i> , Spec <sup>R</sup>	Solé und Büttner, unpubliziert
pOGG2_virB11-virB1	pOGG2-Derivat, beinhaltet die flankierenden Regionen von <i>virB11</i> und <i>virB1</i> , Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit

pOGG2_virB4	pOGG2-Derivat, beinhaltet die flankierenden Regionen von <i>virB4</i> , Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_virB4	pBRM-Derivat, kodiert <i>VirB4</i> -3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM(Stopp)_virB4	pBRM-Derivat, kodiert <i>VirB4</i> , Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRNM_virB4	pBRNM-Derivat, kodiert 3xc-Myc- <i>VirB4</i> , Gent <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB042	pICH45066-Derivat, enthält den Promotor XCV0160, kodiert <i>lcmE</i> -3xc-Myc, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB043	pICH45066-Derivat, enthält den Promotor XCV0160, kodiert <i>DotCB</i> -3xc-Myc, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pLAND-P_P <sub>0160</sub> - <i>lcmE</i>	pLAND-P-Derivat, enthält den Promotor XCV0160, kodiert <i>lcmE</i> -3xc-Myc, Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pLAND-P_P <sub>0160</sub> - <i>dotCB</i>	pLAND-P-Derivat, enthält den Promotor XCV0160, kodiert <i>DotCB</i> -3xc-Myc, Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pBRM_XCV0536	pBRM-Derivat, kodiert XCV0536-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV0965	pBRM-Derivat, kodiert XCV0965-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	Solé, unpubliziert
pBRM_XCV4358	pBRM-Derivat, kodiert XCV4358-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV4360	pBRM-Derivat, kodiert XCV4360-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV0031	pBRM-Derivat, kodiert XCV0031-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
pBRM_XCV0889	pBRM-Derivat, kodiert XCV0889-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV0670	pBRM-Derivat, kodiert XCV0670-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV1823	pBRM-Derivat, kodiert XCV1823-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	Szczesny <i>et al.</i> , 2010
pBRM_XCV4355	pBRM-Derivat, kodiert XCV4355-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	(Solé <i>et al.</i> , 2015)
pBRM_XCV0722	pBRM-Derivat, kodiert XCV0722-3xc-Myc, Gent <sup>R</sup>	Szczesny <i>et al.</i> , 2010
pAGM10911	Level 2-Vektor, OriV, enthält den <i>lac</i> -Promotor, kodiert dTALE-2, welcher C-terminal ein von <i>Bpil</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> besitzt, das Plasmid besitzt keine „left“ und „right boarder“, Kan <sup>R</sup>	Marillonnet, unpubliziert
pAGM10923	Level 2-Vektor, OriV, enthält den <i>virE</i> -Promotor, kodiert dTALE-2, welcher C-terminal ein von <i>Bpil</i> -Schnittstellen flankiertes <i>lacZ</i> besitzt, das Plasmid besitzt keine „left“ und „right boarder“, Kan <sup>R</sup>	Marillonnet, unpubliziert
pAGM11643	Level 2-Modul, OriV, enthält den <i>lac</i> -Promotor, kodiert dTALE-2- <i>VirF</i> <sub>C30</sub> , das Plasmid besitzt keine „left“ und „right boarder“, Kan <sup>R</sup>	Marillonnet, unpubliziert
pICH90279	Level 2-Vektor, OriV, enthält den <i>virE</i> -Promotor, kodiert dTALE-2, das Plasmid besitzt keine „left“ und „right boarder“, Kan <sup>R</sup>	Marillonnet, unpubliziert
pAGB067	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV3992 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB073	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV4220 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB075	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV3492 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB074	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV0687 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB082	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV1697 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB083	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV2208 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB084	pAGM10911-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV0160 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB070	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV3992 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB069	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV4220 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB071	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV3492 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB072	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV0687 <sub>C49</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB077	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV1697 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB078	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV2208 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB079	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV0160 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAGB080	pAGM10923-Derivat, kodiert dTALE-2-XCV0792 <sub>C50</sub> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Kan - Kanamycin, Spec - Spectinomycin, Amp - Ampicilin, Gent - Gentamicin,<sup>f</sup> - resistent

Tabelle 5.3 Verwendete Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung
M13-for	GTAAAACGACGGCCAGTG	Zur Sequenzierung des Inserts in pUC57
M13-rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Zur Sequenzierung des Inserts in pUC57
pBR356_1980-rev	GTGTCGCCTCTGGCAACGC	Zur Sequenzierung des Inserts in pBR356
pBBR1180-for	ATGCATGCGCCAATACGCAAACCG	Zur Sequenzierung des Inserts in pBRM-Derivaten
pBBR-endlacZ-rev	CACTCATCGCAGTCGGCCTATTG	Zur Sequenzierung des Inserts in pBRM-Derivaten
pI45066for	CGCACGGCTGATGGGCTGCCTG	Zur Sequenzierung des Inserts in pICH45066
pI45066rev	CGCCACCTCTGACTTGAGCGTC	Zur Sequenzierung des Inserts in pICH45066
pICH_Seq_for	CAATACGCAAACCGCCTCTC	Zur Sequenzierung des Inserts in pICH41021
pICH_Seq_rev	CTGGCTTAACATGCGGCATC	Zur Sequenzierung des Inserts in pICH41021
pAGM109_Seq_for	CTCCCATTTGCTTGGCGTG	Zur Sequenzierung des Inserts in pAGM10911 und pAGM10923
pAGM109_Seq_rev	CTGGTGGAAACACGCCTGG	
lacZprom_for	TTTCGTCTCAAATTCGCAGCTGGCAGCAGAGTTTC	Zur Erstellung von AvrBs1DN58 ( <i>lac</i> -Promotor und <i>lacZ</i> -Fragment)
lacZ_rev	TTTCGTCTCAGATCAGAGACCTTACAATTTCCATTCG	
Bs159_for	TTTGGTCTCAGATCTAGCTTTGCACACCTCATCG	Zur Erstellung von AvrBs1DN58 ( <i>avrBs1DN58-3xc-myc</i> -Fragment)
Bs1myc_rev	TTTGGTCTCAAGCTTCAGTTCAAGTCTTCTCTGAG	
avrBs159_agro_for	GGTCTCTTATGGCTTTGCACACCTCATCGTTAG	Zur Klonierung von AvrBs1ΔN58 (Stoppcodon nach c-Myc-kodierender Sequenz) in pGGA7
avrBs1myc_agro_rev	GGTCTCTCACCTCAGTTCAAGTCTTCTCTGAG	
Esp-lacP-for	TTTCGTCTCTAATTCGCAGCTGGCAGCAGACAG	Zur Erstellung von pBRNM ( <i>lac</i> -Promotor Fragment)
Esp-lacP-rev	TTTCGTCTCTCATAGAATTTCTCCTGTGTG	
Esp-Myc-for	TTTCGTCTCTTATGGGTGAACAAAAGTTG	Zur Erstellung von pBRNM (3xc- <i>myc</i> -Fragment)
Esp-Myc-rev	TTTCGTCTCTAAGTTATTGGTCTCTCATATTTCAAGTCTCTTC	
Esp-lacZ-for	TTTCGTCTCTACTTATGACCATGATTACGCCAAG	Zur Erstellung von pBRNM ( <i>lacZ</i> -Fragment)
Esp-lacZ-rev	TTTCGTCTCTAGCTTTTCATTCACCAGAGACCTTACAATTC	Zur Erstellung von pBRNM ( <i>lacZ</i> -Fragment)
xopAΔ2-5-Bsa-for	TTTGGTCTCTTATGAATACGTCGCACCTC	Für die Erstellung von <i>xopA</i> -Derivaten ohne die Codons 2-5, 2-10 bzw. 2-21. Überhang jeweils TATG/GATC
xopAΔ2-10-Bsa-for	TTTGGTCTCTTATGGGCGTCGACTCTTC	
xopAΔ2-21-Bsa-for	TTTGGTCTCTTATGGACCAATTTCAAAAATTCG	
xopA-GATC-rev	TTTGGTCTCTGATCCTGCATCGATGCAG	
linker-156M-for	TTTGGTCTCTTATGAAAAAAGATCAGAGACCAAAA	Primer-„annealing“, zur Erstellung der Linker-Region (KK) an <i>avrBs1</i> ΔN58
linker-156M-rev	TTTGGTCTCTGATCTTTTTTTCATAAGAGACCAAAA	
HrpB2-25GATC-Bsa-rev	TTTGGTCTCTGATCTGCCACCGGCGACAG	Für die Erstellung der ersten 25 Codons von <i>hrpB2</i> ( <i>HrpB2</i> N1-40_for als „forward“-Primer)
AvrBs3N10-GCTTfor	TTTGGTCTCTTATGGATCCCATTTCGTCGCACACCAAGTGCTTAGAGACCAAAA	Primer-„annealing“ der N-terminalen 30 Codons von <i>avrBs3</i> , zur Klonierung an <i>avrBs1</i> <sub>59-79</sub>
AvrBs3N10-GCTTrev	TTTGGTCTCTAAGCACTTGGTGTGCGCGAACGAATGGATCCATAAGAGACCAAAA	
AvrBs1_59_for	TTTGGTCTCTGCTTTGCACACCTCATCG	Für die Erstellung des Fragments <i>avrBs1</i> <sub>59-79</sub> , zur Klonierung an <i>avrBs3</i> Δ2
AvrBs1_79_rev	TTTGGTCTCTGATCCGCTAAATTTCTGAACTAATAC	
TALDN64_for	TTTGGTCTCTTCAGCGGGCAGCTTCTCTG	Zur Erstellung des N-terminalen Moduls von dTALE-2 (Codons 65-288), Überhang TCAG/AATC
TALN_rev	TTTGGTCTCTGATTCAAGGGTGTCTCCAG	
HrpB2N1-40_for	TTTGGTCTCTTATGACGCTCATTCTCCTC	Für die Erstellung von <i>hrpB2</i> -Derivaten (Codons 1-40, 10-40 bzw. 11-40). Überhang jeweils TATG/TCAG
HrpB2N10-40_for	TTTGGTCTCTTATGATTGCCGGCACCAGTG	
HrpB2N11-40_for	TTTGGTCTCTTATGGCCGGCACCAGTGCTG	
HrpB2N40-CTGA_rev	TTTGGTCTCTCTGATTGCATCAGCGCTTG	
linker-TALDN64_rev	TTTGAAGACAACCTGATTTTTTCATTTTGTCTTCAAAA	Primer-„annealing“, zur Erstellung der Linker-Region (KK) an dTALE-2ΔN
linker-TALDN64_for	TTTGAAGACAAAATGAAAAAATCAGTTGTCTTCAAAA	
HrpB2N40-TCCG-Bsa-rev	TTTGGTCTCTCGGATTGCATCAGCGCTTGAAG	Für die Erstellung der ersten 40 Codons von <i>hrpB2</i> , mit <i>HrpB2</i> N1-40_for als „forward“-Primer. 3'-Überhang TCCG
TCCG-AvrBs1-Bsa-for	TTTGGTCTCTTCCGACATGAAAGTTAATTTTC	Für die Erstellung von <i>avrBs1</i> , mit <i>AvrBs1_Bsa_rev</i> als „reverse“-Primer. 5'-Überhang TCCG
Bsa_AvrBs1_for	TTTGGTCTCTTATGTCCGACATGAAAGTTAATTTTC	Für die Erstellung des Fragments <i>avrBs1</i> und Klonierung in pBRM
AvrBs1_Bsa_rev	TTTGGTCTCTCACCCGCTTCTCTGCATTTGTAAC	

AvrBs3dN152_for	<u>TTTGGTCTCAGATCTACGCACGCTCGGCTACAG</u>	Für die Erstellung des N-terminalen Moduls von AvrBs3 (Codons 153-288)
Hax-N-R-rev	<u>TTTGGTCTCAGTTCAGGGGGGCACCCGTCAG</u>	
Bsa_dotCfor	<u>TTTGGTCTCTCATCATGGCGGTATCTGATGC</u>	
Bsa_dotBrev	<u>TTTGGTCTCTACCCTCACCTCCCCGGCCAGCA</u> AAC	Für die Erstellung des Fragments <i>dotCB</i> und Klonierung in pLAND-P
Bsa_0160Promfor	<u>TTTGGTCTCTATTCTGATCGAAGATGCTGCTG</u>	Generierung eines 201 bp großen Fragments, welches vermutlich den XCV0160 Promotor darstellt
Bsa_0160Promrev	<u>TTTGGTCTCTGATGTGGACAGCGGCGCAG</u>	
Bsa_icmE_for	<u>TTTGGTCTCTCATCATGATGGCTCAGCAGGAAAGC</u>	Für die Erstellung des Fragments <i>icmE</i> und Klonierung in pLAND-P
Bsa_icmE_rev	<u>TTTGGTCTCTCACCTTTGCCGAATGCGGATG</u>	
virB4_pOGG2_Bsa_Flrev	<u>TTTGGTCTCTGTCAGTCGAACTTCTCTTTAAAAC</u> TC	Generiert ein 810 bp großes Fragment, welches dem flankierenden Bereich von <i>virB4</i> entspricht
virB4_pOGG2_Bsa_Flfor	<u>TTTGGTCTCTCGACCGCTTGGACATAGCTGTG</u>	
virB4_pOGG2_Bsa_Fllfor	<u>TTTGGTCTCTTGACCATGAAAAAGACCC</u>	Generiert ein 581 bp großes Fragment, welches dem flankierenden Bereich von <i>virB4</i> entspricht
virB4_pOGG2_Bsa_Fllrev	<u>TTTGGTCTCTATGGCTATACCGCGAGCGCAAG</u>	
detect_virB4_for	<u>GTTCCAGCGCTCCCACGGTC</u>	1333 bp großes Fragment innerhalb von <i>virB4</i> , diente der Überprüfung der Mutante $\Delta virB4$
detect_virB4_rev	<u>GTGCGCGTTGTGCAACACG</u>	
Bsa_virB4_for	<u>TTTGGTCTCTTATGTGCTGTGCGATGCCG</u>	Für die Erstellung des Fragments <i>virB4</i> und Klonierung in pBRM, pBRM(Stopp), pBRNM und pLAND
Bsa_virB4_rev	<u>TTTGGTCTCTCACCTGCTCCTTTCTGCTTGAGG</u>	
virB1_pOGG2_Bsa_Flfor	<u>TTTGGTCTCTTGACCGGCTTTTCTCGCATGC</u>	Generiert ein 756 bp großes Fragment, welches dem flankierenden Bereich von <i>virB1</i> entspricht
virB1_pOGG2_Bsa_Flrev	<u>TTTGGTCTCTATGGGCCATCGTGTGCGAACCTT</u>	
virB11_pOGG2_Bsa_Fllfor	<u>TTTGGTCTCTCGACCATGAAGTCGGCCATCATC</u>	Generiert ein 841 bp großes Fragment, welches dem flankierenden Bereich von <i>virB11</i> entspricht
virB11_pOGG2_Bsa_Fllrev	<u>TTTGGTCTCTGTCAGGCTCGGCCCTCACGGGATG</u>	
detect_virB1_for	<u>CCTGGCTGAAGCGGTTGC</u>	447 bp großes Fragment innerhalb von <i>virB1</i> , diente der Überprüfung der Mutante $\Delta virB1\Delta virB11$
detect_virB1_rev	<u>CATTGGCTCGACGTCGCC</u>	
detect_virB11_for	<u>GAATCTCGATGACGGCGTTC</u>	521 bp großes Fragment innerhalb von <i>virB11</i> , diente der Überprüfung der Mutante $\Delta virB1\Delta virB11$
detect_virB11_rev	<u>GAATCTCGCCATGATGAC</u>	
XCV0687-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTAAGCTGCG</u> TGACGAC	Für die Erstellung des Fragments XCV0687 <sub>C49</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV0687_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCCTACTTCACGCCCAACTG</u>	
XCV3492-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTCGCATGCA</u> GCGGGCAC	Für die Erstellung des Fragments XCV3492 <sub>C49</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV3492_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCAAGGCGCAGGCGGATAC</u>	
XCV4220-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTGACCACGC</u> GCAGCAG	Für die Erstellung des Fragments XCV4220 <sub>C49</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV4220_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCAGCGCTGCGCCAC</u>	
XCV3992-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTGCGCCGC</u> CATCCGG	Für die Erstellung des Fragments XCV3992 <sub>C49</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV3992_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCAGCCTGCCAGCTGC</u>	
XCV0160-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTATTGCGCA</u> ACTGCAG	Für die Erstellung des Fragments XCV0160 <sub>C50</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV0160_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCACGGCGCCACGCAG</u>	
XCV2208-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTACCGCGAC</u> GAAAAAAGCGG	Für die Erstellung des Fragments XCV2208 <sub>C50</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV2208_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCATGCCTGCGCTCC</u>	
XCV1697-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTATCGGAAA</u> AGAGTGCC	Für die Erstellung des Fragments XCV1697 <sub>C50</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV1697_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTCATGGCCTTGATCGG</u>	
XCV0792-150_for	<u>TTTGAAGACAAGGAGGCGGAGGAAGTCTGGACCG</u> TATCGCC	Für die Erstellung des Fragments XCV0792 <sub>C50</sub> und Klonierung in pAGM10911/10923
XCV0792_rev	<u>TTTGAAGACAAAAGCTTACTTCAAGGCCCTTG</u>	
qRT_CA_UCH_for	<u>GGTGTGCAGGTTGAGGAGTTGT</u>	Amplifikation von UCH cDNA für qRT-PCR-Analysen
qRT_CA_UCH_rev	<u>GCACAAATGGCTCCGGTCTTGC</u>	
Elo-F/Aso	<u>AGTCAACTACCACTGGTCAC</u>	Amplifikation von UCH cDNA für qRT-PCR-Analysen (Römer <i>et al.</i> , 2007)
Elo-R/Aso	<u>GTGCAGTAGTACTTAGTGGTC</u>	
qRT-Bs3-F	<u>GTAACCTCTTGTTAATGGAGAGTGAATTG</u>	Amplifikation von Bs3 cDNA für qRT-PCR-Analysen
qRT-Bs3-R	<u>TGATTCCTGTGCTACATTTGTTCTTTCC</u>	
RT-upa20-cons-F	<u>GAAGGGTCTTCTTCTATGACTTCTG</u>	Amplifikation von UPA20 cDNA für qRT-PCR-Analysen
RT-upa20-cons-R	<u>TGACCATGAGTGCATCTAAGTCC</u>	

Bsal, Bpil, Esp3l-Erkennungsstellen sind unterstrichen

Tabelle 5.4 Durch S4TE vorhergesagte T4S-Substrate in *Xcv*.

Rang	XCV-Protein	Legionella-Index (SI <sub>L</sub> /PI <sub>L</sub> )	„Coiled coil“-Struktur	RS-TY	Prenylierungsdomäne	C-terminale Basizität/Ladung	C-terminale/Globale Hydropathie	NLS/MLS	E-Block	eukaryotisch-ähnliche Domäne	prokaryotisch-ähnliche Domäne	Homologie zu einem bekannten T4E-Protein*
1	XCV0025	Neu	+	-	-	+/-	+/+	+/-	-	Peptidase_M23 Family	-	Lpg2490
2	XCV1697	Neu	-	+	-	+/+	-/+	-/+	-	Phage_integrase Family	-	Lpg2745
3	XCV2208	Neu	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	PHA_synth_III_E Family	-	AM470
4	XCV2645	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	-	DUF4105 Family	Lpg2157
5	XCV4206	1/0	+	-	-	+/-	-/+	-/-	-	Pkinase Domain	-	CBU_0175
6	XCV3077	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	SET Family	-	Lpg1718
7	XCV0160	Neu	-	-	+	+/+	+/-	-/-	-	Patatin Family	-	Lpg1426
8	XCV1332	0/-1	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	GAF_3 Domain	-	Lpg2490
9	XCV0792	Neu	-	+	-	+/+	+/+	+/-	-	ABC_tran Domain	-	-
10	XCV4405	0/-1	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Biotin_lipoyl_2 Domain	-	Lpg0257
11	XCV0739	0,4/-0,33	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	Rick_17kDa_Anti Family	-	Lpg1148
12	XCV0287	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	-	-	CBU_1769
13	XCV0797	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Acetyltransf_7 Domain	-	Lpg0103
14	XCV0172	Neu	+	-	-	+/+	+/+	+/-	-	POR Family	-	-
15	XCV2901	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Rhomboid Family	-	BAB1_1275
16	XCV4317	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	GATase Domain	-	Lpg2826
17	XCV0471	Neu	-	+	-	+/+	+/+	-/+	-	YopJ Family	-	-
18	XCV1501	0/-1	+	-	-	+/-	-/-	-/-	-	HlyD family	-	-
19	XCV0519	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	cNMP_binding Domain	-	BAB1_2005
20	XCV2141	1/0	-	-	-	+/-	+/+	-/-	-	Pkinase Domain	-	Lpg2556
21	XCV1570	0/-1	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Biotin_lipoyl_2 Domain	-	Lpg0257
22	XCV1126	Neu	-	+	-	+/+	+/+	-/+	-	Phage_integrase Family	-	-
23	XCV2657	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Peptidase_C26 Domain	-	Lpg2826
24	XCV3720	Neu	+	-	-	+/+	-/-	-/-	-	Methyltransf_31 Domain	-	Lpg2137
25	XCV4131	0,4/-0,33	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	ALAD Domain	-	CBU_1525
26	XCV3560	Neu	-	-	-	+/-	-/+	+/-	-	Lipase_3 Family	-	Lpg1642
27	XCV3771	0/-1	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	ATP-synt_B Family	-	Lpg1148
28	XCV1338	Neu	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	SRP54_N Domain	-	-

29	XCV0266	0/-1	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	cNMP_binding Domain	-	BAB1_2005
30	XCV3443	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	ACR_tran Family	-	Lpg1907
31	XCV4448	0,66/1	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Acetyltranf_1 family	-	-
32	XCV2885	0,5/0	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Rhomboid Family	-	BAB1_1275
33	XCV3253	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	-	DEAD Domain	-
34	XCV1033	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Pro_isomerase domain	-	Lpg1962
35	XCV2121	Neu	-	-	-	+/+	+/+	-/+	-	-	DUF877 Family	-
36	XCVc0041	Neu	+	-	-	+/+	-/+	+/-	-	CagE_TrBE_VirB Family	-	-
37	XCV2653	1/0	+	-	-	+/-	-/-	-/-	-	HlyD Family	-	Lpg0257
38	XCV3038	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Ank_2 Family	-	Lpg0695
39	XCV0608	1/0	-	-	-	-/-	+/+	-/-	-	Lipase_3 Family	-	Lpg1642
40	XCV0007	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	TPR_8 Repeat	-	-
41	XCV3444	Neu	+	+	-	+/+	+/-	-/-	-	HlyD_2 Family	-	-
42	XCV2881	Neu	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	SLT Family	-	-
43	XCV1540	1/0	+	-	-	+/-	-/-	-/-	-	HlyD Family	-	Lpg0257
44	XCV3431	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Glyco_hydro_97 Domain	-	-
45	XCV4170	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Ank_2	-	Lpg0695
46	XCV0839	Neu	+	-	-	+/+	-/+	-/+	-	SecA_DEAD Domain	-	-
47	XCV3688	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Acetyltransf_1 Family	-	CBU_0801
48	XCV4399	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	AAA_29 Domain	-	-
49	XCV0687	Neu	-	+	-	+/+	+/+	-/-	-	Peptidase_S9_N domain	-	-
50	XCV0257	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Lactamase_B_2 Domain	-	BAB1_2005
51	XCV0063	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Pkinase domain	-	Lpg2556
52	XCV4251	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/+	-	PLDc_2 Domain	-	-
53	XCV2467	0,66/1	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	-	-	Lpg0621
54	XCV3619	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	DJ-1_Pfpl_N Domain	-	CbuK_1237
55	XCV0438	Neu	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
56	XCV0021	0,66/1	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-	Rhomboid Family	-	BAB1_1275
57	XCV3849	1/0	+	-	-	-/-	-/+	-/-	-	CheB_methylest Domain	-	-
58	XCV2684	0/-1	+	-	-	+/+	+/+	+/-	-	-	-	-
59	XCV4121	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Ank_2 family	-	Lpg0403
60	XCV0503	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Acetyltransf_1 Family	-	CBU_0801



61	XCV1632	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Abhydrolase_5 Domain	-	CBU_1769
62	XCV0389	Neu	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-	Abhydrolase_3 Domain	-	Lpg0275
63	XCV2138	Neu	-	-	-	+/+	-/-	+/+	-	-	ImcF-related_N Family	-
64	XCV3087	0,66/1	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-	Sel1 repeat	-	Lpg2222
65	XCV0240	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Fic_N Family	-	CBU_2078
66	XCV2232	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/+	-	ACR_tran Family	-	-
67	XCVd0072	Neu	-	-	-	+/+	+/+	+/-	-	HDOD Domain	-	-
68	XCV1301	Neu	+	+	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
69	XCV0524	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Ribosomal_S9 Family	-	-
70	XCV0696	Neu	+	-	-	-/-	-/-	+/-	-	HlyD Family	-	Lpg0257
71	XCV2214	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Tex_N Domain	-	-
72	XCV1851	Neu	+	+	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
73	XCV1716	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Peptidase_S8 Domain	-	CBU_2052
74	XCV3912	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Sigma70_r1_1 Family	-	-
75	XCV1404	0,66/1	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-	Sel1 Repeat	-	Lpg2222
76	XCV1306	Neu	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Phage_integrase Family	-	-
77	XCV4324	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Abhydrolase_6 Domain	-	Lpg1642
78	XCV2837	Neu	+	-	-	+/-	+/+	+/-	-	IF2_assoc Family	-	-
79	XCV2938	Neu	-	-	-	+/+	+/+	-/+	-	tRNA-synt_1 Family	-	-
80	XCV3203	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Methytran_RNA family	-	Lpg2936
81	XCV3284	0,5/0	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Acetyltransf_1 Family	-	Lpg0103
82	XCV1054	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	-	Phosphoesterase Family	-
83	XCV0065	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
84	XCV1287	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Ribosomal_S20p Family	-	-
85	XCV2296	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
86	XCV3118	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	Sigma54_AID Family	-	-
87	XCVd0070	Neu	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	KfrA_N Family	-	-
88	XCV1805	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	PA14 Domain	-	-
89	XCV0203	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	YiiD_Cterm Domain	-	-
90	XCV0513	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	HsdM_N Domain	-	-
91	XCV3324	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	Clp_N Family	-	-
92	XCV0223	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-

93	XCV2689	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
94	XCV0772	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
95	XCV4228	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	Abi Family	-	-
96	XCV2072	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	MMR_HSR1 Family	-	-
97	XCV4379	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Acid_phosphat_B Family	-	-
98	XCV3397	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
99	XCV1844	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
100	XCV3640	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	TPR_11 Repeat	-	-
101	XCV2423	Neu	-	+	-	+/-	-/+	+/-	-	S1 Domain	-	-
102	XCV1699	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
103	XCV2773	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
104	XCV3408	Neu	+	+	-	+/-	+/-	-/-	-	Histone_HNS Family	-	-
105	XCV3430	Neu	-	+	-	-/-	+/+	-/+	-	Laminin_G_3 Domain	-	-
106	XCV0921	0,74/1,78	-	-	-	+/-	+/-	-/-	-	-	-	Lpg1083
107	XCV3229	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	Hpt Family	-	-
108	XCV3428	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	TonB_dep_Rec Family	-	-
109	XCV0975	1/0	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	PCRF Domain	-	-
110	XCV0760	Neu	-	-	-	-/-	+/-	-/-	-	N_methyl Motif	-	Lpg2327
111	XCV3252	Neu	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
112	XCV3563	Neu	-	-	-	+/-	-/+	-/-	-	-	-	Lpg1642
113	XCVd0025	Neu	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
114	XCV2186	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HAMP Family	-	-
115	XCV3351	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Response_reg Domain	-	-
116	XCV2263	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
117	XCV2345	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	DNA_methylase Domain	-	-
118	XCV3261	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	4HB_MCP_1 Family	-	-
119	XCV0411	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	NoIX Family	-	-
120	XCV2856	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	adh_short Domain	-	-
121	XCVd0022	Neu	-	-	-	-/-	+/+	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
122	XCV3588	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Reg_prop Repeat	-	-
123	XCV2075	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
124	XCV1092	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Phage_integrase Family	-	-

125	XCV0580	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	-	DUF165 Family	-
126	XCV1042	Neu	-	+	-	+/-	+/+	-/-	-	OMP_b-brl Domain	-	-
127	XCV2866	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
128	XCV1409	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	MS_channel Family	-	-
129	XCV1800	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	TonB_dep_Rec Family	-	-
130	XCV0050	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
131	XCV3384	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
132	XCV3396	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	AAA_19 Domain	-	-
133	XCV2625	Neu	+	+	-	+/-	+/-	-/-	-	4HB_MCP_1 Family	-	-
134	XCV1698	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
135	XCV2817	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
136	XCVd0131	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	Methyltransf_26 Domain	-	-
137	XCV4292	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	PAS_7 Domain	-	-
138	XCV2921	Neu	-	-	-	-/-	+/-	-/-	-	-	DUF615 Family	Lpg0021
139	XCV1138	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
140	XCV3411	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
141	XCV3101	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-	IstB_IS21 Family	-	-
142	XCV2295	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
143	XCV0324	0,86/5	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	-	-	Lpg1965
144	XCV0354	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
145	XCV3362	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
146	XCV2165	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Methyltransf_26 Domain	-	-
147	XCV1373	Neu	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	GTP_EFTU Domain	-	-
148	XCV2617	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
149	XCVd0172	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Rep_3 Family	-	-
150	XCV1553	Neu	-	-	-	+/+	-/+	+/-	-	Phage_integrase Family	-	-
151	XCV3677	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	RDD Family	-	-
152	XCV2425	0/-1	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	-	DUF3300 Family	-
153	XCV3147	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
154	XCV1843	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
155	XCV0774	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	GMC_oxred_N Domain	-	-
156	XCV2491	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	CoA_binding_3 Domain	-	-

157	XCV0300	Neu	-	-	-	+/+	-/+	-/+	-	DEAD Domain	-	-
158	XCV0710	0,75/2	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	SBP_bac_3 Domain	-	ECH_0684
159	XCVd0090	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
160	XCVc0011	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
161	XCV0509	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	HSDR_N Family	-	-
162	XCV4308	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	TonB_dep_Rec Family	-	-
163	XCV1133	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	-	DUF58 Family	-
164	XCV2262	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
165	XCV0730	Neu	+	-	-	+/-	-/+	+/-	-	-	PDZ Domain	-
166	XCV1283	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	ABC_tran Domain	-	-
167	XCV2674	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	GDH_N Family	-	-
168	XCV3601	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	PAS_7 Domain	-	-
169	XCV3630	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Amidohydro_1 Domain	-	-
170	XCV3039	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	PA Family	DUF2974 Family	-
171	XCV4153	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	ABC2_membrane Family	-	-
172	XCV4401	0/-1	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	-	DUF3375 Family	-
173	XCV3497	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	STN Family	-	-
174	XCV3206	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
175	XCV0660	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Trehalase Family	-	-
176	XCV3338	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	MCPsignal Family	-	-
177	XCV1118	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
178	XCV0144	0,75/2	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	COesterase Domain	-	Lpg2744
179	XCV0954	Neu	-	+	-	+/-	+/+	-/-	-	Sigma70_r2 Domain	-	-
180	XCV1804	Neu	-	-	-	+/-	+/+	-/+	-	Glyco_hydro_42 Family	-	-
181	XCV2157	Neu	-	-	-	+/+	+/+	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
182	XCV1862	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
183	XCV0706	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
184	XCV1390	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	FAD_binding_3 Family	-	-
185	XCV0229	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
186	XCV0715	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Sigma54_activat Domain	-	-
187	XCV2726	Neu	-	-	-	+/+	-/+	-/+	-	DPPIV_N Family	-	-
188	XCV1213	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	ABC_tran Domain	-	-

189	XCV4209	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	-	ImcF-related_N Family	-
190	XCV1521	Neu	-	-	-	-/-	+/-	-/-	-	-	DUF456 Family	Lpg1148
191	XCV0993	Neu	-	-	-	+/+	-/-	+/+	-	Ribosomal_S12 Family	-	-
192	XCV2336	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HMA Domain	-	-
193	XCV1297	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
194	XCV1119	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
195	XCV0139	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	DUF3416 Family	-	-
196	XCV1841	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
197	XCV4383	Neu	-	-	-	+/-	+/+	+/-	-	UvrD-helicase Domain	-	-
198	XCV0705	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
199	XCV3398	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
200	XCV0620	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
201	XCV2158	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
202	XCV4242	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	-	DUF877 Family	-
203	XCV0991	Neu	+	-	-	-/-	+/+	+/-	-	PmbA_TldD Family	-	-
204	XCV0126	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
205	XCVd0049	Neu	-	+	-	+/-	+/-	+/-	-	DnaB Domain	-	-
206	XCV1728	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Wzz Family	-	-
207	XCV0327	Neu	+	-	-	+/+	-/-	-/+	-	MerR_1 Family	-	-
208	XCV2690	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
209	XCV3409	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
210	XCV0130	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	AAA_13 Domain	-	-
211	XCV3617	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
212	XCV1664	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	SMC_N Family	-	-
213	XCV3018	Neu	-	-	-	+/-	+/+	+/-	-	CarD_CdnL_TRCF Family	-	-
214	XCV2717	Neu	-	+	-	+/-	-/+	+/-	-	RHS_repeat Repeat	-	-
215	XCV3418	Neu	-	-	-	+/+	-/+	+/-	-	Methyltransf_4 Family	-	-
216	XCV0452	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	CBM_48 Domain	-	-
217	XCV3301	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
218	XCV2367	Neu	-	-	-	+/-	+/+	+/-	-	TraC_F_IV Family	-	-
219	XCV3194	0/-1	+	-	-	+/+	+/-	+/-	-	-	-	-
220	XCV2478	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-

221	XCV3361	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	SymE_toxin Domain	-	-
222	XCV1921	0/-1	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	-	AMP-binding Family	-
223	XCV2432	0/-1	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	-	-	-
224	XCV0751	Neu	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
225	XCV3383	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
226	XCVd0097	Neu	-	-	-	-/-	+/+	+/-	+	DUF4158 Domain	-	-
227	XCV1801	Neu	-	-	-	+/-	+/+	-/+	-	Plug Domain	-	-
228	XCV1113	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
229	XCV2722	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
230	XCV1952	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	Cache_2 Domain	-	-
231	XCV2952	0/-1	+	-	-	+/+	-/-	+/-	-	-	DUF4349 Family	-
232	XCV1814	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	PolyA_pol Domain	-	-
233	XCV4185	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Lip_A_acyltrans Family	-	-
234	XCV2188	Neu	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	Y_Y_Y Domain	-	-
235	XCV3492	0,75/2	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	BatD family	-	AM470
236	XCV2813	Neu	-	-	+	+/+	+/-	-/-	-	GspH Domain	-	-
237	XCV3273	Neu	+	-	-	-/-	+/+	+/-	-	TonB_2 Family	-	-
238	XCV2477	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
239	XCV1550	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
240	XCV0626	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
241	XCV1097	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
242	XCV1847	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
243	XCV0249	0,75/2	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	Cupin_2 domain	-	Lpg2434
244	XCV1610	Neu	+	-	-	+/-	+/-	-/-	-	Reg_prop Repeat	-	-
245	XCV2612	Neu	-	-	-	+/-	-/+	+/-	-	LigD_N Family	-	-
246	XCV1236	0/-1	+	-	-	+/+	+/+	-/-	-	-	-	-
247	XCV1985	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	Reg_prop Repeat	-	-
248	XCV1914	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	LytTR Domain	-	-
249	XCV3944	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	GST_C_2 Domain	-	-
250	XCVb0011	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	HTH_21 Domain	-	-
251	XCV4374	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	CarboxypepD_reg Domain	-	-

252	XCV2155	Neu	+	-	-	+/-	+/-	-/+	-	Y_Y_Y Domain	-	-
253	XCV0029	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Cellulase Domain	-	-
254	XCV1833	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	EamA Family	-	-
255	XCV1450	Neu	-	-	-	+/-	+/+	-/+	-	-	DUF885 Family	-
256	XCV0355	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
257	XCVd0107	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
258	XCV1315	Neu	+	+	-	+/+	-/-	-/-	-	HTH_18 Domain	-	-
259	XCV1941	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HAMP Family	-	-
260	XCV2812	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	ResIII Family	-	-
261	XCV1311	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	TPR_3 Repeat	-	-
262	XCV3386	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
263	XCV3359	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
264	XCV4142	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	TonB Family	-	-
265	XCV0544	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	FUSC-like Domain	-	-
266	XCV3954	0/-1	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	-	DEAD Domain	-
267	XCV2088	Neu	-	-	-	+/-	+/+	-/+	-	FMO-like Family	-	-
268	XCV1968	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
269	XCVb0012	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
270	XCV0746	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	T2SL Family	-	-
271	XCV0037	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	GATase_2 Domain	-	-
272	XCV3761	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	HATPase_c Domain	-	-
273	XCV2384	Neu	-	-	-	+/-	+/+	+/-	-	Cytochrom_C Domain	-	-
274	XCV2805	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
275	XCV2351	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	HTH_21 Domain	-	-
276	XCV1563	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	GrpE Family	-	-
277	XCV2152	Neu	+	-	-	+/+	-/+	-/-	-	Y_Y_Y Domain	-	-
278	XCV2437	Neu	+	-	-	+/-	+/+	-/-	-	KfrA_N Family	-	-
279	XCV4234	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
280	XCV3410	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
281	XCV3992	0,75/2	-	-	-	+/-	-/-	-/-	-	YqeY domain	-	Lpg2359
282	XCV1690	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	CM_2 Domain	-	-
283	XCV2867	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-

284	XCV2963	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	OEP Family	-	-
285	XCV2323	Neu	+	+	-	+/-	+/-	-/-	-	HTH_1 Domain	-	-
286	XCV0574	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	DAHPSynth_1 Domain	-	-
287	XCV2991	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	Plug Domain	-	-
288	XCV4356	Neu	-	-	-	-/-	+/+	+/+	-	Glyco_hydro_2_N Domain	-	-
289	XCV4342	Neu	-	-	-	+/+	+/+	-/+	-	-	-	-
290	XCV2671	Neu	-	-	-	+/-	+/+	+/-	-	CHASE Domain	-	-
291	XCV1356	Neu	+	-	-	+/+	+/-	-/-	-	HTH_Tnp_1 Family	-	-
292	XCV4220	0,75/2	-	-	-	-/-	+/-	-/-	-	Pkinase domain	-	Lpg1483
293	XCV3747	Neu	-	-	-	+/+	+/-	-/+	-	Cu-oxidase_3 Domain	-	-
294	XCV1764	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	FtsJ Family	-	-
295	XCV1607	Neu	-	-	-	+/+	-/+	+/-	-	OB_RNB Domain	-	-
296	XCV1746	Neu	-	-	-	-/-	-/-	-/+	-	-	DUF218 Family	Lpg2628
297	XCV4042	0/-1	-	+	-	+/+	+/-	-/-	-	Pkinase Domain	-	-
298	XCV0252	Neu	-	-	-	+/+	+/-	+/-	-	RF-1 Family	-	-
299	XCV2610	0/-1	-	-	-	+/+	+/+	-/-	-	FGE-sulfatase Domain	-	-

Die Tabelle enthält Informationen über die 13 verschiedenen Sequenzeigenschaften in den 299 von S4TE vorhergesagten T4S-Substraten von *Xcv*. Eine genaue Erklärung zu den einzelnen Sequenzeigenschaften ist im Methodenteil Kapitel 2.2.6 beschrieben. +: die entsprechende Eigenschaft ist in dem jeweiligen XCV-Substrat vorzufinden; -: die entsprechende Eigenschaft ist nicht in dem jeweiligen XCV-Substrat vorzufinden; SL: „sensitivity index for *Legionella*“; PL: „positivity index for *Legionella*“; Neu: neue Kombination an Sequenzeigenschaften, die bisher in keinem untersuchten *Legionella*-T4-Effektorprotein vorzufinden ist. \*: Bereits publizierte T4-Effektorproteine (Chen *et al.*, 2010, Gomez-Valero *et al.*, 2011). Die Abkürzungen der homologen Proteine entsprechen Proteinen in folgenden Organismen: Lpg: *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia 1; AM: *Anaplasma marginale* str. St. Maries; CBU: *Coxiella burnetii* RSA 493; CbuK: *Coxiella burnetii* CbuK\_Q154; BAB: *Brucella melitensis* biovar Abortus 2308; ECH: *Ehrlichia chaffeensis* str. Arkansas. Grau hinterlegte Spalten entsprechen der Auswahl an Substraten, die in dieser Arbeit experimentell untersucht wurden.



## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Felix Scheibner
Anschrift	Faradaystraße 16, 04159, Leipzig
Geburtsdatum	14.01.1988
Geburtsort	Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Bildungsgang

08/1998 – 07/2006	Sophiengymnasium Colditz Abschluss: Abitur
07/2006 – 09/2007	9-monatiger Grundwehrdienst und freiwilliger zusätzlicher Wehrdienst
10/2007 – 09/2010	Bachelorstudium an der MLU Halle-Wittenberg. Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie. Thema: „Funktionelle Analyse von HIP3 in Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i> unter dem Einfluss von Trockenstress“ Abschluss: Bachelor of Science (Biologie)
07/2009 – 08/2009	Mongolei-Expedition (Förderung durch DAAD)
10/2010 – 09/2012	Masterstudium an der MLU Halle-Wittenberg. Masterarbeit am Institut für Pflanzengenetik. Thema: „Funktionelle Charakterisierung der putativen Translokonproteine HrpF und XopA von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> “ Abschluss: Master of Science (Biologie)
seit 10/2012	Promotion an der MLU Halle-Wittenberg. Institut für Pflanzengenetik. Thema: „Analyse von Exportsignalen von Typ-III- und Typ-IV-Sekretionssubstraten aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> “

Halle (Saale), den 04.07.2016

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denjenigen danken, die in den letzten Jahren stets an mich geglaubt und damit einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei PD Dr. D. Büttner bedanken. Ihre geistigen Anregungen und stetige Diskussionsbereitschaft sowie ihre Geduld und das Vertrauen in meine Fähigkeiten waren nicht zuletzt der Grund dafür warum diese Arbeit entstanden ist. Weiterhin danke ich ihr für die Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Problemen und das ständige Interesse am voranschreiten meiner Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. U. Bonas für hilfreiche Anmerkungen und Hinweise sowie die Möglichkeit in Ihrer Abteilung meine Arbeit anzufertigen.

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur“ (Arno Penzias). Für den stetigen Gedankenaustausch, das Philosophieren über Probleme und Problemlösungen sowie stets gute Ratschläge auch außerhalb der Wissenschaft, möchte ich mich bei Jens, Norman, Ulrike, Oliver, Sabine D., Micha, Cornelius und Katha bedanken.

Ein großer Dank geht natürlich auch an meine Freunde außerhalb des Labors, die stets für eine lustige und schöne Zeit vor, während und nach dem Studium gesorgt haben.

Meiner Frau Claudia möchte ich danken, weil sie mich auf dem steinigen Weg meiner Promotion mit all den Höhen und Tiefen begleitet hat und oft sehr geduldig sein musste. Auf ewig dankbar bin ich vor allem meinen Eltern sowie meinem Bruder und seiner Frau, die mir während meiner gesamten akademischen Laufbahn immer den Rücken frei gehalten haben. Eure Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen bedeutet mir mehr als alles andere.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den 04.07.2016

Felix Scheibner