

**Molekulare Charakterisierung der Typ III-sekretionsassoziierten Proteine
HrpB2 und HpaC
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 Steve Schulz

geboren am 30.11.1981 in Magdeburg

Gutachter /in:

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

Tag der Verteidigung: 19.03.2013

Halle (Saale),

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:

Schulz, S. and D. Büttner (2011). "Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*." Infect. Immun.: IAI.00180-11.

Hartmann, N., **S. Schulz**, C. Lorenz, S. Fraas, G. Hause and D. Büttner (2012). "Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation." Microbiology.

Zusammenfassung

Für die Pathogenität des Gram-negativen Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist das Typ III-Sekretionssystem (T3S-System) essentiell, welches die Proteinsekretion und Translokation von Effektorproteinen ermöglicht. Voraussetzung für ein funktionales T3S-System in *Xcv* ist der Pathogenitätsfaktor HrpB2. HrpB2 wird selbst als „frühes“ T3S-Substrat sekretiert. Die Substratspezifität des T3S-Systems wird u.a. durch das zytoplasmatische Protein HpaC kontrolliert, welches mit der C-terminalen Domäne des inneren Membranproteins HrcU interagiert. In dieser Arbeit wurden HrpB2 und HpaC funktionell charakterisiert. Durch eine gerichtete Mutagenese der N-terminalen 20 Aminosäuren von HrpB2 konnten unmittelbar am T3S-Signal beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden. Sekretions- und Komplementationsanalysen N-terminaler HrpB2-Deletionsderivate deuteten darauf hin, dass eine Sekretion von HrpB2 für die Funktion des T3S-Systems wichtig ist. In der C-terminalen Region von HrpB2 wurde das konservierte VxTLxK-Aminosäuremotiv (123-128) identifiziert, welches in vorhergesagten „inner rod“-Proteinen tierpathogener Bakterien ebenfalls zu finden ist. Das VxTLxK-Motiv ist essentiell für die Proteinfunktion von HrpB2. Elektronenmikroskopie und Fraktionierungsstudien zeigten, dass HrpB2 vermutlich keine extrazelluläre Komponente des Hrp-Pilus ist, sondern im bakteriellen Periplasma und der äußeren Membran lokalisiert. HrpB2 unterstützt vermutlich als periplasmatische Komponente des T3S-Systems den Aufbau des T3S-Pilus. Komplementationsanalysen mit HpaC-Deletionsderivaten zeigten, dass die N- und C-terminale Region von HpaC für einen Wechsel der Substratspezifität erforderlich ist, wohingegen die Aminosäuren 42 bis 101 für die Sekretion später Substrate nicht benötigt werden. Jedoch führten Deletionen innerhalb der zentralen Region von HpaC zu einer fehlerhaften Kontrolle der Sekretion von HrpB2. Dies lässt den Schluss zu, dass die HpaC-abhängige Kontrolle der Sekretion von frühen und späten T3S-Substraten unabhängig stattfinden kann. Interaktionsstudien mit HpaC-Deletionsderivaten zeigten, dass die Aminosäuren 112 bis 212 aus HpaC die Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne von HrcU und HpaC vermittelt und eine potentielle T3S4 („type III secretion substrate specificity switch“)-Domäne darstellt. Zudem konnte an der Aminosäureposition 175 ein konserviertes Phenylalanin identifiziert werden, welches sowohl für die Proteinfunktion von HpaC als auch für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU essentiell ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für einen Wechsel von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten die Interaktion zwischen HpaC und der C-terminalen Domäne von HrcU eine Voraussetzung darstellt aber allein nicht ausreicht.

Summary

The gram-negative plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) possesses a type III secretion system (T3S-System), which is essential for pathogenicity. The T3S-System mediates protein secretion into the extracellular medium as well as translocation of effector proteins directly into the plant host cell. Essential for a functional T3S-System is the pathogenicity factor HrpB2, which is secreted as an early substrate of the T3S-System. The substrate specificity of the T3S-System depends on the cytoplasmic switch protein HpaC, which interacts with the C-terminal domain of the conserved inner membrane protein HrcU. In this study, the pathogenicity factor HrpB2 and the switch protein HpaC from *Xcv* were functionally characterized. Site directed mutagenesis of the N-terminal 20 amino acids led to the identification of essential amino acids, which are presumably part of the T3S-signal and therefore crucial for the type III-dependent secretion of HrpB2 itself. Secretion and complementation studies of N-terminal deletion derivatives indicated that HrpB2 secretion is necessary for the function of the T3S-System. It was possible to identify the conserved VxTLxK-motif in the C-terminal region (amino acid 123-128) of HrpB2, which can also be found in predicted "inner rod" proteins of animal pathogenic bacteria. The VxTLxK motif is essential for the protein function of HrpB2 and therefore crucial for the type III dependent secretion of *Xcv*. Electron-microscopy and fractionation studies showed that HrpB2 mainly localizes in the bacterial periplasm and the outer membrane. This suggests that HrpB2 is not an extracellular component of the T3S-pilus but probably promotes the assembly of the pilus in the periplasm. Complementation analyses with HpaC deletion derivatives revealed that the N- and C-terminal region of HpaC is required for the switch in the substrate specificity, whereas the amino acids 42 to 101 are dispensable for the type III-dependent secretion of late substrates. However, deletions within the central region of HpaC corrupted the control of HrpB2 secretion. This leads to the conclusion that the HpaC-dependent control of the secretion of early and late T3S-substrates can take place independently. Protein-protein interaction studies showed also that the amino acids 112 to 212 of HpaC mediates the interaction between the C-terminal domain of HrcU and HpaC and also represents a potential T3S4 (type III secretion substrate specificity switch)-domain. Additionally, a conserved phenylalanine at amino acid position 175 could be identified, which is essential for both the protein function of HpaC and for the interaction with the C-terminal domain of HrcU. This suggests that the interaction between HpaC and the C-terminal domain of HrcU is essential but not sufficient for the T3S-substrate specificity switch from early to late substrates.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzenpathogene Bakterien.....	1
1.2 Infektionsstrategien Gram-negativer Bakterien.	2
1.3 Das T3S-System.	4
1.4 Das T3S-Signal – Exportsignale des T3S-Systems.....	7
1.5 Substrate des T3S-Systems.	9
1.5.1 Nicht-Effektorproteine.....	9
1.5.2 Effektorproteine.....	10
1.6 Modell des Wechsels der Substratspezifität.....	11
1.6.1 T3S4-Proteine und die Beziehung zu Proteinen der FlhB/YscU-Familie.	11
1.7 Das Modellsystem <i>Xanthomonas</i> spp.....	15
1.7.1 Das T3S-System von <i>Xcv</i>	16
1.7.2 Hrc-Proteine – konservierte Kernkomponenten des T3S-Systems.....	18
1.7.3 Hrp-Proteine - Nicht-Effektorproteine und Komponenten des T3S-System.	20
1.7.4 Hpa-Proteine – regulatorische Kontrollproteine des T3S-System.	22
1.8 Zielstellung dieser Arbeit.	26
1.8.1 Charakterisierung funktionaler Regionen von HprB2.....	26
1.8.2 Charakterisierung des T3S4-Proteins HpaC.	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Verwendete Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen.....	27
2.1.1 Chemische Transformation von <i>E. coli</i> und Herstellung kompetenter Zellen.	29
2.1.2 Triparentale Konjugation von <i>Xanthomonas</i>	29
2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzeninokulation	30
2.3 Erstellung von Expressionskonstrukten	30
2.3.1 „Blunt-End“-Subklonierung von PCR-Fragmenten.....	32
2.3.2 „Golden Gate“-Klonierung von PCR-Fragmenten.	32
2.3.3 Generierung von <i>hrpB2</i> -Expressionskonstrukten.	33

2.3.4	Generierung von <i>prgJ</i> und <i>yscI</i> -Expressionskonstrukten.....	34
2.3.5	Generierung von <i>hpaC</i> -Expressionskonstrukten.	34
2.4	Sekretionsstudien und Proteinanalyse.	35
2.5	GST-„pull down“-Analysen.....	36
2.6	Subfraktionierungsstudien.....	37
2.7	EM (Elektronenmikroskop)-Analysen und Immunogoldmarkierungen.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	HrpB2 - ein essentieller Pathogenitätsfaktor aus <i>Xcv</i>	39
3.1.1	Funktionelle Charakterisierung der N-terminalen Proteinregion und Identifizierung wichtiger Aminosäurereste in HrpB2.....	39
3.1.2	HrpB2-Derivate mit einer C-terminalen Epitopmarkierung haben einen dominant-negativen Einfluss.	46
3.1.3	Analyse des T3S-Signals von HrpB2.....	47
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung der C-terminalen Proteinregion und konservierter Aminosäurereste von HrpB2.....	49
3.1.5	Einfluss von HrpB2 auf die stabile Assemblierung der T3S-Pili.....	53
3.1.6	HrpB2 ist vermutlich keine Komponente des extrazellulären T3S-Pilus.....	55
3.1.7	HrpB2 ist vermutlich im Periplasma von <i>Xcv</i> lokalisiert.....	57
3.1.8	<i>PrgJ</i> oder <i>YscI</i> übernehmen nicht die funktionelle Rolle von HrpB2.	59
3.1.9	HrpB2 interagiert mit <i>HpaC</i> und <i>HrcU</i> ₂₆₅₋₃₅₇	62
3.2	<i>HpaC</i> - ein Kontrollprotein des T3S-Systems mit potentieller T3S4-Domäne.....	64
3.2.1	Identifizierung funktioneller Proteinregionen.	65
3.2.2	Die Bindestelle von <i>HrcU</i> ₂₅₅₋₃₅₇ ist in der C-terminalen Region von <i>HpaC</i> lokalisiert.	70
3.2.3	Zusammenfassung: Identifizierung funktioneller Proteinregionen	72
3.2.4	Charakterisierung der T3S4-Domäne von <i>HpaC</i>	73
3.2.5	Einfluss von Punktmutationen in der T3S4-Domäne von <i>HpaC</i> auf die Interaktion mit <i>HrcU</i> ₂₅₅₋₃₅₇ und T3S von <i>Xcv</i>	75
3.2.6	Selbstinteraktion von <i>HpaC</i> wird durch die C-terminale Region unterstützt.	78
3.2.7	Zusammenfassung: Charakterisierung der T3S4-Domäne aus <i>HpaC</i>	80
4.	Diskussion	81
4.1	Identifizierung funktionaler Regionen aus HrpB2.....	81
4.1.1	Analyse und Charakterisierung des T3S-Signals.....	81
4.1.2	Identifizierung des VxTLxK-Motives in HrpB2.....	85
4.1.3	HrpB2 ist eine periplasmatische und ÄM-assoziierte Komponente des T3S-Systems.....	87
4.1.4	Ist HrpB2 ein „inner rod“-Protein?.....	88

4.1.5	Die C-terminale Region aus HrpB2 ist wichtig für eine Interaktion mit HpaC oder HrcU ₂₆₅₋₃₅₇	90
4.2	Charakterisierung des T3S4-Proteins HpaC	92
4.2.1	Die Kontrollmechanismen für eine Sekretion von HrpF und HrpB2 sind teilweise voneinander unabhängig.	92
4.2.2	Die Rolle der Interaktion zwischen HpaC, HrpB2 und der C-terminalen Domäne von HrcU.	93
4.2.3	Die Bedeutung der C-terminalen Region und potentiellen T3S4-Domäne von HpaC.	94
4.2.4	HpaC kontrolliert vermutlich nicht die Länge des Hrp-Pilus in <i>Xcv</i>	97
4.2.5	Modell des Wechsels der Substratspezifität des T3S-Systems aus <i>Xcv</i>	99
5.	Literaturverzeichnis	100
6.	Anhang.....	112
6.1	Verwendete Oligonukleotide	112
	Danksagung.....	115
	Lebenslauf.....	116
	Publikationen.....	117
	Erklärung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

ÄM	äußere Membran
As	Aminosäure
<i>avr</i> -Gen	Avirulenzgen
Bp	Basenpaare
c-Myc	dreifaches Myc-epitop
cfu	"colony forming units", Kolonie bildende Einheiten
cv.	Kultivar
DNA	"deoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5`-triphosphat
ECW	"early californian wonder", Kultivar <i>C. annuum</i>
<i>hpa</i>	" <i>hrp</i> -associated", <i>hrp</i> -assoziiert
HR	"hypersensitive response", hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i>	" <i>hrp</i> -conserved", <i>hrp</i> -konserviert
<i>hrp</i>	"hypersensitive response and pathogenicity"
IM	innere Membran
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
n.a.	nicht analysiert
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
PP	Periplasma
pv.	Pathovar
<i>R</i> -Gen	Resistenzgen
rpm	"revolutions per minute", Umdrehungen pro Minute
SDS	„Sodiumdodecylsulfat“
spp.	<i>species</i> , Arten
TE	Totalzellextrakt
T3S4	"Typ III-Secretion-Substrate-Specificity-Switch“
T3S-System	Typ III-Sekretionssystem
ÜS	Kulturüberstand
WT	Wildtyp
WL	wässrige Läsionen
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Xop	<i>Xanthomonas</i> "outer protein"
Yop	<i>Yersinia</i> "outer protein"

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1.1:</u> Vergleich vom Translokations-assoziierten und flagellären T3S-System.	6
<u>Abbildung 1.2:</u> Modell des Wechsels der Substratspezifität.....	14
<u>Abbildung 1.3:</u> Das T3S-System von <i>Xcv</i> ist für eine Interaktion mit der Wirtspflanze essentiell.	16
<u>Abbildung 1.4:</u> Das T3S-System und der Wechsel von "frühen" zu "späten" T3S-Substraten in <i>Xcv</i>	25
<u>Abbildung 3.1:</u> Komplementationsanalyse mit N-terminal verkürzten HrpB2- Deletionsderivaten.	42
<u>Abbildung 3.2:</u> Ektopische Expression der <i>hrpB2</i> -Derivate im Wildtyp-Stamm 85-10.....	43
<u>Abbildung 3.3:</u> Komplementationsstudie und Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion N-terminal verkürzter HrpB2-Derivate.	45
<u>Abbildung 3.4:</u> Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF in <i>Xcv</i> nach Expression von <i>hrpB2-c-myc</i> und <i>hrpB2-flag</i>	47
<u>Abbildung 3.5:</u> Analyse des T3S-Signals von HrpB2.	48
<u>Abbildung 3.6:</u> Vergleich C-terminaler Aminosäurereste von HrpB2 mit HrpJ, MxI, YscI und PrgJ	49
<u>Abbildung 3.7:</u> Komplementationsanalyse mit C-terminal verkürzten HrpB2- Deletionsderivaten.	51
<u>Abbildung 3.8:</u> Komplementationsanalyse mit HrpB2-Derivaten mit Punktmutationen im konservierten VxTLxK-Motiv.....	52
<u>Abbildung 3.9:</u> Einfluss des VxTLxK-Motivs in HrpB2 auf die stabile Assemblierung des T3S-Pilus.	54
<u>Abbildung 3.10:</u> Immunologische Goldmarkierung von HrpE und HrpB2	56
<u>Abbildung 3.11:</u> Die subzelluläre Lokalisierung von HrpB2.....	58
<u>Abbildung 3.12:</u> Vergleich der Aminosäuresequenz von HrpB2 mit YscI und PrgJ.....	59
<u>Abbildung 3.13:</u> Funktionelle Analyse von PrgJ und YscI in <i>Xcv</i>	61
<u>Abbildung 3.14:</u> Nachweis der Interaktion von HrpB2 mit HpaC und HrcU ₂₆₅₋₃₅₇	63
<u>Abbildung 3.15:</u> Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von HpaC aus <i>Xcv</i>	65
<u>Abbildung 3.16:</u> Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (1).67	
<u>Abbildung 3.17:</u> Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (2).68	
<u>Abbildung 3.18:</u> Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (3).69	
<u>Abbildung 3.19:</u> Interaktionsanalyse zwischen HrcU ₂₅₅₋₃₅₇ und HpaC-Derivaten.....	71
<u>Abbildung 3.20:</u> Zusammenfassung: Identifizierung funktioneller Proteinregionen in HpaC.72	
<u>Abbildung 3.21:</u> Komplementationsanalyse mit HpaC-Punktmutanten und der T3S4-Domäne	74
<u>Abbildung 3.22:</u> Interaktionsanalyse zwischen HpaC-Derivaten mit Punktmutationen, der T3S4-Domäne von HpaC und HrcU ₂₅₅₋₃₅₇	77

<u>Abbildung 3.23:</u> Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2.....	77
<u>Abbildung 3.24:</u> Analyse der Interaktion zwischen HpaC und HpaC-Deletionsderivaten.	79
<u>Abbildung 3.25:</u> Zusammenfassung: Charakterisierung der C-terminalen Region aus HpaC.	80
<u>Abbildung 4.1:</u> Modell der Assemblierung von "inner rod"-Struktur und Hrp-Pilus in <i>Xcv.</i> ..	90

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1.1:</u> Ausgewählte pflanzenpathogene Bakterien.	1
<u>Tabelle 1.2:</u> Beispiele von T3S4-Proteinen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.	13
<u>Tabelle 1.3:</u> Beispiele von Nicht-Effektoren des T3S-Systems aus <i>Xcv</i>	20
<u>Tabelle 1.4:</u> Beispiele ausgewählter Hpa-Proteine aus <i>Xcv</i>	23
<u>Tabelle 2.1:</u> Verwendete Bakterienstämme.	27
<u>Tabelle 2.2:</u> Verwendete Plasmide.	28
<u>Tabelle 2.3:</u> Verwendete Medien.	28
<u>Tabelle 2.4:</u> Verwendete Expressionskonstrukte.	30
<u>Tabelle 2.5:</u> Verwendete Primärantikörper.	36
<u>Tabelle 3.1:</u> Zusammenfassung der Komplementationsstudien mit N-terminal verkürzten HrpB2-Derivaten.	46
<u>Tabelle 4.1:</u> Beispiele von bekannten Proteinen mit Sequenzähnlichkeiten in der C-terminalen Region aus Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.	87
<u>Tabelle 6.1:</u> Verwendete Oligonukleotide.	112

1. Einleitung

1.1 Pflanzenpathogene Bakterien

Vertreter pflanzenpathogener Bakterien aus Gram-positiven (z.B. *Clavibacter*) und Gram-negativen Gattungen (z.B. *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* und *Xanthomonas*) lösen eine Reihe verschiedener Krankheiten ihrer Wirtspflanze aus (Tabelle 1.1). Eine erfolgreiche Infektion der Pflanze stellt trotz alledem eher eine Ausnahme dar. Die effektive Besiedlung und Infektion der Pflanze gelingt zumeist nur spezialisierten Pathogenen. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen effektive Mechanismen entwickelt, um sich vor Infektionen zu schützen. Im Gegenzug versuchen potentielle Pathogene diese Abwehrsysteme zu unterlaufen und es kommt zu einem ständig andauernden, evolutionären Wettlauf zwischen der Entwicklung pflanzlicher Abwehrmechanismen und Anpassung der Infektionsstrategien des Pathogens.

Tabelle 1.1: Ausgewählte pflanzenpathogene Bakterien.

Pathogen ^a	Wirt ^a	Krankheit / Symptom ^a
Gram-positive Gattungen		
<i>Clavibacter</i> spp. <i>Clavibacter michiganensis</i>	Tomate, Kartoffel, Luzerne	Welke, Fäule
Gram-negative Gattungen		
<i>Agrobacterium</i> spp. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Dikotyledone Pflanzen Dikotyledone Pflanzen	Wurzelgallen Wurzelhaarkrankheit
<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudomonas syringae</i>	Tomate, Sojabohne, Zuckerrübe, Getreide	Fleckenkrankheit, Welke, Krebs
<i>Ralstonia</i> spp. <i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomate, Kartoffel	Welke
<i>Xanthomonas</i> spp. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Paprika, Tomate Brassicaceae Citrus-Arten Reis	Fleckenkrankheit Adernschwärze Zitruskrebs Fäulnis

^a Angegeben sind ausgewählte Beispiele bekannter Pflanzenpathogene, die bei einer erfolgreichen Infektion der Wirtspflanze Krankheiten bzw. Symptome auslösen.

1.2 Infektionsstrategien Gram-negativer Bakterien

Die erfolgreiche Infektion von Pflanzen durch Gram-negative Bakterien wird entscheidend durch bakterielle Proteinsekretionssysteme bestimmt, die Virulenzfaktoren in das extrazelluläre Milieu sekretieren oder direkt in die Wirtszelle translozieren. Bedeutende Gruppen von sekretierten Virulenzfaktoren bei pflanzenpathogenen Bakterien sind vor allem extrazelluläre Enzyme, wie z.B. Zellulasen und Proteasen, aber auch ein breites Spektrum von Toxinen oder Exopolysacchariden (EPS) (Kao *et al.* 1992; Bender *et al.* 1999; Sandkvist 2001). In dem z.B. EPS die Bakterien zumeist vollständig umhüllen, unterstützen sie dabei die Anlagerung der Bakterien an die Wirtszelloberfläche, schützen vor pflanzlichen Giftstoffen und Austrocknung (Coplin *et al.* 1990; Kao *et al.* 1992; Dharmapuri *et al.* 1999). Zudem besitzt z.B. *Agrobacterium tumefaciens* die besondere Fähigkeit, neben Proteinen, auch DNA-Protein Komplexe direkt in die pflanzliche Wirtszelle zu transferieren (Kostakioti *et al.* 2005; Juhas *et al.* 2008).

Gram-negative Bakterien besitzen verschiedenste Proteinsekretionssysteme, welche sich in der Struktur, Regulation und Substratspezifität voneinander signifikant unterscheiden (Gerlach *et al.* 2007). Jedoch erfordert die Sekretion extrazellulärer Proteine immer einen Transport über die innere und äußere Membran der Bakterienzelle. Dabei werden Proteinsekretionssysteme in Abhängigkeit ihrer Transportwege in zwei Hauptgruppen, Sec-abhängig und Sec-unabhängig, eingeteilt (Kostakioti *et al.* 2005). Sec-abhängige Transportwege erlauben den Transport von Substraten mittels des allgemeinen Sekretionsweges über die bakterielle innere Membran (IM) in das Periplasma (PP). Sec-abhängig transportierte Proteine haben ein hydrophobes, N-terminales Sekretionssignal gemeinsam, welches im PP durch eine Signal-Peptidase abgespalten wird (Veenendaal *et al.* 2004). Zu Sec-abhängigen Sekretionssystemen zählen z. B. Autotransporter (Typ V-Sekretionssysteme, T5S-System), das „two partner“ Sekretionssystem (TPS-System), das „Chaperon-Usher“-System (CU-System) sowie das Typ II-Sekretionssystem (T2S-System) (Kostakioti *et al.* 2005). Das T2S-System sekretiert v.a. hydrolytische Enzyme sowie Toxine in das extrazelluläre Milieu und besitzt hierfür einen oligomeren Proteinkomplex in der IM und einem Transportkanal in der bakteriellen äußeren Membran (ÄM) (Sandkvist 2001; Kostakioti *et al.* 2005) (Johnson *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu erfolgt der Sec-unabhängige Transport von Proteinen ohne periplasmatische Zwischenstufen direkt aus dem Zytoplasma in die extrazelluläre Umgebung. Sec-unabhängige Proteintransportsysteme sind z.B. das Typ I-Sekretionssystem (T1S-System), Typ III-Sekretionssystem (T3S-System), Typ IV-

Sekretionssystem (T4S-System) und Typ VI-Sekretionssystem (T6S-System) (Gerlach und Hensel 2007; Hayes *et al.* 2010).

Die meisten pathogenen Bakterien verwenden zur erfolgreichen Infektion ihres entsprechenden Wirtsorganismus mehrere Proteinsekretionssysteme in unterschiedlichen Kombinationen. Hierbei sind jedoch meist T3S-Systeme, welche sogenannte bakterielle Effektorproteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle transportieren für die Virulenz vieler pathogener Bakterien von besonderer Bedeutung. Erstmals in tierpathogenen Bakterien der Gattung *Yersinia* spp. identifiziert, wurde es seitdem in einer Vielzahl Gram-negativer tierpathogenen (z.B. *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Bordetella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*) und pflanzenpathogenen Bakterien (z.B. *Ralstonia* spp. und *Xanthomonas* spp.) als essentieller Pathogenitätsfaktor charakterisiert (Michiels *et al.* 1991b; Cornelis *et al.* 2000; Mota *et al.* 2005; Tampakaki *et al.* 2010).

1.3 Das T3S-System

Hinsichtlich Aufbau und Funktion werden T3S-Systeme in flagelläre und Translokations-assoziierte T3S-Systeme unterschieden (Abbildung 1.1) (Desvaux *et al.* 2006). Flagelläre T3S-Systeme dienen hauptsächlich der bakteriellen Motilität und bestehen im Wesentlichen aus einem flagellären Filament, welches über einen Haken mit dem sogenannten Basalkörper verbunden ist (Samatey *et al.* 2004). Im Gegensatz zu Translokations-assoziierten T3S-Systemen sekretieren flagelläre T3S-Systeme hauptsächlich extrazelluläre Komponenten des Flagellums wie z.B. Haken- und Filamentproteine (Minamino *et al.* 1999b). Eine Sekretion von Virulenzfaktoren durch das flagelläre T3S-System ist jedoch nicht ausgeschlossen und wurde z.B. für *Yersinia* spp. beobachtet (Young *et al.* 1999; Young *et al.* 2002). Translokations-assoziierte T3S-Systeme werden aufgrund ihrer Form und ihrer Fähigkeit, Proteine (Effektoren) direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle zu translozieren, auch als „molekulare Nadeln“ bezeichnet (Cornelis 2006). Diese „molekularen Nadeln“ sind supramolekulare Strukturen, welche die IM, den periplasmatischen Raum, die ÄM, den extrazellulären Raum und die Wirtszellmembran durchspannen (Abbildung 1.1).

Strukturell und evolutionär sind Translokations-assoziierte T3S-Systeme mit flagellären T3S-Systemen verwandt und aus mehr als 20 einzelnen Komponenten aufgebaut (Gerlach und Hensel 2007). Mindestens neun strukturelle Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems sind zwischen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konserviert und stellen vermutlich Kernkomponenten des Sekretionsapparates in der IM und ÄM dar. In pflanzenpathogenen Bakterien werden strukturelle Komponenten des T3S-Systems durch ein *hrp* („hypersensitive response and pathogenicity“-Gencluster kodiert. In Anlehnung der Nomenklatur von Ysc („*Yersinia* secreted“-Proteinen des T3S-Systems vom tierpathogenen Bakterium *Yersinia*, werden in Pflanzenpathogenen konservierte Komponenten als Hrc („Hrp conserved“-Proteine bezeichnet (Bogdanove *et al.* 1996). Einige dieser Kernkomponenten sind zwischen flagellären und translokations-assoziierten T3S-Systemen konserviert und bilden vermutlich den beide bakterielle Membranen überspannenden Basalapparat (Abbildung 1.1), (Blocker *et al.* 2003; Tampakaki *et al.* 2010). Der Basalapparat besteht vermutlich aus zwei Ringpaare in der IM und ÄM, welche in der Basis durch einen zentralen periplasmatischen Exportkanal miteinander verbunden sind (Cornelis 2006; Yip *et al.* 2006). In *Salmonella typhimurium* wurde im Periplasma zusätzlich die Anwesenheit einer „inner rod“-Struktur gezeigt, welche hier maßgeblich durch das Protein PrgJ gebildet wird (Marlovits *et al.* 2004). Es wird angenommen, dass der „inner rod“ zur stabilen Verankerung

extrazellulärer Strukturen erforderlich ist (Marlovits *et al.* 2004; Marlovits *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008). Ähnliche periplasmatische Strukturen wurden ebenfalls für das T3S-System aus *Yersinia* spp. postuliert und aus EPEC (enteropathogene *E. coli*) beobachtet. (Ogino *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008; Sal-Man *et al.* 2012). Die IM-Ringe sind mit einem Exportapparat assoziiert, welcher hauptsächlich aus Mitgliedern konservierter Proteinfamilien aufgebaut und mit einem vorhergesagten zytoplasmatischen C-Ring sowie einem ATPase-Komplex verknüpft ist (Büttner 2012). Weiterhin ist der Basalkörper von Translokations-assoziierten T3S-Systemen mit einem extrazellulären Pilus, in Pflanzenpathogenen als Hrp-Pilus bezeichnet, oder einer Nadelstruktur assoziiert (Hueck 1998; Ghosh 2004; He *et al.* 2004). Im Gegensatz zu tierpathogenen Bakterien müssen pflanzenpathogene Bakterien zur Translokation von Effektorproteinen zusätzlich die pflanzliche Zellwand überwinden (Abbildung 1.1). Daher ist der Hrp-Pilus pflanzenpathogener Bakterien länger (bis zu 2 μm) als die T3S-System assoziierten, nadelartigen Strukturen (ca. 45-80 nm) in Tierpathogenen (He *et al.* 2003; Jin *et al.* 2003; Kvitko *et al.* 2007). Die Translokation erfolgt vermutlich mit Hilfe eines postulierten kanalförmigen Proteinkomplexes, dem Translokon, welcher in die Plasmamembran der Wirtszelle inseriert und eine Pore bildet (Büttner *et al.* 2002; Büttner *et al.* 2002; Coombes *et al.* 2005).

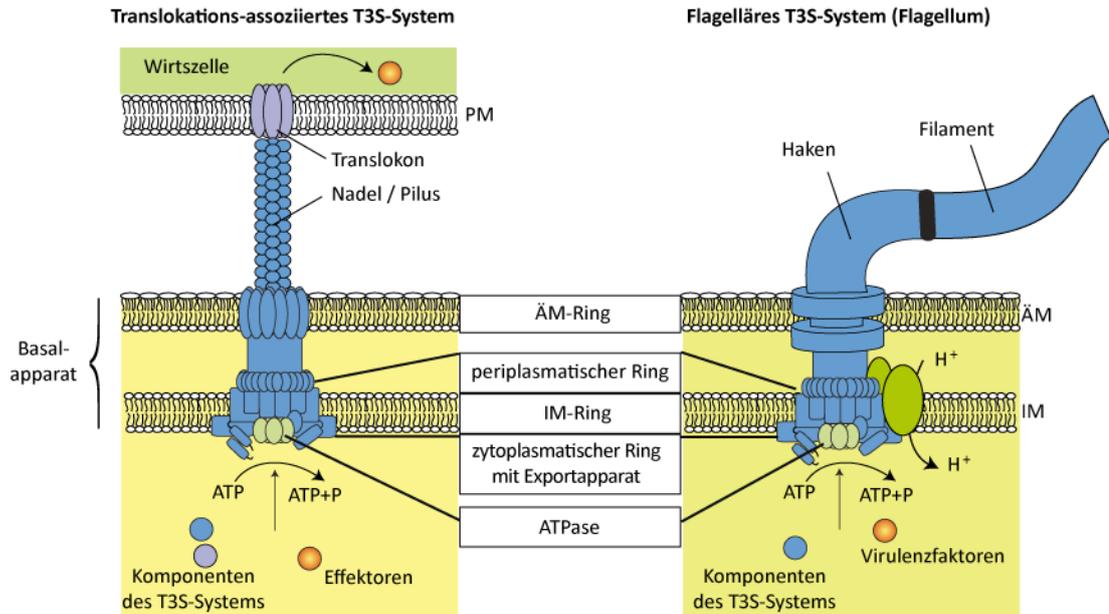


Abbildung 1.1: Vergleich des Translokations-assoziierten und flagellären T3S-Systems.

Modelle eines Translokations-assoziierten und flagellären T3S-Systems aus tier- und pflanzenpathogene Bakterien. Strukturell und evolutionär sind Translokations-assoziierte T3S-Systeme und flagelläre T3S-Systemen verwandt. Beide T3S-Systeme überspannen die bakterielle innere (IM) und äußere Membran (ÄM). Im Translokations-assoziierten T3S ist der Basalapparat in tierpathogenen Bakterien mit einer extrazellulären Nadelstruktur (Nadel), in pflanzenpathogenen Bakterien mit einer extrazellulären Pilusstruktur (Pilus) und im flagellären-T3S-System mit einem extrazellulären Haken sowie Filament assoziiert. Die Nadel bzw. der Pilus im Translokations-assoziierten T3S-System ist zusätzlich mit einem Translokonkomplex in der Plasmamembran (PM) der Wirtszelle verknüpft, welcher die Translokation von Effektoren unterstützt. Die Energie zu Sekretion oder Translokation von T3S-Substraten (Komponenten des T3S-Systems, Effektoren und Virulenzfaktoren) liefert die am zyttoplasmatischen Ring assoziierte ATPase, welche im flagellären T3S-System vermittelt durch Protonenkanäle das Flagellum bewegt. Der zyttoplasmatische Ring, welcher mit dem Exportapparat assoziiert ist, wurde bisher nur im Translokations-assoziierten T3S-System vorhergesagt. Abbildung modifiziert nach (Büttner *et al.* 2009).

1.4 Das T3S-Signal – Exportsignale des T3S-Systems

Die Erkennung, Sekretion und Translokation von Substraten durch das T3S-System setzt die Anwesenheit eines spezifischen Exportsignals voraus. Jedoch ist die Natur dieses T3S-Signals, im Gegensatz zu dem gut charakterisierten Sec-Signal (Nielsen *et al.* 1997), bis heute nicht genau geklärt. Da das T3S-System pflanzenpathogener Bakterien in der Lage ist Effektorproteine tierpathogener Bakterien zu sekretieren, wird ein allgemeines Sekretionssignal vermutet (Rossier *et al.* 1999). Unterschiedliche Daten deuten darauf hin, dass das Sekretionssignal für eine Typ III-abhängige Sekretion von Substraten des T3S-Systems in den zumeist N-terminalen 20 bis 30 Aminosäuren lokalisiert ist (Michiels *et al.* 1991a; Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996). Obwohl bisher innerhalb der N-terminalen Region von T3S-Substraten weder konservierte Aminosäuren identifiziert oder eine typische Konsensus-Sequenz gefunden wurde, gibt es Hinweise auf eine charakteristische Zusammensetzung der Aminosäuren (Guttman *et al.* 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.* 2002; Schechter *et al.* 2004; Arnold *et al.* 2009; Löwer *et al.* 2009; Samudrala *et al.* 2009). Für einige Effektoren aus *Pseudomonas syringae* wurde beschrieben, dass die N-terminale Region einen hohen Gehalt an Serin, aber verhältnismäßig wenig Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin und Lysin aufweist (Guttman *et al.* 2002; Schechter *et al.* 2004). Desweiteren zeigte ein Vergleich der Sekundärstrukturen N-terminaler Bereiche von ca. 100 Effektorproteinen aus tierpathogenen und symbiotischen Bakterien, dass die N-terminalen Bereiche dieser Proteine in der Regel nur wenig strukturiert sind (Arnold *et al.* 2009). Ungeordnete Proteinregionen besitzen eine gewisse strukturelle Flexibilität, welche vermutlich die Erkennung des T3S-Signals durch Komponenten des T3S-Systems erleichtert und womöglich eine Voraussetzung für den Transport der T3S-Substrate durch den engen Transportkanal des T3S-System darstellt (Buchko *et al.* 2010). Die Anwesenheit eines T3S-Signals ist nicht ausschließlich auf N-terminale Regionen beschränkt. So wurde z.B. ein T3S-Signal in der C-terminalen Region des Effektors Tir aus EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) identifiziert (Allen-Vercoe *et al.* 2005). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass zentrale oder C-terminale Regionen z.B. vom Effektorprotein SipB aus *Salmonella* spp. oder dem Translokonprotein EspB aus EHEC ebenfalls eine Typ III-abhängige Sekretion unterstützen können (Chiu *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007). Außerdem wurde für einige *Yersinia*-Effektoren die alternative Hypothese entwickelt, nach der das T3S-Signal im 5'-Bereich der mRNA liegt. Damit wird eine kotranslationale Typ III-abhängige Sekretion postuliert (Anderson *et al.* 1997; Anderson *et al.* 1999; Ramamurthi *et al.* 2005). Beide Hypothesen sind zum derzeitigen Stand umstritten und lassen sich schwer in Einklang bringen. Zudem lässt sich die schnelle

Translokation von Effektoren, wie z.B. von YopH aus *Yersinia pseudotuberculosis* oder SipA aus *Salmonella typhimurium*, welche bereits zehn Sekunden nach der Aktivierung des T3S-Systems nachweisbar ist, nicht mit einem kotranslationalen Transport begründen (Andersson *et al.* 1999; Schlumberger *et al.* 2005; Wilharm *et al.* 2007). Es wird davon ausgegangen, dass die Typ III-abhängige Sekretion durch verschiedene Signale vermittelt wird und dass sowohl die mRNA als auch der N-terminale Bereich des Proteins in unterschiedlichem Maße zur Sekretion beitragen kann (Karlinsky *et al.* 2000; Aldridge *et al.* 2001).

Effektorproteine besitzen vermutlich zusätzlich zum Sekretionssignal ein Translokationssignal, welches innerhalb der ersten 50 bis 100 Aminosäuren angenommen wird und die Translokation in die Wirtszelle vermittelt (Lloyd *et al.* 2001; Guttman *et al.* 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.* 2002; Ghosh 2004). Häufig ist dies auch die Bindestelle von sogenannten Typ III-Sekretionschaperonen (T3S-Chaperone) (Parsot *et al.* 2003). Diese kleinen, zytoplasmatischen Proteine fördern in tier- und in pflanzenpathogenen Bakterien sowohl die effiziente Sekretion als auch Translokation von T3S-Substraten und vermitteln u.a. mittels spezifischer Bindung ihrer Interaktionspartner die Spezifität der Substraterkennung durch das T3S-System (Page *et al.* 2002; Parsot *et al.* 2003) (Feldman *et al.* 2003).

1.5 Substrate des T3S-Systems

Typ III-abhängig transportierte Proteine können nach ihrem Bestimmungsort in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man Proteine, die in das extrazelluläre Milieu transportiert werden oder extrazelluläre Komponenten des T3S-Apparates darstellen (Nicht-Effektorproteine) von Effektorproteinen, die direkt in das Zytosol der Pflanzenzelle transloziert werden.

1.5.1 Nicht-Effektorproteine

Zu den Typ III-abhängig sekretierten Nicht-Effektorproteinen gehören u.a. sogenannte Translokonproteine. Translokonproteine gehören zu den extrazellulären Bestandteilen des T3S-Systems und bilden vermutlich eine Pore in der Wirtszellmembran. Aus dem tierischen Pathogen *Yersinia* spp. sind Translokonproteine wie z.B. YopB und YopD bereits bekannt (Goure *et al.* 2005; Edqvist *et al.* 2007). Ein weiteres sekretiertes Nicht-Effektorprotein aus *Yersinia* spp. stellt LrcV dar. Im Gegensatz zu YopB und YopD bildet LrcV keine Pore in der Wirtszellmembran, sondern verknüpft die extrazelluläre Nadelstruktur mit dem Translokon als sogenannter „tip“-Komplex (Goure *et al.* 2005; Mueller *et al.* 2008). In pflanzenpathogenen Bakterien existieren ebenfalls putative Translokonproteine wie z.B. HrpF und XopA aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) oder PopF1 und PopF2 aus *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) (Büttner und Bonas 2002; Büttner *et al.* 2002; Meyer *et al.* 2006). Eine mit dem „tip“-Komplex vergleichbare extrazelluläre Komponente des T3S-Systems wurde bisher in Pflanzenpathogenen nicht identifiziert (Büttner und He 2009).

Harpin-Proteine repräsentieren eine weitere Klasse von Nicht-Effektorproteinen und kommen ausschließlich in pflanzenpathogenen Bakterien vor. Es wird vermutet, dass Harpin-Proteine wie HrpZ aus *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) oder PopA aus *R. solanacearum* zusammen mit Translokonproteinen an der Translokation von Effektorproteinen beteiligt sind (Lee *et al.* 2001; Racapé *et al.* 2005; Kvitko *et al.* 2007).

Weitere extrazelluläre Substrate des T3S-Systems sind strukturelle Piluskomponenten. Die Komponenten des Hrp-Pilus in pflanzenpathogenen Bakterien sind meist kleine Proteine (6 bis 11 kDa) und weisen untereinander eine starke Sequenzvariabilität auf (Weber *et al.* 2005a). So ist HrpA, ein gut charakterisiertes Protein des Hrp-Pilus aus *P. syringae* pv. *tomato* nur zu 27% identisch mit HrpA aus *P. syringae* pv. *syringae* (Roine *et al.* 1997; Deng *et al.* 1998; Weber und Koebnik 2005a). Aus *Xcv* ist das Protein HrpE bekannt, welches als

Hauptkomponente des Hrp-Pilus aus *Xcv* identifiziert werden konnte und HrpB2, welches ebenfalls als Komponente des T3S-Systems von *Xcv* vermutet wird (Rossier *et al.* 2000; Weber *et al.* 2005b, Hartmann *et al.* 2012). Die Typ III-abhängige Sekretion der extrazellulären Komponenten des T3S-Apparates, wie z.B. Bestandteile des Translokons oder des Pilus, ist die Voraussetzung für die Sekretion und Translokation von Effektorproteinen.

1.5.2 Effektorproteine

Effektoren werden direkt in die pflanzliche Wirtszelle transloziert (Alfano *et al.* 2004). In der Wirtszelle angekommen können Effektorproteine die Bedingungen für eine Vermehrung des Pathogens optimieren. Zum Beispiel nutzen intrazelluläre Pathogene von Säugetieren, wie *Salmonella*, *Shigella* und *Chlamydia* Typ III-Effektoren, um ihre eigene Phagozytose durch Wirtszellen zu regulieren und auf diese Weise zwischen verschiedenen Infektionsstrategien wechseln zu können (Grant *et al.* 2006). Die Translokation von Typ III-Effektoren ist ebenfalls essentiell für einen erfolgreichen Lebenszyklus und Interaktion vieler Gram-negativer pflanzenassoziierter Bakterien mit ihren Wirtspflanzen, die sowohl von symbiontischer (z. B. *Rhizobium* spp.) als auch pathogener Natur (z. B. *Xanthomonas* spp.) sein können (Grant *et al.* 2006). Indem Effektorproteine pflanzenpathogener Bakterien z.B. Hormon- und Signalwege der Wirtspflanze, die pflanzliche Genexpression oder pflanzliche Zielproteine modifizieren, sind sie fähig die Basalabwehr bzw. spezifische Abwehrreaktionen der Wirtspflanze zu supprimieren. Auf diese Weise unterstützen Effektorproteine in Pflanzenpathogenen die erfolgreiche Vermehrung des Pathogens in den pflanzlichen Interzellularräumen (Slot *et al.* 2002; Alfano and Collmer 2004; Chang *et al.* 2004; Mudgett 2005; Grant *et al.* 2006; McDowell *et al.* 2007).

1.6 Modell des Wechsels der Substratspezifität

Angesichts der komplexen Architektur des T3S-Systems wird angenommen, dass die Assemblierung des Basalapparates mit dessen extrazellulären Komponenten der Sekretion und Translokation von Effektorproteinen vorrausgeht. Daher wird für den Aufbau des T3S-Apparates und der Sekretion bzw. Translokation von Substraten ein streng kontrollierter und hierarchisch ablaufender Prozess vermutet (Ghosh 2004; Cornelis *et al.* 2006; Richard *et al.* 2007). Studien aus tierpathogenen Bakterien (z.B. *Yersinia* spp. oder *Salmonella* spp.) zeigten indes, dass die Ausbildung bzw. der kontrollierte Aufbau extrazellulärer Nadelstrukturen mit genau definierter Länge (ca. 60 nm bzw. 80 nm) für die spätere Translokation von Effektorproteinen ein entscheidender Faktor ist (Kubori *et al.* 1998; Hoiczky *et al.* 2001; Journet *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2009; Wagner *et al.* 2010). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Komponenten der extrazellulären Nadel- bzw. Pilusstruktur als erste Proteine („frühe“ T3S-Substrate) durch den T3S-Apparat sekretiert werden, da die Nadelstruktur bzw. der Pilus pathogener Bakterien eine strukturelle Voraussetzung für die Sekretion von „späten“ T3S-Substraten wie z.B. Translokon- und Effektorproteine darstellt (Ghosh 2004). Zum Beispiel wurde für *Xcv* vorgeschlagen, dass die Sekretion des Pathogenitätsfaktors HrpB2, welcher für die Assemblierung des Hrp-Pilus erforderlich ist, eine Voraussetzung für die Sekretion des Translokonproteins HrpF und der Effektorproteine darstellt (Rossier *et al.* 2000; Lorenz *et al.* 2008b). Es wird demnach davon ausgegangen, dass während des zeitlichen Ablaufs vom Aufbau des Basalapparates über die Sekretion von Nadel- bzw. Piluskomponenten bis hin zur Translokation von Effektorproteinen ein Wechsel in der Substratspezifität des T3S-Systems von „frühen“ zu „späten“ Substraten stattfindet (Abbildung 1.2) (Cornelis 2006; Deane *et al.* 2010; Büttner 2012). Hierbei muss das Pathogen die Fähigkeit besitzen, zwischen „frühen“ und „späten“ Substraten zu unterscheiden. In Translokations-assoziierten und flagellären T3S-Systemen aus tierpathogenen Modellorganismen wurde der Prozess des Wechsels der Substratspezifität (Abbildung 1.2) bereits intensiv studiert und wird hier maßgeblich durch sogenannte T3S4 („type III secretion substrate specificity switch“)-Proteine vermittelt (Cornelis *et al.* 2006).

1.6.1 T3S4-Proteine und die Beziehung zu Proteinen der FlhB/YscU-Familie

Zahlreiche Studien aus tierpathogenen Bakterien zeigten, dass der Wechsel von „frühen“ zu „späten“ Substraten von meist sekretierten und regulatorischen T3S4-Proteinen wie z.B. YscP aus *Yersinia enterocolitica*, Spa32 aus *Shigella flexneri* oder InvJ bzw. FliK aus *Salmonella typhimurium* abhängt (Tabelle 1.2) (Minamino *et al.* 1999a; Magdalena *et al.* 2002; Journet *et*

et al. 2003; Agrain *et al.* 2005a; Sorg *et al.* 2007; Botteaux *et al.* 2008). Häufig regulieren einige T3S4-Proteine (z.B. YscP) zusätzlich die Länge der extrazellulären Nadel. Für tierpathogene Modellsysteme wurde gezeigt, dass der Verlust von funktionellen T3S4-Proteinen neben der reduzierten Sekretion von „späten“ Substraten häufig in einer stark verlängerten Nadelstruktur resultiert (Edqvist *et al.* 2003; Journet *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2009). T3S4-Proteine sind auf Ebene der Aminosäuresequenz untereinander wenig konserviert. Jedoch besitzen bekannte T3S4-Proteine eine in der C-terminalen Region gelegene, strukturell konservierte T3S4-Domäne mit einem P-X-L-G-Aminosäuremotiv, welches wahrscheinlich für die Proteinfunktion von entscheidender Bedeutung ist (Minamino *et al.* 2004; Agrain *et al.* 2005a; Minamino *et al.* 2006; Botteaux *et al.* 2008). Studien über Spa32 und FliK zeigten zusätzlich, dass T3S4-Proteine die Fähigkeit besitzen, mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von Mitgliedern der konservierten FlhB/YscU-Proteinfamilie zu interagieren (Abbildung 1.2).

Mitglieder der FlhB/YscU-Familie sind konservierte IM-Proteine, welche vermutlich an der Erkennung von Substraten und der Kontrolle der Substratspezifität des T3S-Systems entscheidend beteiligt sind (Minamino *et al.* 2000a; Minamino *et al.* 2000c; Botteaux *et al.* 2008; Lorenz *et al.* 2011). FlhB, YscU und YscU-homologe Proteine sind in der Regel mit vier transmembranen Domänen in der bakteriellen IM verankert und besitzen eine C-terminale Domäne, welche in das bakterielle Zytoplasma hineinragt (Allaoui *et al.* 1994; Lavander *et al.* 2002). Diese zytoplasmatische C-terminale Domäne wird innerhalb eines unter YscU-homologen Proteinen konservierten Aminosäuremotivs (NPTH) zwischen Asparagin (N) und Prolin (P) autokatalytisch gespalten (Bjornfot *et al.* 2009). Es existieren experimentelle Hinweise, dass das konservierte NPTH-Motiv über die Ausbildung einer definierten Struktur bzw. eines sogenannten „loops“ die zytoplasmatische C-terminale Domäne von FlhB/YscU und Homologen in zwei Hälften unterteilt (Ferris *et al.* 2005; Deane *et al.* 2008). Die Spaltung zwischen Asparagin und Prolin resultiert vermutlich in einer strukturellen Reorganisation des PTH-„loops“ (Lavander *et al.* 2002; Ferris *et al.* 2005; Deane *et al.* 2008; Zarivach *et al.* 2008; Bjornfot *et al.* 2009; Lountos *et al.* 2009; Wiesand *et al.* 2009). Es existieren Hinweise, dass die strukturellen Änderungen des PTH-„loops“ maßgeblich am Wechsel der Substratspezifität des T3S-System beteiligt sind. Zusätzlich wird angenommen, dass T3S4-Proteine unter bestimmten Voraussetzungen einen Zugang zum C-terminalen Spaltprodukt der zytoplasmatische Domäne von YscU bzw. YscU-Homologen erhalten. Die Interaktion zwischen T3S4-Proteinen und YscU bzw. YscU-Homologen ist häufig mit der Konformationsänderung des PTH-„loops“ assoziiert und kontrolliert auf diese

Weise vermutlich den Wechsel in der Substratspezifität von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten (Abbildung 1.2) (Edqvist *et al.* 2003; Riordan *et al.* 2008a).

Alternativ gibt es Hinweise, dass YscP oder InvJ die Assemblierung der vorhergesagten „inner rod“-Struktur (z.B. YscI aus *Yersinia* spp.) regulieren und die kontrollierte Fertigstellung der „inner rod“-Struktur im Inneren des Basalapparates den Wechsel der Substratspezifität induzieren könnte (Marlovits *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008). Zu Beginn dieser Arbeit war in pflanzenpathogenen Bakterien nicht geklärt, inwieweit und nach welchem Mechanismus ein Wechsel der Substratspezifität ablaufen könnte. Derweil zeigten mehrere Studien über T3S-Systeme aus pflanzenpathogenen Bakterien (z.B. *Xcv*), dass vermutlich auch hier ein Wechsel der Substratspezifität von „frühen“ zu „späten“ Substraten stattfindet, dieser ebenfalls durch spezielle Proteine reguliert wird und die Kontrolle wahrscheinlich von Prozessen vermittelt wird, die in Tier- und Pflanzenpathogenen ähnlich sind (Lorenz *et al.* 2008b).

Tabelle 1.2: Beispiele von T3S4-Proteinen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.

Pathogen	T3S4-Protein ^a	Interaktion mit YscU _C /FlhB _C ^b oder Homologe	Typ III-abhängige Sekretion	Einfluss
<i>Yersinia</i> spp.	YscP	nicht gezeigt	Ja	differenzielle Sekretion von T3S-Substraten, Kontrolle der Nadellänge
<i>Salmonella</i> spp.	InvJ	nicht gezeigt	Ja	Kontrolle der „inner rod“ Struktur und Nadellänge
	Flik	Ja	Ja	Kontrolle der Hakenlänge und Filamenstruktur
<i>Shigella flexneri</i>	Spa32	Ja	Ja	differenzielle Sekretion von T3S-Substraten, Kontrolle der Nadellänge
<i>Xcv</i>	HpaC	Ja	Nein	differenzielle Sekretion von T3S-Substraten

^a T3S4-Proteine aus dem translokations-assoziierten T3S-System mit Ausnahme von FliK, ^b YscU_C/FlhB_C: Interaktion mit der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne von YscU/FlhB oder homologen Proteinen. Tabelle wurde modifiziert nach (Büttner 2012).

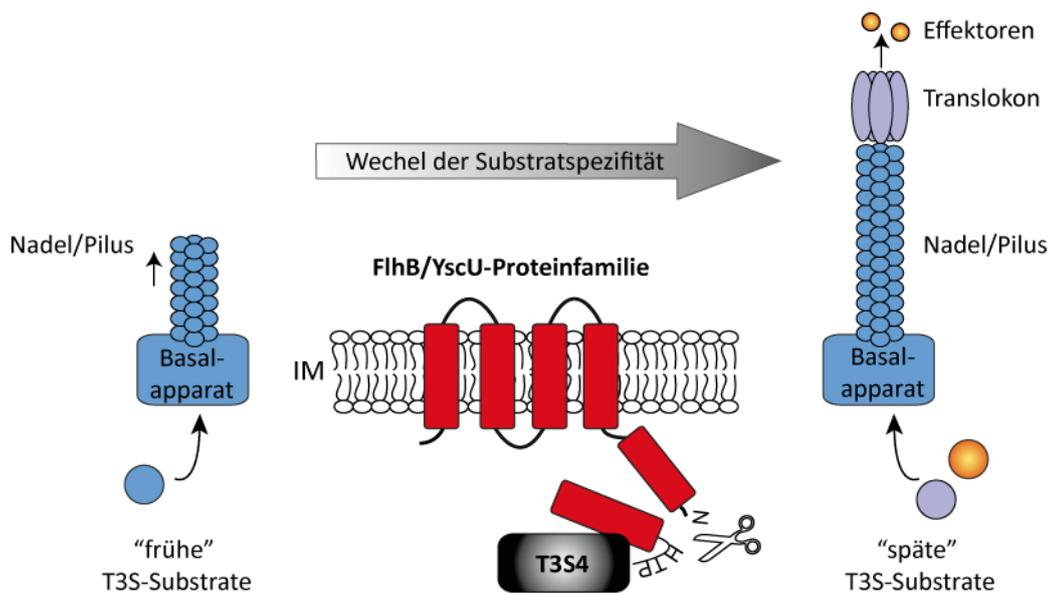


Abbildung 1.2: Modell des Wechsels der Substratspezifität.

Modell des Wechsels der Substratspezifität in „translokations-assoziierten“ T3S-Systemen tier- und pflanzenpathogener Bakterien. Die Substratspezifität des T3S-Systems wechselt von „frühen“ T3S-Substraten (z.B. Komponenten des Basalapparates und der Nadel- bzw. Pilusstruktur) zu „späten“ T3S-Substraten (z.B. Translokon- und Effektorproteine). Der Wechsel von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten wird durch Mitglieder der konservierten FlhB/YscU-Proteinfamilie und regulatorischen T3S4-Proteinen (T3S4) vermittelt. FlhB/YscU und YscU-homologe Proteine sind mit vier transmembranen Domänen in der inneren bakteriellen Membran (IM) verankert und besitzen eine zytoplasmatische C-terminale Domäne mit konservierten NPTH-Motiv. Die autokatalytische Spaltung von FlhB/YscU innerhalb des NPTH-Motivs und die Bindung von T3S4-Proteinen mit dem Spaltprodukt resultiert vermutlich in einer strukturellen Reorganisation des PTH-„loops“. Dies führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der C-terminalen Domäne und induziert den Wechsel in der Substratspezifität des T3S-Systems. Abbildung modifiziert nach D. Büttner.

1.7 Das Modellsystem *Xanthomonas* spp.

Der Gattung *Xanthomonas* ist eine Vielzahl pflanzenpathogener und wirtschaftlich bedeutender Arten zuzuordnen (Tabelle 1.1). Xanthomonaden besitzen im Allgemeinen eine gute experimentelle und molekulargenetische Zugänglichkeit. Aus diesem Grund wurden viele Vertreter der Gattung *Xanthomonas* als Modellsystem in der Phytopathologie etabliert (Tabelle 1.1). Ein gut charakterisierter Vertreter pflanzenpathogener Modellsysteme zum Studium von Wirt-Pathogen-Interaktionen und der Typ III-abhängigen Sekretion ist *Xcv*. Für eine Interaktion von *Xcv* mit den Wirtspflanzen ist das T3S-System essentiell (Abbildung 1.3). Translozierte Effektorproteine fördern die erfolgreiche Vermehrung der Bakterien im Apoplasten anfälliger (suszeptibler) Pflanzen. Es kommt in der Pflanze zur Ausprägung charakteristischer Krankheitssymptome, welche sich makroskopisch durch ein feucht bis später nekrotisch erscheinendes Gewebe im infizierten Bereich kennzeichnen (Abbildung 1.3). In diesem Fall spricht man von einer kompatiblen Interaktion zwischen virulenten Bakterien und suszeptiblem Wirt. In resistenten Pflanzen kann jedoch die Vermehrung von *Xcv* durch eine spezifische Abwehrreaktion der Pflanze unterbunden werden. Dabei induzieren individuelle Effektorproteine in resistenten Pflanzen häufig einen lokal begrenzten Zelltod, welcher als „Hypersensitive Reaktion“ (HR) bezeichnet wird (Abbildung 1.3) (Klement 1982). In diesem Fall werden Effektorproteine als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet und das korrespondierende Gen aus der Pflanze, welches die Erkennung des Avirulenzproteins vermittelt, als Resistenzgen (R-Gen). Man spricht von einer inkompatiblen Interaktion zwischen avirulenten Bakterien und resistentem Wirt (Flor 1971; Klement 1982; Staskawicz 2001). Einige Gen-für-Gen-Interaktionen zwischen *avr*-Genen und *R*-Genen aus unterschiedlichen Paprikakultivaren sind für *Xcv* gut charakterisiert. Zum Beispiel trägt die Paprikalinie ECW-10R das dominante *R*-Gen *Bs1* und vermittelt Resistenz gegenüber *Xcv*-Stämmen mit dem *avr*-Gen *avrBs1* (z. B. *Xcv*-Stamm 85-10) (Ronald *et al.* 1988).

In der Regel betrifft die HR bei einer natürlichen Infektion meist nur wenige Zellen und ist makroskopisch kaum sichtbar. Um die Interaktion von *Xcv* mit der Wirtspflanze in experimenteller Umgebung besser analysieren zu können, werden daher größere Blattbereiche mit Suspensionen relativ hoher Bakteriendichte inokuliert. Die HR ist in diesem Fall als eine schnelle, scharf umgrenzte „Nekrose“ des infiltrierten Blattbereiches deutlich zu erkennen.

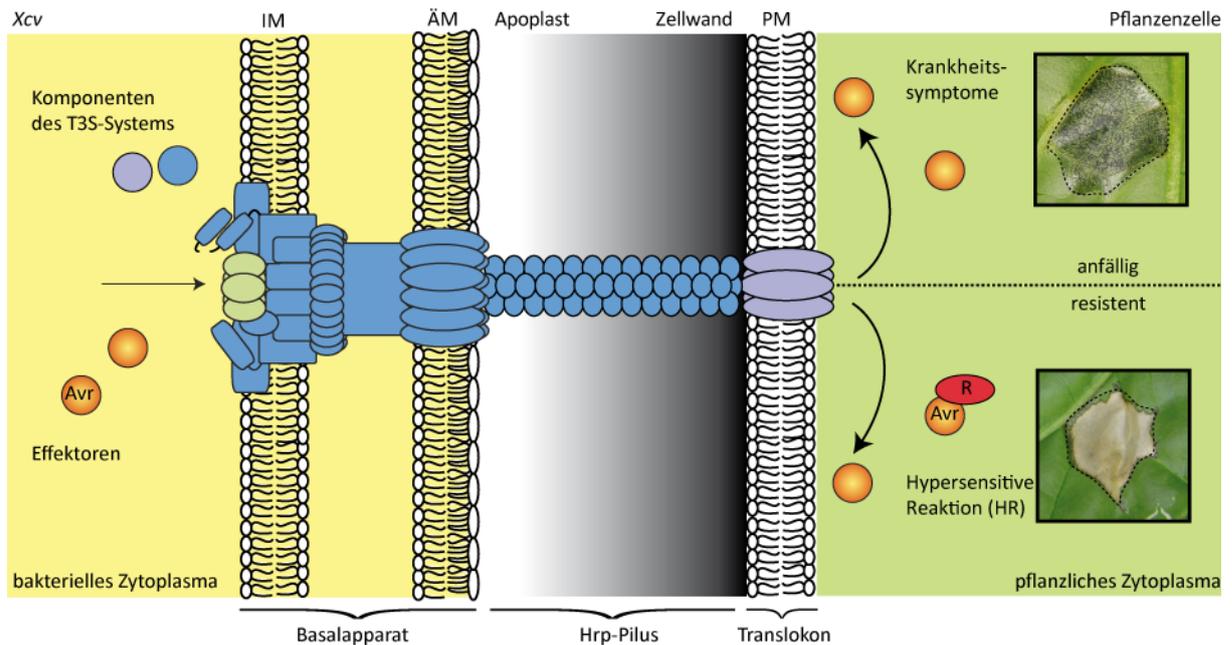


Abbildung 1.3: Das T3S-System von *Xcv* ist für eine Interaktion mit der Wirtspflanze essentiell.

Modell der Interaktion von *Xcv* mit der pflanzlichen Wirtszelle. Zunächst werden über das T3S-System Komponenten des T3S-System sekretiert, welche v.a. extrazelluläre Strukturen wie Translokation und Hrp-Pilus bilden. Die Assemblierung von Hrp-Pilus und Translokation ist für die Sekretion von Effektoren (orange) zwingend erforderlich. Effektorproteine werden in die pflanzliche Wirtszelle transloziert und interferieren in anfälligen Pflanzen mit zellulären Prozessen des Wirtes zum Vorteil von *Xcv* und lösen Krankheitssymptome aus. In resistenten Pflanzen führt die R-Gen-vermittelte Erkennung (R) der bakteriellen Avr-Proteine (Avr) zur Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion (HR) und verhindert eine weitere Vermehrung von *Xcv* in der Wirtspflanze. Dargestellt sind die Laborphänotypen. IM: innere bakterielle Membran; ÄM: äußere bakterielle Membran; PM: Plasmamembran. Abbildung modifiziert nach (Büttner and He 2009).

1.7.1 Das T3S-System von *Xcv*

Das T3S-System ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Xcv*, vermittelt die Sekretion extrazellulärer Komponenten und Translokation von Effektorproteinen (siehe 1.5.2 und 1.7 oben) und wird durch das *hrp*-Gencluster (*hrp* – „hypersensitive response and pathogenicity“) kodiert (Bonas *et al.* 1991).

Regulation der Expression von *hrp*- und Virulenzgenen in *Xcv*.

Die *hrp*-Gene innerhalb des *hrp*-Genclusters von *Xcv* werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern innerhalb der Pflanze oder in speziellem Minimalmedium induziert (Schulte *et al.* 1992b; Wengelnik *et al.* 1996a). Die *hrp*-Genexpression wird durch HrpG und HrpX aktiviert. Beide Proteine sind außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert und Teil einer noch nicht vollständig aufgeklärten Regulationskaskade nach dem Prinzip eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems. HrpG, eine postulierte Sensorkinase, aktiviert unter induzierenden Bedingungen die Expression eines Genom-weiten Regulons (Wengelnik and Bonas 1996a; Wengelnik *et al.* 1996c; Wengelnik *et al.* 1999; Noël *et al.* 2001). In den meisten Fällen

benötigt die HrpG-abhängige Expression den nachgeschalteten Transkriptionsaktivator HrpX, welcher die meisten Gene des *hrp*-Regulons sowie zusätzlich Gene z.B. für Effektoren, Proteasen und weitere potentielle Virulenzfaktoren reguliert (Noël *et al.* 2001; Noël *et al.* 2002). Viele der HrpX-regulierten Gene weisen ein *cis*-regulatorisches Element in ihrer Promotor-Region auf. Dieses konservierte Element wird als PIP („plant-inducible-promotor“-)Box bezeichnet (Fenselau und Bonas 1995). Es konnte gezeigt werden, dass HrpX spezifisch an DNA-Fragmente bindet, die eine PIP-Box enthalten (Koebnik *et al.* 2006). Durch Einführung von Punktmutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren (E44K) in HrpG führten, wurde eine konstitutiv aktive Form des Transkriptionsregulators HrpG identifiziert. Die mutierte Version HrpG* löst die konstitutive Expression aller HrpG-regulierten Gene aus und ermöglicht die Assemblierung eines funktionalen T3S-Systems unabhängig von der Wirtspflanze oder dem *in vitro*-Medium (Wengelnik *et al.* 1999). Dies schuf die Voraussetzung für die Etablierung von Typ III-abhängigen *in vitro*-Sekretionsbedingungen (Rossier *et al.* 1999). Die *hrpG**-Mutation von *Xcv* führt in der Pflanze zu einer beschleunigten Induktion von Krankheitssymptomen bzw. HR, aber zu keiner Änderung im bakteriellen Wachstum (Rossier *et al.* 1999; Wengelnik *et al.* 1999).

Organisation des *hrp*-Gencluster.

Das *hrp*-Gencluster von *Xcv* erfüllt alle charakteristischen Eigenschaften einer sogenannten Pathogenitätsinsel. Es zeichnet sich durch das Vorhandensein mehrerer Pathogenitäts-assoziiierter Gene, einen im Verhältnis zum übrigen Genom abweichenden G+C-Gehalt und der Anwesenheit flankierender mobiler genetischer Elemente aus. (Noël *et al.*, 2002). Das *hrp*-Gencluster umfasst ca. 25 Kb, beinhaltet mehr als 20 Gene und ist in mindestens acht Operonen organisiert. Das *hrp*-Gencluster kodiert neben strukturelle Komponenten auch Kontrollproteine des T3S-Systems und Effektorproteine. *Xcv hrp*-Mutanten lösen in suszeptiblen Pflanzen keine Krankheitssymptome aus und sind nicht mehr in der Lage, eine HR in resistenten Pflanzen zu induzieren (Bonas *et al.* 1991; Büttner *et al.* 2007; Weber *et al.* 2007). Elf *hrp*-Gene sind zwischen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konserviert und werden als *hrc* („*hrp* conserved“-)Gene bezeichnet. In pflanzenpathogenen Bakterien werden die *hrc*-Gene nach der Homologie mit dem jeweiligen *ysc*-Gen aus *Yersinia* bezeichnet (Bogdanove *et al.* 1996). Neben den *hrp*- und *hrc*-Genen gibt es so genannte *hpa*-Gene („*hrp*-associated“), die zur Pathogenität von *Xcv* beitragen, aber für eine HR-Induktion in resistenten Pflanzen nicht essentiell sind (Huguet *et al.* 1998; Büttner *et al.* 2004; Büttner *et al.* 2006). Die *hpa*-Gene kodieren häufig Kontrollproteine, welche meist einen modulierenden

oder regulierenden Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Interaktion ausüben (Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008b).

1.7.2 Hrc-Proteine – konservierte Kernkomponenten des T3S-Systems

Die unter Tier- und Pflanzenpathogenen konservierten Hrc-Proteine aus *Xcv* stellen vermutlich die strukturellen Kernkomponenten des T3S-Systems dar und bilden dessen Basalapparat aus (Abbildung 1.4). Mit wenigen Ausnahmen besitzen die Hrc-Proteine aus *Xcv* zusätzlich homologe Proteine im „flagellären“ T3S-System von tierpathogenen Bakterien (Nguyen *et al.* 2000; Aizawa 2001; Gophna *et al.* 2003; He *et al.* 2004; Tampakaki *et al.* 2004; Desvaux *et al.* 2006). Trotz intensiver Studien in pflanzenpathogenen Bakterien ist häufig die genaue Funktionsweise einzelner Komponenten des Basalapparates noch nicht detailliert geklärt. Aufgrund des gemeinsamen evolutionären Ursprungs der unterschiedlichen T3S-Systeme und der starken Konservierung der Kernkomponenten, werden in vielen Fällen jedoch vergleichbare Funktionen angenommen.

HrcC aus der Familie der Sekretine ist wahrscheinlich in der ÄM von *Xcv* lokalisiert und formt ringförmige Strukturen aus mehreren Untereinheiten, welche auf diese Weise eine Pore in der ÄM ausbilden (Wengelnik *et al.* 1996b; Koster *et al.* 1997; Burghout *et al.* 2004; Spreter *et al.* 2009). Dagegen sind die Proteine HrcJ, HrcD, HrcR, HrcS, HrcT, HrcV und HrcU vermutlich in der IM lokalisiert (Cornelis 2006; Yip und Strynadka 2006; Berger *et al.* 2010). Zum Beispiel wird das postulierte Lipoprotein HrcJ der YscJ-Familie zugeordnet, welche durch eine C-terminale transmembrane Domäne mit der periplasmatischen Seite der IM verankert und vermutlich am Aufbau der inneren Ringe des T3S-Systems beteiligt sind (Kubori *et al.* 1998; Tamano *et al.* 2000; Blocker *et al.* 2001; Silva-Herzog *et al.* 2008). So konnte für Mitglieder der YscJ-Familie gezeigt werden, dass diese supramolekulare Strukturen ausbilden und wahrscheinlich die ringförmigen Proteinkomplexe in der IM und ÄM Membran des T3S-Systems miteinander verbinden (Suzuki *et al.* 2004; Crepin *et al.* 2005; Yip *et al.* 2005). Die genaue Funktion von HrcD ist bisher weitestgehend unbekannt. HrcD besitzt neben einer transmembranen Domäne, eine zytoplasmatische sowie periplasmatische Domäne und spielt vermutlich während der Assemblierung des Hrp-Pilus eine wichtige Rolle (Berger *et al.* 2010). Ebenfalls sehr komplex ist die Membrantopologie von HrcR, HrcS und HrcT mit einer unterschiedlichen Anzahl an transmembranen, periplasmatischen und zytoplasmatischen Domänen (Berger *et al.* 2010). HrcR, HrcS und HrcT homologe Proteine aus dem „flagellären“ T3S-System sind wahrscheinlich am Aufbau des zentralen Exportkanal in der IM des T3S-System beteiligt (Aizawa 2001; Büttner 2012).

Zu den am stärksten konservierten Komponenten des T3S-Systems in der IM von *Xcv* gehören HrcV und HrcU. Studien zur Membrantopologie von HrcV ergaben in Übereinstimmung mit dem homologen Protein YscV aus *Y. pestis*, dass HrcV acht transmembrane Domänen und eine große C-terminale zytoplasmatische Domäne besitzt (Plano *et al.* 1991; Berger *et al.* 2010). Zusätzlich konnte in HrcV das aus FlhA (*Salmonella* spp.) bekannte zytoplasmatische FHIPEP-Motiv identifiziert werden, welches vermutlich eine wichtige Funktion beim Export von T3S-Substraten übernimmt (McMurry *et al.* 2004; Berger *et al.* 2010). Das HrcV Homolog FlhA des „flagellären“ T3S-Systems interagiert indes mit mehreren zytoplasmatischen und membranständigen Komponenten des Sekretionsapparates, wie z.B mit der C-terminalen Domäne des HrcU homologen Proteins FlhB (McMurry *et al.* 2004). HrcU ist ein Mitglied der bereits erwähnten FlhB/YscU-Familie (siehe 1.6.1 oben und Abbildung 1.2). HrcU besitzt neben vier transmembrane Domänen, eine C-terminale zytoplasmatische Domäne, welche sich durch das konserviertes NPTH-Motiv auszeichnet (Berger *et al.* 2010; Lorenz und Büttner 2011). Studien verwiesen darauf, dass HrcU ähnlich YscU innerhalb des konservierten NPTH-Motives zwischen dem Asparagin (N) und Prolin (P) gespalten wird (Lorenz and Büttner 2011). YscU aus *Yersinia* spp. ist in die zeitliche Regulation der Sekretion von Nadel- und Effektorproteinen involviert und für FlhB konnte gezeigt werden, dass es am Wechsel der Sekretion von Hakenkomponenten zu Filamentproteinen beteiligt ist (Hirano *et al.* 1994; Williams *et al.* 1996; Edqvist *et al.* 2003). Es wird für *Xcv* daher angenommen, dass HrcU als Mitglied der konservierten FlhB/YscU-Familie an einem Wechsel der Substratspezifität von „frühen“ zu „späten“ Substraten des T3S-Systems eine Schlüsselfunktion besitzt (Lorenz *et al.* 2008b; Lorenz and Büttner 2011) (Abbildung 1.4).

Die vorhergesagten C-Ring-Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-System werden durch Mitglieder YscQ-Familie gebildet (Morita-Ishihara *et al.* 2006; Spaeth *et al.* 2009). Mitglieder der YscQ-Familie, zu welcher HrcQ gehört, bilden vermutlich multimere Plattformen an der zytosolischen Seite der IM und dienen wahrscheinlich der Rekrutierung Typ III-abhängig sekretierter Proteine (Cornelis 2006; Morita-Ishihara *et al.* 2006; Spaeth *et al.* 2009; Lara-Tejero *et al.* 2011). Das YscQ homologe Protein Spa33 aus *S. flexneri*, ebenfalls ein zytoplasmatisches Protein, interagiert u.a. mit der T3S-assoziierten ATPase Spa47 (Morita-Ishihara *et al.* 2006). HrcN aus *Xcv* besitzt Homologie zur β -Untereinheit von F_0F_1 -ATPasen. Für HrcN aus *Xcv* konnte die Fähigkeit nachgewiesen werden, ATP *in vitro* zu hydrolysieren und an der Energetisierung des Sekretionsprozesses in *Xcv* entscheidend beteiligt zu sein (Lorenz *et al.* 2009). Die ATPasen FliI aus *Salmonella* spp. und YscN aus

Yersinia spp. interagieren mit den HrcL-homologen Proteinen FliH bzw. YscL, welche *in vitro* die ATPase-Aktivität regulieren (Minamino *et al.* 2000b; Blaylock *et al.* 2006; McMurry *et al.* 2006). Auf ähnliche Weise bindet HrcL aus *Xcv* an HrcN und beeinflusst so die Stabilität von HrcN (Lorenz and Büttner 2009). Ebenfalls zeigten Studien zu Protein-Protein Interaktionen, dass HrcN und HrcL an das IM-Protein HrcU binden können und unter sekretionsinduzierenden Bedingung spezifisch an der bakteriellen Membran lokalisiert sind (Lorenz and Büttner 2009).

1.7.3 Hrp-Proteine - Nicht-Effektorproteine und Komponenten des T3S-System

Sekretierte Nicht-Effektorproteine sind den nicht konservierten Komponenten des T3S-Systems zuzuordnen und stellen häufig Bestandteile extrazellulärer Strukturen des Sekretionsapparates dar (Tabelle 1.3 und Abbildung 1.4). So werden z.B. die essentiellen Pathogenitätsfaktoren HrpE, HrpF und HrpB2 selbst Typ III-abhängig sekretiert jedoch in der Regel nicht transloziert. HrpE wurde bereits als Hauptkomponente des Hrp-Pilus identifiziert und HrpF bildet vermutlich gemeinsam mit XopA den multimeren Translokonkomplex (Rossier *et al.* 2000; Büttner *et al.* 2002; Noël *et al.* 2002; Weber *et al.* 2005b). Ein weiteres sekretiertes Nicht-Effektorprotein ist HrpB2, für das eine Beteiligung am Aufbau extrazellulärer Strukturen des T3S-Systems vermutet wird. Die genaue Funktion von HrpB2 ist bisher noch weitestgehend ungeklärt (Rossier *et al.* 2000).

Tabelle 1.3: Beispiele von Nicht-Effektoren des T3S-Systems aus *Xcv*.

Protein	Typ III-abhängige Sekretion ^a	mögliche Funktion / Rolle	Referenz
HrpE	Ja	Hauptkomponente des Hrp-Pilus	(Weber und Koebnik 2005a; Weber <i>et al.</i> 2005b)
HrpB2	Ja	unbekannt; extrazelluläre Komponente des T3S-Systems	(Rossier <i>et al.</i> 2000; Lorenz <i>et al.</i> 2008b)
HrpF	Ja	putatives Translokonprotein	(Büttner <i>et al.</i> 2006; Lorenz <i>et al.</i> 2008b)
XopA [°]	Ja	putatives Translokonprotein	(Noël <i>et al.</i> 2002)

^a basierend auf *in vitro* Sekretionsstudien; [°] Xop: „Xanthomonas outer protein“

Der Pathogenitätsfaktor HrpB2

HrpB2 von *Xcv* ist ein sekretiertes 13,8 kDa-Protein, welches durch das zweite Gen des *hrpB*-Operons kodiert wird und essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist (Fenselau *et al.* 1995; Rossier *et al.* 2000; Lorenz *et al.* 2008b). Die Sekretion von HrpB2 ist in *Xcv*-Wildtypstämmen jedoch sehr gering und wird durch das zytoplasmatische Exportkontroll- und T3S4-Protein HpaC (siehe 1.7.4 unten) negativ reguliert (Lorenz *et al.* 2008b). HrpB2 aus *Xcv* ist zwingend erforderlich für die Bildung des Hrp-Pilus, der Sekretion extrazellulärer Komponenten wie HrpF, XopA und HrpE sowie der Sekretion von Effektorproteinen (Rossier *et al.* 2000; Lorenz *et al.* 2008b). Aus diesen Gründen wird angenommen, dass HrpB2 während der Assemblierung des Sekretionsapparates als eines der ersten Substrate das T3S-System passiert und am Aufbau des Hrp-Pilus entscheidend beteiligt ist (Weber *et al.* 2005b; Lorenz *et al.* 2008b). Zu Beginn dieser Arbeit deuteten Studien darauf hin, dass die N-terminale Region von HrpB2 für die Funktion essentiell ist und vermutlich ein funktionales T3S-Signal enthält (Lorenz *et al.* 2008b). Durch Komplementationsstudien und *in vitro* Sekretionsanalysen konnte gezeigt werden, dass ein HrpB2-Derivat mit einer Deletion der Aminosäuren 10 bis 25 weder sekretiert wird noch eine *hrpB2*-Deletionsmutante komplementiert (Lorenz *et al.* 2008b). Jedoch wurden bisher keine am T3S-Signal spezifisch beteiligten Aminosäuren identifiziert. Auch konnte bis zum Beginn dieser Arbeit nicht klar gezeigt werden, ob ein intaktes T3S-Signal in HrpB2 für die Funktion essentiell ist und direkt die Pathogenität von *Xcv* unterstützt. Es ist ebenso unbekannt, auf welche Art und Weise HrpB2 die generelle Typ III-abhängige Sekretion in *Xcv* fördert und welche Funktion HrpB2 vermutlich beim Aufbau des Sekretionsapparates besitzt. Interessanterweise gab es erste experimentelle Daten, dass HrpB2 spezifisch an das T3S-Kontrollprotein HpaC bindet und beide gemeinsam mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von HrcU interagieren, welche vermutlich eine wichtige Rolle beim Wechsel (siehe 1.6.1 und 1.7.2 oben) von „frühen“ zu „späten“ Substraten des T3S-Systems spielt (Alegria *et al.* 2004; Lorenz *et al.* 2008b; Schulz *et al.* 2011).

HrpB2 ist lediglich unter den Gattungen *Xanthomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Acidovorax* spp. und *R. solanacearum* konserviert. Jedoch konnte bisher für keines der HrpB2 homologen Proteinen eine klare Funktion zugeordnet werden. Durch vergleichende Sequenzanalysen der HrpB2-Homologen wurden jedoch konservierte Aminosäuremotive in der zentralen Region (FQALM) sowie C-terminalen Region (TLKMNQ) von HrpB2 aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) identifiziert (Cappelletti *et al.* 2011). HrpB2 aus *Xac* (HrpB2^{*Xac*}) ist ähnlich wie HrpB2 aus *Xcv* ein kleines sekretiertes Protein, welches für die Pathogenität von *Xac*

essentiell ist. Studien über HrpB2^{Xac} zeigten zudem, dass das konservierte TLKMNQ-Motiv für die Pathogenität von *Xac* wichtig ist (Cappelletti *et al.* 2011). Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch nicht bekannt, ob die in HrpB2^{Xac} identifizierten Motive ebenfalls für HrpB2 aus *Xcv* von Bedeutung sind.

Aufgrund der zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Daten wurden mehrere Hypothesen für die Rolle von HrpB2 aus *Xcv* entwickelt. Eine mögliche Funktion von HrpB2 wäre die Assemblierung einer „inner-rod“, ähnlichen Struktur innerhalb des Basalapparates des T3S-Systems, welche z.B. für die Proteine PrgJ aus *S. enterica* und YscI aus *Y. pseudotuberculosis* angenommen wird (Abbildung 1.4) (Marlovits *et al.* 2004; Wood *et al.* 2008). Zum Beispiel wird die Sekretion der beschriebenen putativen „inner rod“-Proteine PrgJ und YscI ebenfalls durch T3S-Kontrollproteine reguliert. Studien zeigten, dass die Sekretion von PrgJ abhängig vom regulatorischen T3S4-Protein InvJ ist und die Sekretion von YscI durch das T3S4-Protein YscP kontrolliert wird. Da der „inner rod“ vermutlich zur stabilen Verankerung extrazellulärer Strukturen erforderlich ist, könnte HrpB2 so die Sekretion später T3S-Substrate fördern und auf diese Weise die Pathogenität von *Xcv* unterstützen (Sukhan *et al.* 2003; Marlovits *et al.* 2004; Marlovits *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008). Es ist für HrpB2 aber ebenso denkbar, dass vergleichbar der postulierten Funktion des PrgJ homologen Proteins MxiI aus *S. flexneri*, HrpB2 eine Komponente ähnlich der „cap“-Struktur oder des „tip“-Komplexes an der Spitze des Hrp-Pilus bildet und auf diese Weise eine Verbindung zum Translokon herstellt (Abbildung 1.4) (Ohnishi *et al.* 1994; Blocker *et al.* 2001; Mueller *et al.* 2008). Auch besteht durchaus die Möglichkeit, dass HrpB2 in *Xcv* gemeinsam mit dem Pilusprotein HrpE direkt an der Assemblierung des Hrp-Pilus beteiligt ist (Abbildung 1.4) (Weber *et al.* 2005b). In pflanzenpathogene Bakterien konnte bisher weder die Existenz einer „inner rod“ Struktur noch die Anwesenheit eines „cap“- oder „tip“-Komplexes gezeigt werden, zudem ist es für *Xcv* nicht bekannt mit welchem Zweck und über welchen Mechanismus die Sekretion von HrpB2 durch HpaC supprimiert wird.

1.7.4 Hpa-Proteine – regulatorische Kontrollproteine des T3S-System

Vergleichbar zu tierpathogenen Bakterien ist in pflanzenpathogenen Bakterien die vollständige Assemblierung extrazellulärer Strukturen des Sekretionsapparates (z.B. der Hrp-Pilus oder das Translokon) Voraussetzung für die Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle. Daher erfolgt vermutlich auch in *Xcv* die Sekretion verschiedener Substrate des T3S-Systems schrittweise und nach einem zeitlich kontrollierten Prozess. In diesem Prozess sind vermutlich mehrere T3S-Kontrollproteine involviert (Tabelle 1.4). HpaB, ein globales

T3S-Chaperon, fördert die effiziente Sekretion und Translokation indem HpaB wahrscheinlich die Rekrutierung von Effektoren an die T3S-assoziierte ATPase HrcN reguliert (Büttner *et al.* 2004; Büttner *et al.* 2006; Lorenz and Büttner 2009). Die Rekrutierung von Effektoren erfolgt vermutlich durch eine direkte Bindung der Effektoren. Es konnte gezeigt werden, dass HpaB mit verschiedensten Effektorproteinen *in vitro* interagiert (Büttner *et al.* 2004). Zusätzlich konnte durch *in vivo*-Translokationsanalysen gezeigt werden, dass HpaB in unterschiedlichem Maße zur Translokation von Effektorproteinen beiträgt und die Effektoren in Abhängigkeit einer HpaB vermittelten (Klasse A) oder unabhängigen Translokation (Klasse B) unterteilt werden können. Zusätzlich wird die Aktivität von HpaB durch das regulatorische Protein HpaA kontrolliert, welches vermutlich eine doppelte Funktion als Effektor- und T3S-Kontrollprotein besitzt (Lorenz *et al.* 2008a). Der Virulenzfaktor HpaA aus *Xcv* wird selbst durch das T3S-System sekretiert und zusätzlich in die Pflanzenzelle transloziert. HpaA fördert zudem die Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen. Eine Interaktion von HpaA und HpaB konnte bereits nachgewiesen werden und ermöglicht vermutlich die Sekretion extrazellulärer Komponenten des T3S-Systems (Lorenz *et al.* 2008a). Es wird vorgeschlagen, dass die Sekretion von HpaA zur Ablösung von HpaB führt und dieser Zustand die Sekretion von Effektorproteinen, nach der vollständigen Assemblierung des Sekretionsapparates, fördert (Lorenz *et al.* 2008a). Interaktionsstudien zeigten indes, dass HpaB zusätzlich an das zytoplasmatische Protein HpaC bindet, welches ein weiteres T3S-Kontrollprotein (siehe unten) darstellt (Büttner *et al.* 2004; Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008a).

Tabelle 1.4: Beispiele ausgewählter Hpa-Proteine aus *Xcv*.

Protein	Typ III-abhängige Sekretion ¹	Interaktion ² u.a. mit	Mögliche Funktion / Rolle ³	Referenz
HpaA	Ja	HpaB, HpaC	regulatorisches Protein; unterstützt Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen	(Huguet <i>et al.</i> 1998; Lorenz <i>et al.</i> 2008a) C.L. unpubliziert
HpaB	Nein	Effektoren, HrcN, HrcU, HrcV, HpaA, HpaC	generelles T3S-Chaperon; unterstützt Sekretion und Translokation von Effektorproteinen	(Büttner <i>et al.</i> 2004; Büttner <i>et al.</i> 2006; Lorenz und Büttner 2009)
HpaC	Nein	Effektoren, HrcN, HrcU _C ⁴ , HpaB, HrpB2	T3S4-Protein; beteiligt am Wechsel der Substratspezifität; unterstützt Sekretion von Translokon- und Effektorproteine, supprimiert Sekretion von HrpB2	(Büttner <i>et al.</i> 2006; Lorenz <i>et al.</i> 2008b)

basierend ¹ auf *in vitro* Sekretionsstudien; ² bzw. auf *in vitro* Interaktionsstudien; ³ vorhergesagte bzw. angenommene Funktion ⁴ HrcU_C: zytoplasmatische C-terminalen Domäne von HrcU

Das Exportkontrollprotein HpaC – ein T3S4-Protein aus *Xcv*

Durch Analysen von *Xcv*-Mutanten wurde *hpaC* als wichtiger Virulenzfaktor identifiziert. Es fördert das bakterielle Wachstum in suszeptiblen Wirtspflanzen und ist für eine effektive HR-Induktion in resistenten Pflanzen essentiell (Büttner *et al.* 2006). HpaC wird vermutlich nicht selbst sekretiert, ist aber für die effektive Sekretion und Translokation von verschiedenen Effektoren essentiell. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass HpaC für die Sekretion der Translokationsproteine HrpF und XopA von *Xcv* benötigt wird. Im Gegensatz dazu scheint HpaC aber keinen Einfluss auf die Sekretion des Hrp-Pilus-Proteins HrpE zu besitzen. Als Kontrollprotein inhibiert HpaC zusätzlich die Sekretion des „frühen“ T3S-Substrates HrpB2, während es die Sekretion der „späten“ T3S-Substrate wie z.B. Translokations- und Effektorproteinen fördert (Rossier *et al.* 2000; Weber *et al.* 2005b; Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008b). Demnach hat HpaC aus *Xcv* einen differentiellen Einfluss auf die Sekretion von „frühen“ und „späten“ T3S-Substraten und induziert vergleichbar mit bekannten T3S4-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien vermutlich einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems von *Xcv* (Lorenz *et al.* 2008b; Lorenz und Büttner 2011). Studien zeigten zudem, dass HpaC mit der C-terminalen Domäne von HrcU (siehe 1.7.2 oben) interagiert (Lorenz *et al.* 2008b). Im Gegensatz dazu konnte die Interaktion mit dem vollständigen HrcU nicht nachgewiesen werden (Lorenz *et al.* 2008b). Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen HpaC und HrcU von einer bestimmten Konformation der C-terminalen Domäne von HrcU abhängt und diese wahrscheinlich im Kontext des vollständigen HrcU verändert vorliegt (Lorenz *et al.* 2008b). Weiterhin wurde anschaulich demonstriert, dass die Interaktion von HpaC und der C-terminalen Domäne von HrcU maßgeblich durch das in HrcU konservierte NPTH-Motiv vermittelt wird und hierbei die proteolytische Spaltung des NPTH-Motivs eine wesentliche Rolle für die strukturelle Reorganisation der C-terminalen Domäne von HrcU spielt. Gemeinsam mit HpaC induziert die Konformationsänderung der C-terminalen Domäne von HrcU vermutlich einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems in *Xcv* von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten (Lorenz und Büttner 2011). Die mögliche Funktion von HpaC als T3S4-Protein wird durch die Tatsache unterstützt, dass das homologe Protein HpaP aus *R. solanacearum* ähnlich wie HpaC konservierte Aminosäuren und strukturelle Ähnlichkeiten in der unter T3S4-Proteinen konservierten T3S4-Domäne aus dem tierpathogenen Modellsystem besitzt (Van Gijsegem *et al.* 2002; Agrain *et al.* 2005a; Lorenz *et al.* 2008b).

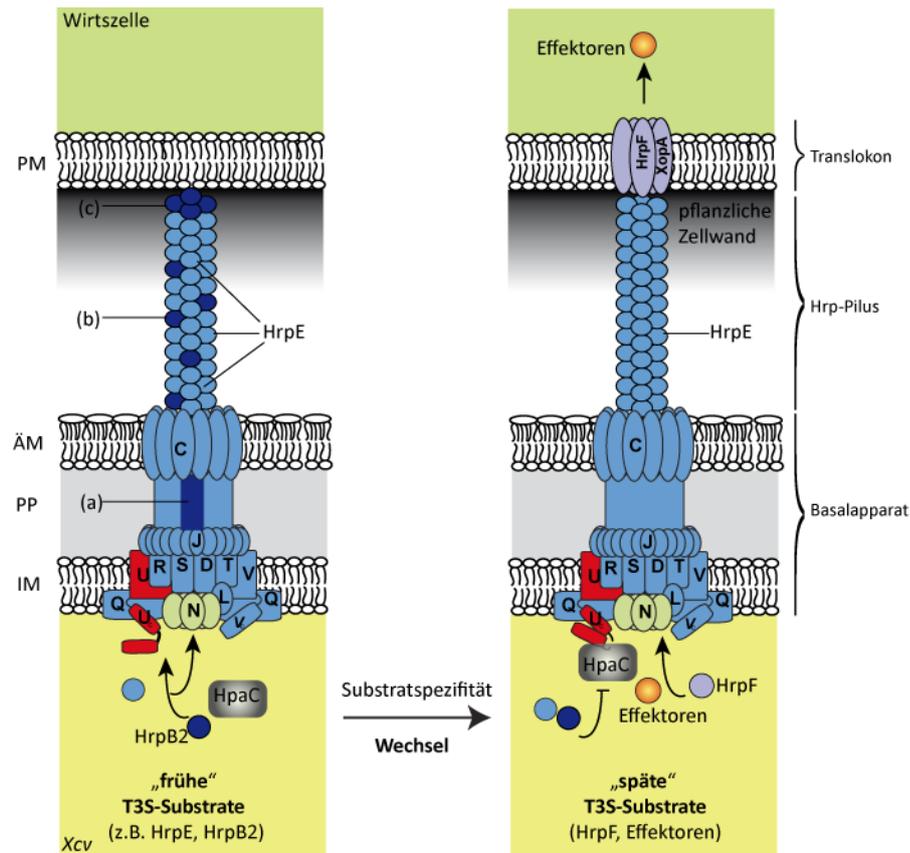


Abbildung 1.4: Das T3S-System und der Wechsel von "frühen" zu "späten" T3S-Substraten in *Xcv*.

Die Abbildung zeigt konservierte (Hrc-Proteine) und nicht-konservierte Komponenten (Hrp- und Hpa-Proteine) des T3S-Systems aus *Xcv*, sowie ein vereinfachtes Modell des HrcU/HpaC vermittelten Wechsels der Substratspezifität. Der Basalapparat des T3S-Systems von *Xcv* wird von den konservierten Proteinen HrcC, D, J, L, N, Q, R, S, T, U und V gebildet. Der Hrp-Pilus ist aus Untereinheiten von HrpE aufgebaut. Das Translokon besteht vermutlich aus HrpF und XopA. Die mögliche Funktion des Pilusproteins und „frühen“ T3S-Substrates HrpB2 ist noch nicht geklärt. HrpB2 könnte (a) innerhalb des Basalapparates als „inner rod“-ähnliches Protein einen zentrale Struktur bilden und auf diese Weise zur stabilen Verankerung extrazellulärer Komponenten dienen oder (b) gemeinsam mit HrpE eine Untereinheit des Hrp-Pilus stellen bzw. (c) einen „cap“ oder „tip“-ähnlichen Komplex an der Spitze des Hrp-Pilus ausbilden um so eine Verbindung zum Translokon herzustellen. Die Sekretion „früher“-T3S-Substrate (extrazellulären Komponenten des T3S-Systems wie z.B. HrpE und HrpB2) ist Voraussetzung für die Sekretion bzw. Translokation „später“ T3S-Substraten (z.B. HrpF und Effektoren). Der Wechsel von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten wird in *Xcv* vermutlich u.a. durch das konservierte, in der inneren bakteriellen Membran verankerte HrcU und das regulatorische T3S4-Protein HpaC vermittelt. Die autokatalytische Spaltung der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne von HrcU (HrcU_C) und die Interaktion mit HpaC resultiert vermutlich in einer strukturellen Reorganisation von HrcU_C. Dies führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung von HrcU_C und induziert gemeinsam mit HpaC den Wechsel in der Substratspezifität des T3S-Systems von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten, wie z.B. Translokon- und Effektorproteine. IM = innere Membran, PP = Periplasma, ÄM = äußere Membran, PM = Plasmamembran. Abbildung modifiziert nach (Büttner und He 2009).

1.8 Zielstellung dieser Arbeit

1.8.1 Charakterisierung funktionaler Regionen von HrpB2

Bislang ist nicht vollständig aufgeklärt, in wieweit die Sekretion von HrpB2 für die Pilusbildung und Typ III-abhängige Sekretion erforderlich ist. Wie genau HrpB2 die Typ III-abhängige Sekretion von *Xcv* unterstützt und welche Funktion HrpB2 während der Assemblierung des Sekretionsapparates übernimmt ist ebenfalls unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten am T3S-Signal beteiligte Aminosäurereste identifiziert und die C-terminale Region von HrpB2 funktional analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten durch eine gerichtete Mutagenese HrpB2-Derivate mit Deletionen sowie Punktmutationen erstellt und diese mittels Infektionsstudien, Sekretionsanalysen und Protein-Protein Interaktionsstudien hinsichtlich ihrer Proteinfunktion überprüft werden. Zusätzlich sollten durch Lokalisierungsstudien von HrpB2 in *Xcv* weitere Hinweise für eine mögliche Funktion als extrazelluläre Pilus- oder „inner-rod-Komponente des T3S-Systems“ gewonnen werden.

1.8.2 Charakterisierung des T3S4-Proteins HpaC

Die durch HpaC regulierte Sekretion von „frühen“ und „späten“ T3S-Substraten lässt darauf schließen, dass HpaC aus *Xcv* möglicherweise ähnlich dem Mechanismus von T3S4-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien einen Wechsel der Spezifität der Substrate des T3S-Systems induziert. Um weitere Hinweise für die Funktion von HpaC in *Xcv* zu erhalten, sollte HpaC auf molekularer Ebene charakterisiert und in *Xcv* funktional analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Regionen und Aminosäuren an der Funktion von HpaC und der möglichen Kontrolle des Wechsels der Substratspezifität des T3S-Systems von *Xcv* beteiligt sind. Im Fokus der experimentellen Arbeiten lag dabei die vorhergesagte T3S4-Domäne aus HpaC, welche vermutlich gemeinsam u.a. mit dem konservierten IM-Protein HrcU am Wechsel der Substraterkennung des T3S-Systems beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2.1 bzw. Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Kultivierung der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme erfolgte in „Lysogeny Broth“ (LB) Medium bei 37°C über Nacht (Miller 1972) (Tabelle 2.3). *Xcv*-Stämme wurden in „Nutrient-Yeast-Glycerol“ (NYG) Medium bei einer Temperatur von 30°C ebenfalls über Nacht angezogen (Daniels *et al.* 1984) (Tabelle 2.3). Für Sekretionsanalysen erfolgte die Kultivierung der *Xcv*-Stämme bei 30°C über Nacht in Minimalmedium A (MA) (Rahme *et al.* 2000) (Tabelle 2.3). Plasmide wurden in *E. coli* durch chemische Transformation (2.1.1 unten) und in *X. campestris* pv. *vesicatoria* durch triparentale Konjugation (2.1.2 unten) unter Verwendung von pRK2013 als Helferplasmid eingeführt (Figurski *et al.* 1979). Antibiotika wurden, wenn nicht anders beschrieben, in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Rifampicin 100 µg/ml, Gentamycin µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml und Chloramphenicol 5 µg/ml. Feste Medien enthielten 1,5% (w/v) Agar bzw. 1% (w/v) für Konjugationen. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurde 0,004% (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) als chromogenes Substrat für das Enzym β-Galactosidase zugesetzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
HB101 (pRK2013)	Helferstamm für die Konjugation; pRK2013 trägt <i>tra</i> -Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates	(Boyer <i>et al.</i> 1969)
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> ; Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> ; <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> ; <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH
BL21(DE3)	F <i>ompT</i> <i>hsdS</i> ₂₀ (<i>r_b m_b</i>) <i>gal</i>	Stratagene
DH5α(λpir)	<i>recA</i> <i>hsdR17</i> (<i>rK mK</i> ⁺) φ80 <i>dlaCZ</i> <i>M15</i> [λpir]	(Ménard <i>et al.</i> 1993)
<i>Xcv</i>		
85-10	Wildtyp (WT); Paprika-Tomatenrasse 2, Gruppe A; exprimiert <i>avrBs1</i>	(Canteros 1990)
85-10Δ <i>hrpB2</i>	85-10-Derivat; chromosomale Deletion von <i>hrpB2</i>	(Kousik <i>et al.</i> 1998; Rossier <i>et al.</i> 2000)
85-10Δ <i>hpaC</i>	85-10-Derivat; chromosomale Deletion von <i>hpaC</i>	(Buttner <i>et al.</i> 2006)
85*	85-10-Derivat; Punktmutation in <i>hrpG</i> (<i>hrpG*</i>) resultiert in konstitutiver Expression der <i>hrp</i> -Gene	(Nennstiel <i>et al.</i> 2000)
85*Δ <i>hrpB2</i>	85*-Derivat; chromosomale Deletion von <i>hrpB2</i>	(Rossier <i>et al.</i> 2000)
85*Δ <i>hpaC</i>	85*-Derivat; chromosomale Deletion von <i>hpaC</i>	(Buttner und Bonas 2006)
85*Δ <i>hpaC</i> Δ <i>hrpB2</i>	85*-Derivat; chromosomale Deletion von <i>hpaC</i> und <i>hrpB2</i>	(Hartmann <i>et al.</i> 2012)

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pRK2013	ColE1-Replicon, TraRK ⁺ , Mob ⁺	(Figurski and Helinski 1979)
pUC119	ColE1-Replicon, Ap ^r	(Vieira <i>et al.</i> 1987)
pBlueskript(II) KS	Phagemid, pUC Derivat; Ap ^r	Stratagene
pDSK602	Expressionsvektor; 3x <i>lacUV5</i> Promotor; Tra ⁻ Mob ⁺	(Murillo <i>et al.</i> 1994)
pDSK604	pDSK602-Derivat mit modifiziertem Polylinker	(Escolar <i>et al.</i> 2001)
pDGW4M	GATEWAY [®] -kompatibles pDSK602-Derivat mit vierfacher c-Myc-Epitop-kodierender Sequenz; enthält <i>attR</i> -Rekombinationssequenzen; Sm ^r	(Lorenz <i>et al.</i> 2008a)
pLAFR3	<i>rlxRK2⁺</i> ; <i>repRK⁺</i> ; <i>lacZ</i> ; <i>incP-I</i> ; Tra ⁻ Mob ⁺	(Napoli <i>et al.</i> 1987)
pENTR/D-TOPO	"ENTRY"-Vektor für GATEWAY [®] -Klonierungen; enthält <i>attL</i> -Rekombinationssequenzen; Km ^r	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pGEX-2TKM	GST-Expressionsvektor; P _{tac} GST <i>lac Iq</i> pBR322 <i>ori</i> Ap ^r	Stratagene, (Escolar <i>et al.</i> 2001)
pGBR1MCS-5	"Broad-host-range" Vektor"; <i>lac</i> Promotor; Gm ^r	(Kovach <i>et al.</i> 1995)
pUC57ΔBsaI	pUC57-Derivat mit mutierten <i>BsaI</i> Erkennungsstellen	(Morbitzer <i>et al.</i> 2011)
pBRM	Golden Gate- kompatibles pBR1MCS-5 Derivat	(Szczesny <i>et al.</i> 2010)
pBRMhrcU ₂₆₅₋₃₅₇	pBRM-Derivat zur Expression von HrcU ₂₆₅₋₃₅₇ -c-Myc	(Lorenz und Büttner 2011)
pBRMhrpB1	pBRM-Derivat zur Expression von HrpB1-c-Myc	Hausner, unpubliziert
pDGW4MhpaC	pDGW4M-Derivat zur Expression von HpaC-c-Myc	(Schulz und Büttner 2011)
pGhpaC	pGEX-2TKM-Derivat zur Expression von GST-HpaC	(Büttner <i>et al.</i> 2006)
pLhpaC _{Δ2-111}	pLAFR3-Derivat zur Expression von HpaC _{Δ2-111} -c-Myc	
pGhrcU ₂₅₅₋₃₅₇	pGEX-2TKM-Derivat zur Expression von GST-HrcU ₂₅₅₋₃₅₇	(Lorenz <i>et al.</i> 2008b)

Ap, Ampicillin; Km, Kanamycin; Rif, Rifampin; Sm, Spectinomycin; Gm, Gentamicin; ^rresistent.

Tabelle 2.3: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung
LB	1% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5% (w/v) NaCl; pH 7,5
NYG	0,5% (w/v) Bakto-Pepton; 0,3% (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,2% (w/v) Glycerin
SOC	2% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,05% (w/v) NaCl; 20 mM Glucose
MA	60 mM K ₂ HPO ₄ ; 33 mM KH ₂ PO ₄ ; 7,6 mM (NH ₄)SO ₄ ; 1,7 mM Natriumcitrat; 1 mM Mg ₂ SO ₄ ; 10 mM Saccharose; 0,3% (w/v) Casaminsäuren; pH 7,0

(LB) Lysogeny Broth", (NYG) „Nutrient-Yeast-Glycerol“(MA) Minimalmedium A (SOC) "Super Optimal Broth"

2.1.1 Chemische Transformation von *E. coli* und Herstellung kompetenter Zellen

Eine Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen (Top10, Invitrogen, Karlsruhe) wurde in frischem LB-Medium verdünnt (1:100) und bei einer Temperatur von 37°C für ca. 2,5 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Mit einem Photometer wurde die optische Dichte der Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in regelmäßigen Abständen gemessen. Bei einer OD_{600} von 0,4 bis 0,5 wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in vorgekühltem TFBI-Puffer (30 mM KOAc, pH 5,8; 50 mM $MnCl_2$; 100 mM RbCl; 10 mM $CaCl_2$; 15% (v/v) Glycerol) resuspendiert, für wenige Minuten auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in Puffer TFBII (10 mM NaMops, pH 7,0; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerol) wurden die Zellen aliquotiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) bei -80°C gelagert. Für die chemische Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Ein Aliquot von 50-100 μ l dieser chemisch kompetenten Zellen wurden mit 5-20 μ l des Ansatzes mit dem zu transferierendem Plasmid, für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 42 s bei 42°C und die Inkubation für 45-60 s auf Eis. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz in 1 ml SOC-Medium bzw. alternativ in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen und das Pellet nach Resuspension auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

2.1.2 Triparentale Konjugation von *Xanthomonas*

Der Transfer von Plasmiden aus *E. coli* in *Xanthomonas* erfolgte mittels triparentaler Konjugation (Figurski and Helinski 1979; Ditta *et al.* 1980; Huguet *et al.* 1998). Dazu wurden der *E. coli*-Donorstamm, der das zu konjugierende Plasmid enthielt, der *E. coli*-Helferstamm HB101 (pRK2013) und der *Xcv*-Rezipientenstamm auf ihren erwähnten Nährmedien (2.1 oben) angezogen, nachfolgend im Verhältnis 1:1:2 auf einer 1% (w/v) NYG-Agarplatte gemischt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden am darauffolgenden Tag in 800 μ l NYG-Medium aufgenommen und mindestens 200 μ l dieser Bakteriensuspension in verschiedenen Verdünnungsstufen auf selektive 1,5% (w/v) NYG-Agarplatten ausplattiert.

2.2 Pflanzenmaterial und Pflanzeninokulation

Für Infektionsstudien mit *Xcv*-Stämmen wurden Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) der nahezu isogenen Linien „Early Californian Wonder“ (ECW) und ECW-10R inokuliert (Kousik und Ritchie 1998), 1998; (Minsavage *et al.* 1990). ECW-10R-Pflanzen exprimieren das Resistenzgen *Bsl*, welches die HR nach Erkennung des Effektorproteins AvrBs1 induziert (Minsavage *et al.* 1990). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Standardbedingungen im Gewächshaus bei einer Temperatur von 26°C, 65% Luftfeuchtigkeit und einer Photoperiode von 16 h. Die *Xcv*-Stämme wurden nach Anzucht auf NYG-Agar-Medium in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und in Konzentrationen von 2×10^7 Zellen/ml (OD₆₀₀ = 0,02) bis 4×10^8 Zellen/ml (OD₆₀₀ = 0,4) mit einer nadellosen Spritze in die Unterseite der Paprikablätter inokuliert (Bonas *et al.* 1991). Nach der Infektion wurden die Pflanzen in eine Phytokammer (Percival Scientific, Series 101) überführt. Die Inkubation in der Phytokammer erfolgte bei einer relativen Luftfeuchte von 80%, konstantem 16 h Tag- / 8 h Nachtrhythmus und einer Tages- bzw. Nachttemperatur von 28°C bzw. 26°C. Zur Verdeutlichung der HR wurden die Blätter in 70%-igen Ethanol bei 60°C gebleicht. Die Infektionsstudien wurden mindestens dreimal in unabhängigen Experimenten durchgeführt.

2.3 Erstellung von Expressionskonstrukten

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Expressionskonstrukte sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Expressionskonstrukte.

Plasmid	Vektor	kodiertes Protein
pBRMhrpB2	pBRM	HrpB2
pBRMhrpB2 ₀₆₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₀₆₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₀₇₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₀₇₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₀₈₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₀₈₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₀₉₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₀₉₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₁₀₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₁₀₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₁₁₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₁₁₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₁₂₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₁₂₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₂₁₋₁₃₀	pBRM	HrpB2 ₂₁₋₁₃₀
pBRMhrpB2 ₀₁₋₉₀	pBRM	HrpB2 ₀₁₋₉₀
pBRMhrpB2 ₀₉₋₉₀	pBRM	HrpB2 ₀₉₋₉₀
pBRMhrpB2 ₁₀₋₉₀	pBRM	HrpB2 ₁₀₋₉₀
pBRMhrpB2 ₁₁₋₉₀	pBRM	HrpB2 ₁₁₋₉₀
pBRMhrpB2 ₂₁₋₉₀	pBRM	HrpB2 ₂₁₋₉₀
pBRMhrpB2 _{01-90Δ10-25}	pBRM	HrpB2 _{01-90Δ10-25}
pBRMhrpB2 _{01-90Δ12-25}	pBRM	HrpB2 _{01-90Δ12-25}
pBRMhrpB2 _{01-90Δ16-25}	pBRM	HrpB2 _{01-90Δ16-25}
pBRMhrpB2 _{01-90Δ13-22}	pBRM	HrpB2 _{01-90Δ13-22}

Plasmid	Vektor	kodiertes Protein
pBRMhrpB2 ₀₁₋₁₂₂	pBRM	HrpB2 ₀₁₋₁₂₂
pBRMhrpB2 _{Δ123-128}	pBRM	HrpB2 _{Δ123-128}
pBRMhrpB2 _{V123A}	pBRM	HrpB2 _{V123A}
pBRMhrpB2 _{T125A}	pBRM	HrpB2 _{T125A}
pBRMhrpB2 _{L126A}	pBRM	HrpB2 _{L126A}
pBRMhrpB2 _{K128A}	pBRM	HrpB2 _{K128A}
pBRMhrpB2-c-myc	pBRM	HrpB2-c-Myc
pBRMhrpB2-flag	pBRM	HrpB2-Flag
pBRMprgJ	pBRM	PrgJ
pBRMprgJ-c-myc	pBRM	PrgJ-c-myc
pBRMyscl	pBRM	Yscl
pBRMyscl-c-myc	pBRM	Yscl-c-myc
pGhrpB2	pGEX-2TKM	GST-HrpB2
pGhrpB2 ₀₁₋₉₀	pGEX-2TKM	GST-HrpB2 ₀₁₋₉₀
pGhrpB2 ₉₀₋₁₃₀	pGEX-2TKM	GST-HrpB2 ₉₀₋₁₃₀
pGhrpB2 ₀₁₋₁₂₂	pGEX-2TKM	GST-HrpB2 ₀₁₋₁₂₂
pDGW4MhpaC	pDGW4M	HpaC-c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ2-11}	pDGW4M	HpaC _{Δ2-11} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ12-21}	pDGW4M	HpaC _{Δ12-21} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ22-31}	pDGW4M	HpaC _{Δ22-31} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ32-41}	pDGW4M	HpaC _{Δ32-41} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ42-51}	pDGW4M	HpaC _{Δ42-51} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ62-71}	pDGW4M	HpaC _{Δ62-71} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ72-81}	pDGW4M	HpaC _{Δ72-81} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ82-91}	pDGW4M	HpaC _{Δ82-91} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ92-101}	pDGW4M	HpaC _{Δ92-101} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ102-111}	pDGW4M	HpaC _{Δ102-111} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ112-121}	pDGW4M	HpaC _{Δ112-121} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ122-131}	pDGW4M	HpaC _{Δ122-131} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ132-141}	pDGW4M	HpaC _{Δ132-141} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ142-151}	pDGW4M	HpaC _{Δ142-151} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ152-161}	pDGW4M	HpaC _{Δ152-161} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ162-171}	pDGW4M	HpaC _{Δ162-171} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ172-181}	pDGW4M	HpaC _{Δ172-181} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ182-191}	pDGW4M	HpaC _{Δ182-191} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ192-201}	pDGW4M	HpaC _{Δ192-201} -c-Myc
pDGW4MhpaC _{Δ202-212}	pDGW4M	HpaC _{Δ202-212} -c-Myc
pBRMhpaC	pBRM	HpaC-c-Myc
pBRMhpaC _{Δ62-91}	pBRM	HpaC _{Δ62-91} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ42-101}	pBRM	HpaC _{Δ42-101} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ164-168}	pBRM	HpaC _{Δ164-168} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ171-175}	pBRM	HpaC _{Δ171-175} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ2-111}	pBRM	HpaC _{Δ2-111} -c-Myc
pBRMhpaC _{L164A}	pBRM	HpaC _{L164A} -c-Myc
pBRMhpaC _{L171A}	pBRM	HpaC _{L171A} -c-Myc
pBRMhpaC _{L173A}	pBRM	HpaC _{L173A} -c-Myc
pBRMhpaC _{F175A}	pBRM	HpaC _{F175A} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ2-111,L171A}	pBRM	HpaC _{Δ2-111,L171A} -c-Myc
pBRMhpaC _{Δ2-111,F175A}	pBRM	HpaC _{Δ2-111,F175A} -c-Myc

2.3.1 „Blunt-End“-Subklonierung von PCR-Fragmenten

Für „Blunt-end“-Klonierungen von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pUC57ΔBsaI (Morbitzer *et al.* 2011) verwendet, welcher ein Ampicillin-Resistenzgen sowie ein *lacZ*-Gen enthält. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *SmaI* (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot), welches an der Erkennungssequenz 5'-CCC[^]GGG-3' glatte Enden herstellt, kann der Vektor pUC57ΔBsaI linearisiert werden. Das gewünschte Gen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt anschließend „Blunt-End“ in den zuvor linearisierten Vektor pUC57ΔBsaI kloniert. Die Reaktion wurde in Temperaturzyklus-Steuergeräten (FlexCycler, Analytik Jena AG, Jena) für eine Stunde bei 30°C inkubiert und für 10 min bei 65°C abgestoppt. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf LB-Nähragarplatten mit Ampicillin und dem Substrat der β-Galaktosidase X-Galaktose ausplattiert. Zur Identifizierung potentiell positiver Klone wurden weiße Kolonien am folgenden Tag mittels Kolonie-PCR analysiert.

2.3.2 „Golden Gate“-Klonierung von PCR-Fragmenten

Die „Golden Gate“-Klonierung ermöglicht unter Benutzung eines Typ II-Restriktionsenzym die Klonierung von DNA-Fragmenten in einem Ein-Schritt-Verfahren (Engler *et al.* 2008). Durch die besonderen Eigenschaften von Typ II-Restriktionsenzymen, wie z.B. *BsaI*, kann die Restriktion vom Zielvektor bzw. DNA-Fragment und die anschließende Ligation gemeinsam in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden. *BsaI* gehört zu den Typ II-Restriktionsenzymen und schneidet außerhalb seiner Erkennungssequenz 5'-GGTCTC-3, wobei ein Überhang von vier Nukleotiden entsteht. Nach einer *BsaI*-Restriktion werden die Erkennungssequenzen entfernt und das DNA-Fragment weist einen 4-Nukleotid-Überhang an beiden Enden auf. Durch das Generieren komplementärer Überhänge und gleichzeitiges Entfernen der Restriktionsschnittstellen kann mittels dieser Technologie ein gewünschtes DNA-Fragment in einem Schritt in den kompatiblen Zielvektor pBRM (Szczesny *et al.* 2010) kloniert werden. Der „Golden Gate“-kompatible Zielvektor pBRM enthält eine dreifach c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz sowie ein von *BsaI*-Schnittstellen flankiertes *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *lac*-Promotors (Szczesny *et al.* 2010). Um das *lacZ*-Gen durch das gewünschte DNA-Fragment ersetzen zu können, sind die *BsaI*-Schnittstellen im Zielvektor pBRM so gestaltet, dass durch eine *BsaI*-Restriktion das *lacZ*-Gen zusammen mit den *BsaI*-Schnittstellen entfernt wird und ein Überhang von vier Nukleotiden im Zielvektor entsteht.

2.3.3 Generierung von *hrpB2*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung des Expressionskonstruktes für HpB2 wurde *hrpB2* aus dem Genom vom *Xcv*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert. Durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (Anhang Tabelle 6.1) wurden der *hrpB2*-Sequenz entsprechende *BsaI*-Schnittstellen angefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend mittels „Golden-Gate“-Klonierung direkt in den „Golden-Gate“-kompatiblen Expressionsvektor pBRM kloniert, wodurch pBRMhrpB2 generiert wurde. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert und auf LB-Nähragarplatten mit Gentamycin und dem Substrat der β -Galaktosidase X-Galaktose ausplattiert. Zur Identifizierung potentiell positiver Klone wurden weiße Kolonien am folgenden Tag mittels Kolonie-PCR analysiert. Die Generierung der Expressionskonstrukte für N- und C-terminal verkürzte HrpB2-Derivate sowie HrpB2-Derivate mit einem Austausch einzelner Aminosäurereste erfolgte adäquat (Tabelle 2.4). Das Expressionskonstrukt für HpB2-c-Myc wurde auf gleiche Weise erstellt, jedoch erfolgte die Amplifizierung von *hrpB2* aus dem Genom von *Xcv* in diesem Fall ohne das TGA-Stop-Codon. Durch eine spezielle Oligonukleotid-Kombination mit der kodierenden Sequenz für ein FLAG-Epitop neben kompatiblen *BsaI*-Schnittstellen für das Expressionsplasmid pBRM und dem amplifizierte PCR-Produkt von *hrpB2*, wurde mittels „Golden-Gate“-Klonierung das Expressionskonstrukt pBRMhrpB2-flag erstellt.

Die Generierung von Expressionskonstrukten für HrpB2-Derivate mit gezielten Deletionen innerhalb der Aminosäuresequenz von HrpB2 (Tabelle 2.4) erfolgte durch eine zusätzliche, gerichtete Mutagenese von *hrpB2*. Hierfür wurde das „Phusion™-Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ (Finnzymes OY, Espoo, Finnland) verwendet. Zu diesem Zweck wurde das zuvor amplifizierte PCR-Produkt von *hrpB2* zusätzlich „Blunt-End“ in den Vektor pUC57 Δ BsaI subkloniert, wodurch pUChrpB2 generiert wurde. Mittels einer weiteren PCR wurden unter dem Einsatz spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 6.1) Deletionen in die *hrpB2*-Sequenz eingeführt. Als Matrizen-DNA wurden 10-50 pg Plasmid-DNA (pUC57hrpB2) eingesetzt. Die Oligonukleotide besaßen eine 5'-P-Gruppe, welche die anschließende Zirkularisierung des PCR-Produktes mittels der Quick™ T4-DNA Ligase (New England Biolabs) ermöglichte. Zur Transformation der ligierten PCR-Produkte wurden chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen verwendet. Mutagenisierte *hrpB2*-Derivate wurden anschließend mittels „Golden-Gate“-Klonierung in den Expressionsvektor pBRM kloniert.

Zur Generierung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionen mit HrpB2 bzw. HrpB2-Derivaten wurde *hrpB2* oder das entsprechende *hrpB2*-Derivat aus dem Genom vom *Xcv*-

Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *Bam*H/*Xho*I-Schnittstellen von pGEX-2TKM kloniert, woraus pGhrpB2 und pGhrpB2-Derivate resultierten.

2.3.4 Generierung von *prgJ* und *yscI*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung der pBRM-Expressionskonstrukte für PrgJ bzw. PrgJ-c-Myc wurde das Gen *prgJ* mittels spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 6.1) mit bzw. ohne Stop-Codon amplifiziert und *Bsa*I-Schnittstellen angefügt. Als Matrize wurde eine zur Verfügung gestellte DNA-Präparation genomischer DNA vom *Yersinia enterocolitica* Stamm W22703 eingesetzt. Die pBRM-Expressionskonstrukte für YscI bzw. YscI-c-Myc wurden auf vergleichbare Weise erstellt. Jedoch wurde in diesem Fall eine genomische DNA-Präparation von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* Stamm 14028 als Matrize verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels „Golden-Gate“-Klonierung direkt in den „Golden-Gate“-kompatiblen Expressionsvektor pBRM kloniert.

2.3.5 Generierung von *hpaC*-Expressionskonstrukten

Zur Generierung eines C-terminal c-Myc-Epitop-markierten HpaC-Derivates wurde *hpaC* ohne Stoppcodon aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und entsprechend den Herstellerangaben in pENTR/D-TOPO eingefügt, woraus pENTRhpaC resultierte. Mittels GATEWAY®-Technologie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde pENTRhpaC in den Vektor pDGW4M (Lorenz *et al.* 2008a) vor eine c-Myc-Epitop-kodierende Sequenz rekombiniert. pDGW4M ist ein GATEWAY®-kompatibles pDSK602-Derivat mit *attR*-Rekombinationssequenzen und einer vierfach c-Myc-Epitop-kodierenden Sequenz stromabwärts des dreifachen *lacUV* Promotors (Tabelle 2.2) (Lorenz *et al.* 2008a). Die Expressionskonstrukte für HpaC-c-Myc-Derivate mit sequentiellen Deletionen von 10 Aminosäureresten (Tabelle 2.4) wurden durch eine gerichtete Mutagenese von *hpaC* mittels PCR erstellt. Hierfür wurde wie zuvor beschrieben das „Phusion™-Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ und spezifische Oligonukleotide (Tabelle 6.1) mit einer 5'-P-Gruppe verwendet. Als Matrizen-DNA wurden 10-50 pg von pENTRhpaC eingesetzt. Ligierte PCR-Produkte wurden in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Mutagenisierte *hpaC*-Derivate wurden anschließend mittels GATEWAY®-Technologie in den Vektor pDGW4M rekombiniert (Tabelle 2.4).

Zur Generierung der pBRM-Expressionskonstrukte für HpaC-c-Myc und HpaC-c-Myc-Derivate mit Deletionen von fünf, 30 bzw. 60 Aminosäureresten oder mit einem einzelnen Aminosäureaustausch innerhalb der C-terminalen Proteinregion, wurde die „Golden-Gate“-Technologie angewendet. Hierfür wurde *hpaC* ohne Stoppcodon aus dem *Xcv*-Stamm 85-10

mittels PCR amplifiziert, *BsaI*-Schnittstellen angefügt und „Blunt-End“ in den Vektor pUC57 Δ BsaI subkloniert, woraus pUChpaC resultierte. Anschließend wurde *hpaC* mittels „Golden-Gate“-Klonierung in den kompatiblen Expressionsvektor pBRM kloniert, wodurch pBRMhpaC generiert wurde. Deletionen und Punktmutationen innerhalb von *hpaC-c-myc* wurden durch PCR mit phosphorylierten Oligonukleotiden und pUChpaC als Matrizen-DNA wie zuvor beschrieben eingeführt. Religierte PCR-Produkte wurden in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert und die mutagenisierten *hpaC*-Derivate anschließend mittels „Golden-Gate“-Klonierung in den Expressionsvektor pBRM kloniert. Zur Generierung der pBRM-Expressionskonstrukte für HpaC Δ 2-111-c-Myc, HpaC Δ 2-111,L171A-c-Myc und HpaC Δ 2-111,F175A-c-Myc wurde das korrespondierende *hpaC* Fragment via PCR amplifiziert und mittels „Golden-Gate“-Klonierung direkt in den Expressionsvektor pBRM kloniert. Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 6.1 im Anhang aufgeführt.

2.4 Sekretionsstudien und Proteinanalyse

Die Analyse der Typ III-abhängigen *in vitro*-Proteinsekretion erfolgte mit leichten Modifikationen entsprechend der vorliegenden Publikation (Rossier *et al.* 1999). Die Kultivierung der zu analysierenden *Xcv*-Stämme erfolgte über Nacht in 3 ml MA-Medium (pH 7,0) bei 30°C. Von dieser Kultur ausgehend wurden 4 ml einer Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,15 in MA-Medium (pH 5,3) angeimpft, welches zusätzlich 50 µg/ml BSA (New England BioLabs Inc., Beverly, USA) und 10 µg/ml Thiamin (Serva, Heidelberg) enthielt. Diese Kultur wurde 2 bis 3 Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert und anschließend erneut die OD₆₀₀ der Kultur gemessen. Zur Herstellung des Totalextraktes wurden 500 µl der Kultur durch Zentrifugation pelletiert und in 50 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Um im Kulturüberstand die sekretierten Proteine nachzuweisen, wurden 2 ml des Kulturmediums mit Hilfe eines proteindurchlässigen Filters (Acrodisc 25 mm Syringe Filter, 0,45 µm HT Tuffryn Membrane, Pall GmbH, Dreieich) von den Bakterienzellen abgetrennt. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels 200 µl Trichloressigsäure (TCA) und Inkubation auf Eis präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation bei 4°C vom Medium getrennt. Das erhaltene Pellet wurde mit -20°C-kaltem Ethanol gewaschen, erneut bei 4°C zentrifugiert und nach dem Trocknen in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proteinextrakte wurden für etwa 5 min gekocht und gleiche Proteinmengen (maximal 12 µl Gesamtzellextrakt und 18 µl Kulturüberstand) wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot (Sambrook *et al.* 1989) mit spezifischen Antikörpern analysiert (Tabelle 2.5). Als Sekundäntikörper wurden Meerrettich-Peroxidase-Konjugate von Anti-Kaninchen-,

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

Tabelle 2.5: Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Antikörperspezifität	Referenz/Hersteller
<i>polyklonal</i>			
Anti-HrpF	1:3000	Kaninchen-IgG	(Büttner <i>et al.</i> 2002)
Anti-HrpB1	1:3000	Kaninchen-IgG	(Rossier <i>et al.</i> 2000)
Anti-HrpB2	1:3000	Kaninchen-IgG	(Rossier <i>et al.</i> 2000)
Anti-HrpB3 (HrcJ)	1:1000	Kaninchen-IgG	(Rossier <i>et al.</i> 2000)
Anti-HrpE	1:500	Kaninchen-IgG	(Weber <i>et al.</i> 2005b)
Anti-AvrBs3	1:5000	Kaninchen-IgG	(Knoop <i>et al.</i> 1991)
<i>monoklonal</i>			
Anti-c-Myc	1:3000	Maus-IgG	Roche, Mannheim
Anti-GST	1:10000	Ziegen-IgG	Amersham, Freiburg
Anti-FLAG	1:5000	Maus-IgG	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen

IgG-Immunglobulin G

2.5 GST-„pull down“-Analysen

Ein Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* ist die GST (Glutathion-S-Transferase)-„pull-down“-Analyse. Die GST-„pull down“-Analyse wurde mit Modifikationen entsprechend der vorliegenden Publikation, durchgeführt (Büttner *et al.* 2006). Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden bakterielle Pellets von 50 ml *E. coli*-Kulturen in 3 ml PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels der „French Pressure Cell Press“ (SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 800 psi in einer auf 4°C vorgekühlten, kleinen Zelle (20K, Thermo Electro Corporation). Das Aufschlussverfahren wurde zur Erhöhung der Effizienz mindestens zweimal wiederholt. Die unlöslichen Proteine und Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm) entfernt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden jeweils 600 µl Lysat für die GST-„pull down“-Analyse eingesetzt. Hierbei wurde das Volumen in Abhängigkeit von der Proteinstabilität und der Expressionsstärke angeglichen. GST oder GST-Fusionsproteine enthaltende *E. coli*-Lysate wurden für 30-60 min bei 4°C im Kühlraum mit 40 µl Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Dabei erfolgte die Immobilisierung der Fusionsproteine über die GST-Domäne an Glutathion, das an die Sepharose-Matrix gebunden ist. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurden ungebundene oder unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Im Anschluss wurde ein weiteres *E. coli*-Lysat, welches den möglichen

Interaktor mit einer c-Myc-Epitopmarkierung enthielt, hinzugegeben. Nach Inkubation für 1,5 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler wurden ungebundene Proteine durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit 40 µl Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 1,5 h bei Raumtemperatur unter Schütteln eluiert. 5 µl Lysat und 20 µl Eluat wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung von GST- und c-Myc-spezifischen Antikörpern analysiert.

2.6 Subfraktionierungsstudien

Um separate zelluläre Fraktionen mit bakteriellem Zytoplasma, Periplasma, innerer Membran (IM) und äußerer Membran (ÄM) anzureichern und diese voneinander zu trennen, wurden ein angepasstes zuvor publiziertes Protokoll verwendet (Thein *et al.* 2010). Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Kultivierung der zu analysierenden Bakterien-Stämme über Nacht in mindestens 5 ml MA (pH 7,0)- oder NYG-Medium bei 30°C. Von dieser Kultur ausgehend wurden die Bakterien in einem Liter sekretionsinduzierenden MA-Medium (pH 5,3) oder sekretionshemmenden NYG-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von annähernd 0,8 angezogen. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet und in 10 ml 0.2 M Tris/HCl, pH 8.0, 1 M Saccharose, 1 mM EDTA und Lysozym mit einer Endkonzentration von 1 mg /ml resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 40 ml deionisiertes Wasser versetzt. Zum generieren von Sphaeroplasten wurde die Bakterienlösung anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 200.000 g für 45 min bei 4°C wurde der Überstand mit angereichertem Periplasma abgenommen und das Pellet in 7.5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.2 mM DTT und DNase mit einer Endkonzentration von 1 mg /ml mittels an ULTRA-TURRAX® resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mittels der „French Pressure Cell Press“ bei 800 psi in einer auf 4°C vorgekühlten, kleinen Zelle aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 1789 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet mit unaufgeschlossene Zellen vom Überstand entfernt. Der Überstand wurde danach für 2-3h mit 300.000 g bei 4°C zentrifugiert und mit bakteriellem Zytoplasma angereichert. Das entstandene Pellet mit angereicherter IM sowie ÄM wurde in 9 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2% (w/v) Triton X-100 and 10 mM MgCl₂ resuspendiert und mit 85.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand korrespondiert mit der IM angereicherten zellulären Fraktion. Das entstandene Pellet besteht im Wesentlichen aus der konzentrierten Komponenten der ÄM und wurde anschließend mit 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2% (w/v)

Triton X-100 und 10 mM MgCl₂. gewaschen. Die Probe wurde wie bereits beschrieben erneut zentrifugiert und das Pellet vorsichtig dreimal mit 500 µl deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Proteine in der mit Periplasma, Zytoplasma, IM und ÄM angereicherten Fraktion wurden anschließend mittels TCA und DOC („sodium deoxycholate“) gefällt. Zu diesem Zweck wurde ein Volumen-Anteil der Probe mit 1/100 Volumen von 2% (w/v) DOC für 30 min auf Eis inkubiert und 1/10 Volumen 100% TCA hinzugefügt. Nach der Zentrifugation bei 10.000 g für 15 min bei 4°C wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und mit -20°C kaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Laemmli-Puffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

2.7 EM (Elektronenmikroskop)-Analysen und Immunogoldmarkierungen

Alle EM-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause (Biozentrum). Für die EM-Analysen wurden die Bakterien-Stämme zunächst auf speziell mit Harz (Formvar®) beschichteten Gitter, sogenannte „gold-grids“ (300 Square, #G2300A; Plano, Wetzlar), für 6 h bei 30°C unter sekretionsinduzierenden Bedingungen angezogen (Weber *et al.* 2005b). Bevor die Gitter für 10 s an der Luft getrocknet wurden, wurde überschüssiges Medium mittels Filterpapier vorsichtig entfernt. Danach wurden die „gold-grids“ mit den Bakterien dreimal mit Wasser gewaschen und durch eine wässrige Lösung mit 1 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Proben wurden mittels Transmission Elektronenmikroskop (EM 900, Zeiss SMT) analysiert. Die digitale Dokumentation der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit der SSCCD SM-1k-120 Kamera (TRS). Zum Zweck der immunologisch basierten Goldmarkierung von Proteinen, wurden die Bakterien wie zuvor beschrieben auf den „gold-grids“ angezogen und anschließend mittels einer PBS-Lösung mit 2 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Gitter dreimal für 1 min mit PBS gewaschen und 30 min in einer speziellen Blockierungslösung (1% acetyliertes BSA und 0.1% Tween 20 in PBS) inkubiert. Nach der Inkubation der Proben mit Anti-HrpE, Anti HrpB2 und Anti-HrpF-spezifischen Antikörpern für 12 h bei 4°C wurden die Gitter viermal für 5 min mit der Blockierungslösung gewaschen (Weber *et al.* 2005b) und mit 10 nm Goldpartikel gekoppelten, sekundären Antikörpern (Ziegen Anti-Kaninchen gekoppelt mit 10 nm Goldpartikel, Sigma-Aldrich) für 90 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Proben wurden viermal für 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend mit einer wässrigen Lösung von 1 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Analyse mittels EM und die Dokumentation erfolgten wie zuvor beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 HrpB2 - ein essentieller Pathogenitätsfaktor aus *Xcv*

Die genomische Deletion von *hrpB2* in *Xcv* führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität und der T3SS-abhängigen *in vitro* Sekretion (Rossier *et al.* 2000). HrpB2 ist damit ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Xcv* und für eine Typ III-abhängige Sekretion zwingend erforderlich. Aus vorherigen Studien war bekannt, dass HrpB2 selbst durch das T3SS *in vitro* sekretiert wird und ein mögliches Sekretionssignal innerhalb der ersten 25 Aminosäurereste enthält (Rossier *et al.* 2000; Lorenz *et al.* 2008b). Es wurde bereits demonstriert, dass die Komplementation einer *Xcv* *hrpB2*-Deletionsmutante mit einem HrpB2-Derivat, welchem die N-terminalen 25 Aminosäurereste fehlen, nicht mehr möglich ist (Lorenz *et al.* 2008b). Durch eine randomisierte Transposonmutagenese von HrpB2 konnten für die Pathogenität und das T3S-System von *Xcv* essentielle Proteinregionen eingegrenzt werden (Hartmann *et al.* 2012). Jedoch gab es zu diesem Zeitpunkt weder detaillierte Hinweise für eine Beteiligung spezifischer Aminosäurereste innerhalb der essentiellen Proteinregionen, noch Kenntnisse über die genaue Proteinfunktion von HrpB2 selbst.

3.1.1 Funktionelle Charakterisierung der N-terminalen Proteinregion und Identifizierung wichtiger Aminosäurereste in HrpB2

Durch eine gerichtete Mutagenese von HrpB2 sollten in dieser Arbeit zunächst funktionelle Bereiche und N-terminale Aminosäuren in HrpB2 identifiziert werden, die maßgeblich für die Proteinfunktion und damit für die Pathogenität von *Xcv* von Bedeutung sind. Zu diesem Zweck wurde aus dem Genom von *Xcv* 85-10 das Wildtyp-Gen *hrpB2* (393 Basenpaare) amplifiziert und mittels „Golden Gate“-Strategie (2.3.2) in das bakterielle Expressionsplasmid pBRM kloniert (2.3.3). Zur detaillierten Analyse des T3S-Signals und der N-terminalen Proteinregion von HrpB2, wurden zusätzlich N-terminale HrpB2-Deletionsderivate erstellt, die sukzessive Deletionen der N-terminalen 20 Aminosäuren enthielten. Die entsprechenden Genfragmente wurden, wie das Wildtyp-Gen *hrpB2*, in das Expressionsplasmid kloniert. Durch Einführung eines Stop-Codons besaßen die korrespondierenden Genprodukte keine C-terminale Epitopmarkierung. Die erstellten Expressionskonstrukte wurden mittels triparentaler Konjugation (2.1.2) in die *Xcv* Wildtyp-Stämme 85-10 und 85-10*hrpG**(85*) sowie deren genomischen *hrpB2*-Deletionsderivate (85-10 Δ *hrpB2* und 85* Δ *hrpB2*) transferiert. Im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm 85-10 enthält der Stamm 85* eine konstitutiv aktive Version des regulatorischen Proteins HrpG (HrpG*).

HrpG* führt zu einer konstitutiven Expression der *hrp*-Gene, was die Voraussetzung für die *in vitro*-Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion ist (Rossier *et al.* 1999). Das *in planta*-Wachstum eines 85*-Stammes ist jedoch vergleichbar zum Wildtyp (Wengelnik *et al.* 1999).

Charakterisierung der HrpB2-Deletionsderivate in *Xcv* (Komplementationsanalysen)

Im Folgenden sollte durch Infektionsstudien und eine *in vitro* Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion getestet werden, ob die erstellten HrpB2-Derivate funktional, daher in der Lage sind, den *hrpB2*-Mutanten-Phänotyp bezüglich Symptome in der Pflanze und der Typ III-abhängigen Sekretion zu komplementieren. Der Wildtyp-Stamm 85-10 sowie die genomische *hrpB2*-Deletionsmutante, welche die *hrpB2*-Expressionskonstrukte oder das Plasmid pBRM enthielt, wurden in susceptible ECW- und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen inokuliert (Abbildung 3.1 A). ECW-10R-Pflanzen tragen das Resistenzgen *Bs1* und erkennen das Effektorprotein *AvrBs1* (Minsavage *et al.* 1990). Der Stamm 85-10 induzierte erwartungsgemäß in resistenten Pflanzen eine HR und führte in suszeptiblen Pflanzen zur Ausbildung von Krankheitssymptomen (Abbildung 3.1 A). In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten wurden keine makroskopischen Reaktionen nach der Infiltration mit dem Stamm 85-10 Δ *hrpB2* beobachtet (Rossier *et al.* 2000). Der Phänotyp der *hrpB2*-Deletionsmutante wurde durch die ektopische Expression von *hrpB2* sowie von *hrpB2*-Deletionderivaten komplementiert, die die verkürzten HrpB2-Derivate HrpB2₀₆₋₁₃₀, HrpB2₀₇₋₁₃₀, HrpB2₀₈₋₁₃₀, HrpB2₀₉₋₁₃₀, und HrpB2₁₀₋₁₃₀ kodieren (Abbildung 3.1 A). Keine Komplementation wurde dagegen für die HrpB2-Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀, HrpB2₁₂₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ beobachtet (Abbildung 3.1 A). Diese Beobachtung deutet an, dass eine Deletion der N-terminalen Aminosäuren 02 bis 09 aus HrpB2 keinen Einfluss auf die Proteinfunktion besitzt. Im Gegensatz dazu, die HrpB2-Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀, HrpB2₁₂₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ ihre Funktion für die Pathogenität von *Xcv* vermutlich nicht mehr vollständig erfüllen (Abbildung 3.1 A). Die ektopische Expression des Wildtyp-Gens *hrpB2* bzw. der *hrpB2*-Derivate im Wildtyp-Stamm 85-10 übte keinen makroskopisch sichtbaren Einfluss auf die Induktion der HR oder Ausbildung von Krankheitssymptomen aus (Abbildung 3.2 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust zur Fähigkeit der Komplementation nicht auf einen dominant-negativen Einfluss von HrpB2₁₁₋₁₃₀ oder HrpB2₂₁₋₁₃₀ *in planta* beruht. Ebenfalls wurde die stabile Expression von *hrpB2* und der *hrpB2*-Deletionsderivate mittels Western-Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen HrpB2 überprüft und nachgewiesen (Abbildung 3.1 B und Abbildung 3.2 B). Hierfür wurden die verwendeten *Xcv*-Stämme in NYG-Medium angezogen und die bakteriellen Gesamtzellextrakte analysiert. Wie erwartet besitzt HrpB2₂₁₋₁₃₀ aufgrund einer Deletion von 20 Aminosäuren ein im Vergleich zu HrpB2

reduziertes Molekulargewicht. Im Vergleich zu den konstitutiv exprimierten *hrpB2*-Derivaten konnte das im Genom kodierte HrpB2 im Wildtyp-Stamm 85-10 erwartungsgemäß nicht detektiert werden (Abbildung 3.2 B), da die *hrp*-Genexpression nicht konstitutiv, sondern nur innerhalb der Pflanze oder in speziellem Minimalmedium induziert wird. (Schulte *et al.* 1992a; Wengelnik *et al.* 1996c).

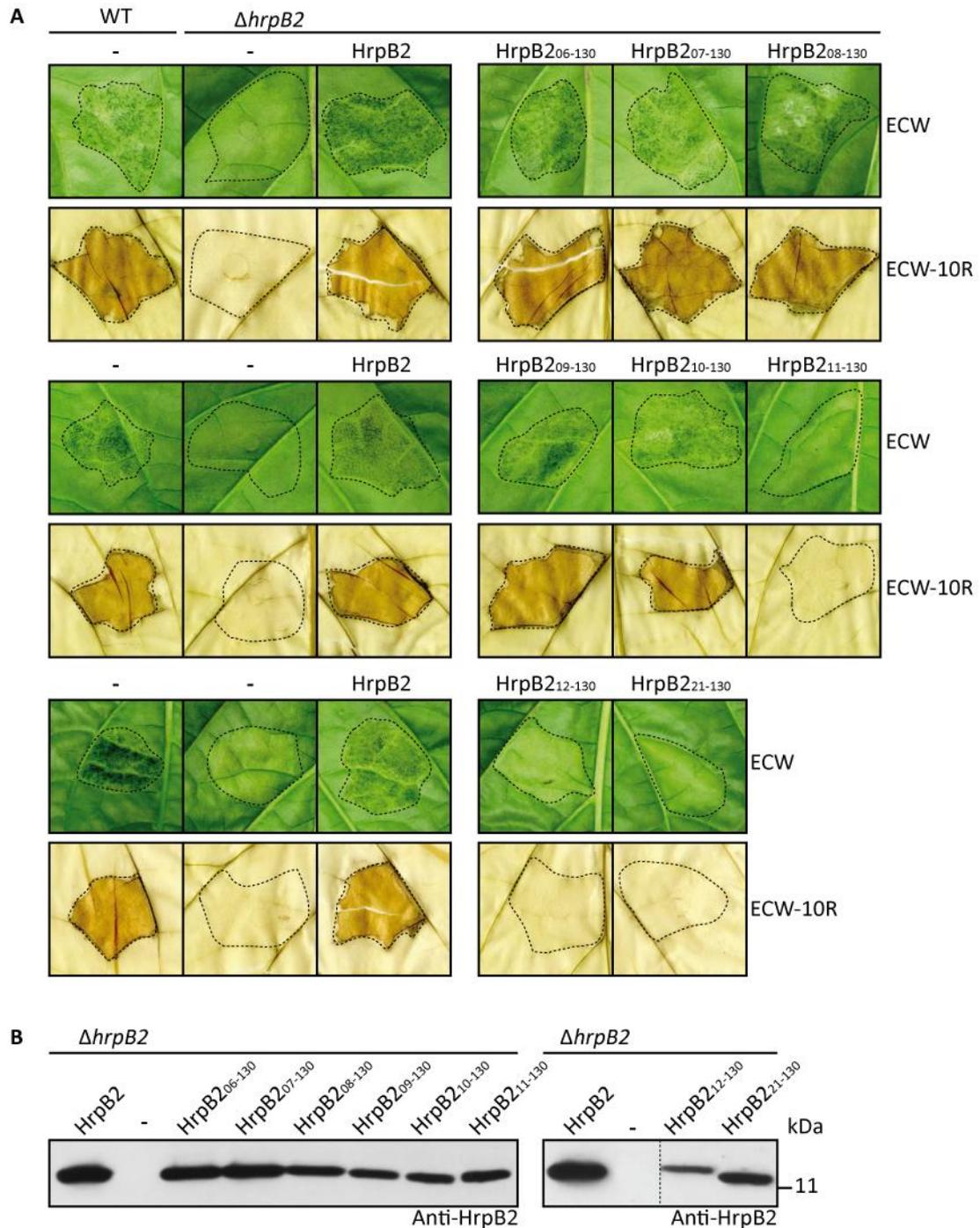


Abbildung 3.1: Komplementationsanalyse mit N-terminal verkürzten HrpB2-Deletionsderivaten.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die Plasmide pBRM (-) oder die pBRMhrpB2-Expressionskonstrukte für HrpB2 (HrpB2) bzw. HrpB2-Deletionsderivate (HrpB2_{n-130}) enthielten, infiltriert. Die verkürzte Aminosäuresequenz der HrpB2-Deletionsderivate wurde durch Zahlen (n) angegeben. Die Dokumentation der Symptome bei der suszeptiblen Pflanze erfolgte fünf Tage nach der Infiltration. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze zwei Tage nach der Infiltration in EtOH gebleicht und dokumentiert. Alle *Xcv*-Stämme wurden mit einer Bakteriendichte OD₆₀₀ = 0,4 inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Proteinstabilität. Die *Xcv*-Stämme wurden in NYG angezogen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-Page (15%) und Western-Blot analysiert. Die Detektion von HrpB2 erfolgte durch HrpB2-spezifische Antikörper (Anti-HrpB2).

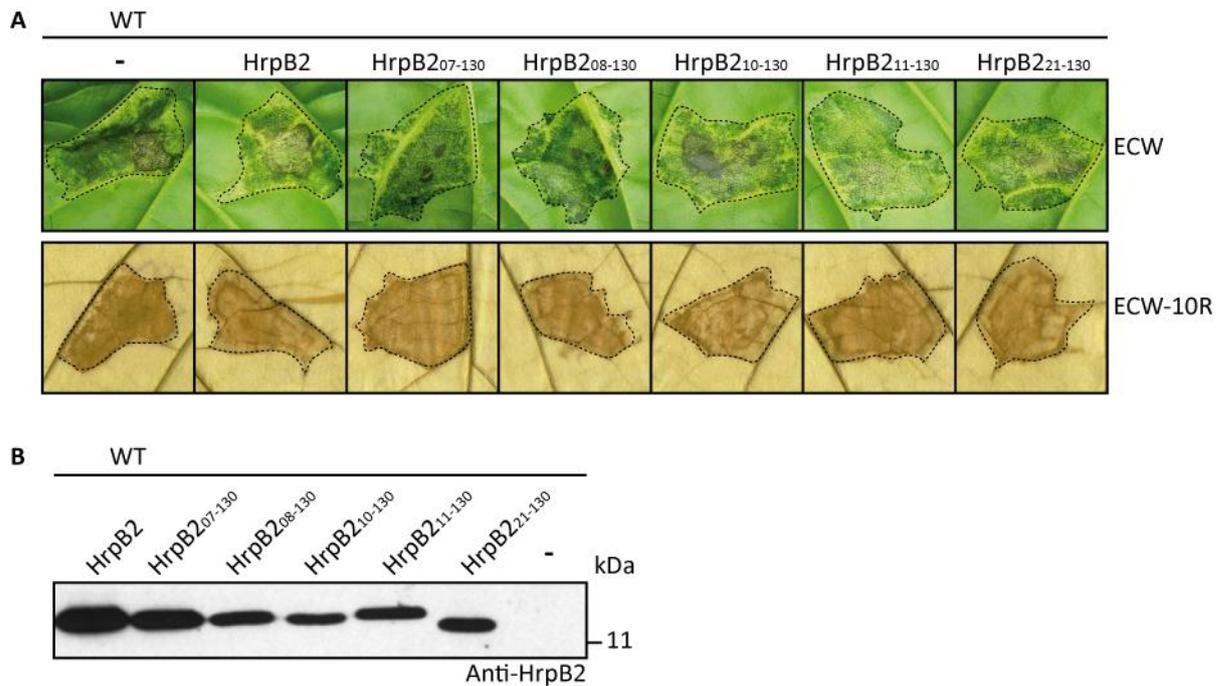


Abbildung 3.2: Ektopische Expression der *hrpB2*-Derivate im Wildtyp-Stamm 85-10.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit dem *Xcv* Stamm 85-10 (WT), der das Plasmid pBRM (-) oder die pBRM*hrpB2*-Expressionskonstrukte für HrpB2 bzw. HrpB2-Deletionsderivate enthielt, infiltriert. Die verkürzte Aminosäuresequenz der HrpB2-Deletionsderivate wurde durch Zahlen angegeben. Die Dokumentation der Symptome bei der suszeptiblen Pflanze erfolgte sechs Tage nach der Infiltration. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze ein Tag nach der Infiltration in EtOH gebleicht und dokumentiert. Alle *Xcv*-Stämme wurden mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,4$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Proteinstabilität. Die *Xcv*-Stämme wurden in NYG angezogen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-Page (15%) und Western-Blot analysiert. Die Detektion von HrpB2 erfolgte durch HrpB2-spezifische Antikörper (Anti-HrpB2).

Aus diesem Grund wurden Derivate der Stämme 85* bzw. 85* Δ *hrpB2* verwendet, um den Einfluss von HrpB2-Derivaten auf die Typ III-abhängige Sekretion *in vitro* zu analysieren. Die konstitutive Expression der *hrp*-Gene im Stamm 85* erleichtert die Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion *in vitro* unabhängig von Faktoren der Wirtspflanze (Rossier *et al.* 1999). Für Sekretionsanalysen (2.4) wurden die *Xcv*-Stämme in speziellem Minimalmedium (pH=5,35) inkubiert und anschließend die Kulturüberstände von den Bakterien getrennt. Western-Blot-Analysen mit HrpF-spezifischen Antikörpern zeigten, dass die Sekretion von HrpF in der *hrpB2*-Deletionsmutante durch HrpB2 und die HrpB2-Derivate HrpB2₀₆₋₁₃₀, HrpB2₀₇₋₁₃₀, HrpB2₀₈₋₁₃₀ wiederhergestellt wurde (Abbildung 3.3 A). Eine potentielle Komplementation der HrpF-Sekretion wurde für HrpB2₀₉₋₁₃₀ und HrpB2₁₀₋₁₃₀ beobachtet, wohingegen die Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀, und HrpB2₂₁₋₁₃₀ den sekretionsdefizienten Phänotyp der genomischen *hrpB2*-Deletionsmutante nicht komplementierten (Abbildung 3.3 B). Mit Rückblick auf die Infektionsstudien (Abbildung 3.1) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die HrpB2-Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀, HrpB2₁₂₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ weder *in planta* noch *in vitro*

funktional sind. In weiteren Experimenten sollte die Typ III-abhängige Sekretion der N-terminal verkürzten HrpB2-Deletionsderivate analysiert werden. Aus vorherigen Studien war bekannt, dass die *in vitro*-Sekretion von HrpB2 im *Xcv*-Wildtyp sehr gering ist und die Menge von sekretierten HrpB2 an bzw. unterhalb der Detektionsgrenze des HrpB2-spezifischen Antikörpers liegt (Rossier *et al.* 2000). HrpB2 wird jedoch in Abwesenheit des T3S4-Proteins HpaC verstärkt sekretiert (Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008b). Die Sekretion der HrpB2-Derivate wurde daher in einer *hpaC*-Deletionsmutante analysiert. Um die Detektion des nativen HrpB2-Proteins zu vermeiden, wurden die HrpB2-Deletionsderivate im Stamm 85* Δ *hrpB2* Δ *hpaC* analysiert. HrpB2₀₆₋₁₃₀, HrpB2₀₇₋₁₃₀, HrpB2₀₈₋₁₃₀, HrpB2₀₉₋₁₃₀ und HrpB2₁₀₋₁₃₀ wurden im Kulturüberstand detektiert, jedoch war die Sekretion von HrpB2₀₉₋₁₃₀ und HrpB2₁₀₋₁₃₀ im Vergleich zu HrpB2 reduziert (Abbildung 3.3 A und B). HrpB2₁₁₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ wurden dagegen nicht im Kulturüberstand nachgewiesen (Abbildung 3.3 B). Ähnliche Ergebnisse wurden für den Stamm 85* Δ *hrpB2* beobachtet (Abbildung 3.3).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass HrpB2-Derivate mit Deletionen bis einschließlich der Aminosäure Alanin an der Position neun, welche *in planta* den Phänotyp der *hrpB2*-Deletionsmutante vollständig komplementierten und partiell die Sekretion von HrpF wiederherstellten, auch grundsätzlich noch sekretiert werden können (Tabelle 3.1). Die HrpB2-Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀, HrpB2₁₂₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ komplementieren dagegen weder den Phänotyp einer *hrpB2*-Deletionsmutante noch werden sie sekretiert (Tabelle 3.1). Dies deutet darauf hin, dass in diesen HrpB2-Deletionsderivaten Aminosäurereste fehlen, die für die Funktion von HrpB2 wichtig sind und eine entscheidende Rolle für das T3S-System von *Xcv* und für die Sekretion von HrpB2 selbst, spielen.

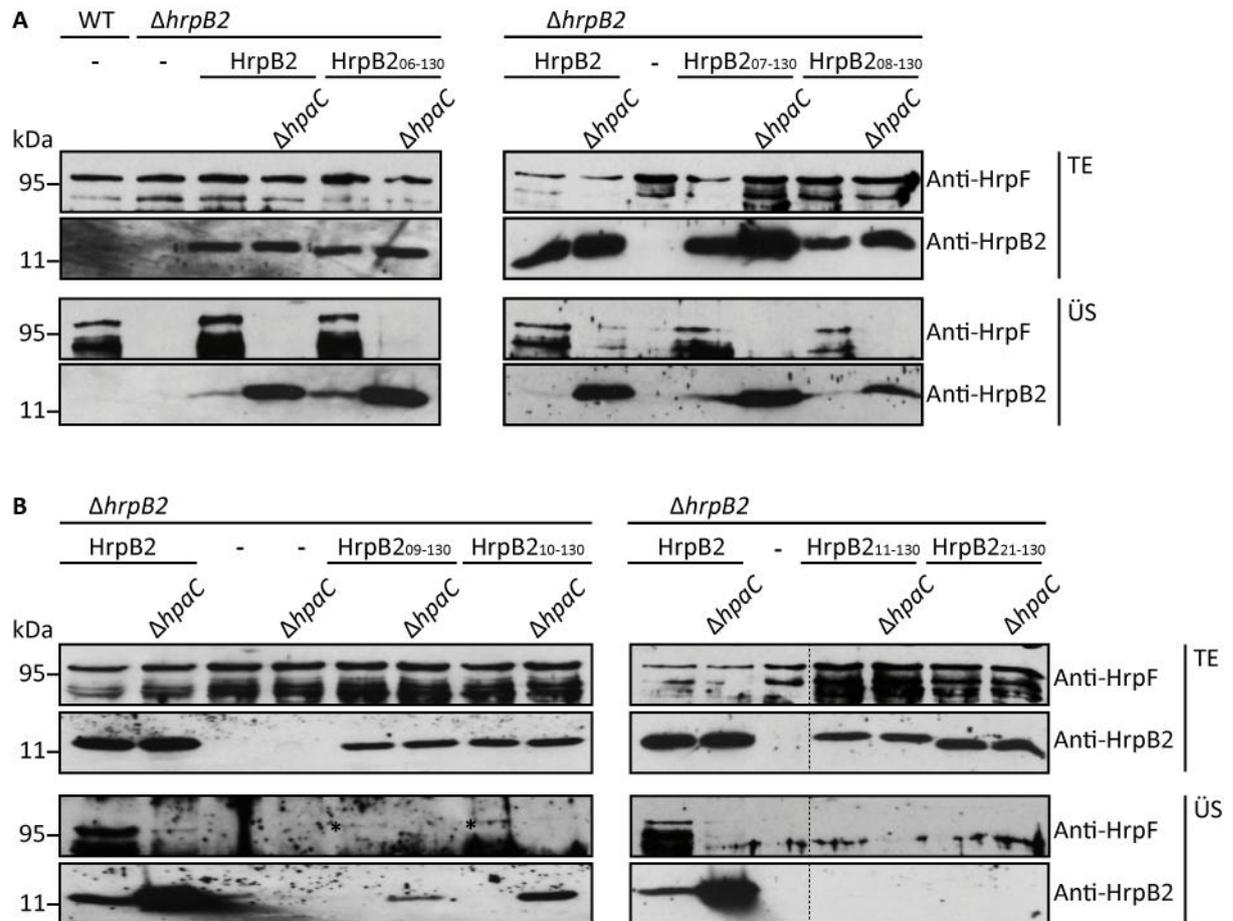


Abbildung 3.3: Komplementationsstudie und Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion N-terminal verkürzter HrpB2-Derivate.

(A) und (B) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2 in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv*-Stämme 85* (WT), 85* $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$) und 85* $\Delta hrpB2 \Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Plasmide pBRM (-) oder die pBRMhrpB2-Expressionskonstrukte für HrpB2 (HrpB2) bzw. HrpB2-Deletionsderivate (HrpB2_{n-130}) enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die verkürzte Aminosäuresequenz der HrpB2-Deletionsderivate ist durch Zahlen (n) angegeben. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF (86,4 kDa) wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) bzw. HrpB2 (13,8 kDa) durch HrpB2-spezifische Antikörper (Anti-HrpB2) detektiert. Die Bande oberhalb der 95 kDa entspricht HrpF und weitere Signale stellen Degradationsprodukte von HrpF dar. Die Schwankungen in der Signalstärke für HrpF im Gesamtzellextrakt sind nicht reproduzierbar und vermutlich mit technischen Abweichungen zu erklären. Die gepunktete Linie kennzeichnet die Schnittebene einer gemeinsamen Membran.

Tabelle 3.1: : Zusammenfassung der Komplementationsstudien mit N-terminal verkürzten HrpB2-Derivaten.

Expressionskonstrukt	$\Delta hrpB2$ -Komplementation		
	Infektionsstudie ^a	<i>in vitro</i> -Sekretionsstudie ^a	
		HrpF	HrpB2
HrpB2	++	++	++
HrpB2 ₀₆₋₁₃₀	++	++	++
HrpB2 ₀₇₋₁₃₀	++	++	++
HrpB2 ₀₈₋₁₃₀	++	++	++
HrpB2 ₀₉₋₁₃₀	++	+	+
HrpB2 ₁₀₋₁₃₀	++	+	+
HrpB2 ₁₁₋₁₃₀	-	-	-
HrpB2 ₁₂₋₁₃₀	-	-	-
HrpB2 ₂₁₋₁₃₀	-	-	-

^aVirulenz /Sekretion vergleichbar mit dem WT (++) bzw. partielle (+) oder keine (-) Komplementation

3.1.2 HrpB2-Derivate mit einer C-terminalen Epitopmarkierung haben einen dominant-negativen Einfluss

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass ein C-terminales c-Myc-Epitop markiertes HrpB2-Protein im *Xcv*-Stamm 85* *in vitro* sekretiert werden kann, aber im Gegensatz dazu nicht mehr die Fähigkeit besitzt eine genomische *hrpB2*-Deletionsmutante zu komplementieren (Lorenz *et al.* 2008b). Die damals gewählte Klonierungsstrategie, bei der *hrpB2* in den Expressionsvektor pDSK602 kloniert wurde, führte zu einer translationalen Fusion von sieben zusätzlichen Aminosäureresten im N-terminalen Bereich von HrpB2. Um einen möglichen Einfluss der zusätzlich vorhandenen Aminosäuren auf die Sekretion von HrpB2 vollständig auszuschließen, aber dennoch die Typ III-abhängige Sekretion von HrpB2-Deletionsderivaten im Hintergrund eines funktionsfähigen T3SS von *Xcv* analysieren zu können, sollten erneut C-terminal markierte HrpB2-Derivate erstellt werden. Zu diesem Zweck wurde *hrpB2* ohne Stopcodon in das Expressionsplasmid pBRM kloniert. Das resultierende pBRMhrpB2-Expressionskonstrukt kodiert HrpB2 mit einer C-terminalen translationalen Fusion an ein dreifaches c-Myc Epitop. In einem parallelen Ansatz wurde zusätzlich ein *hrpB2*-Expressionskonstrukt erstellt, welches ein HrpB2-Derivat mit einem C-terminalen FLAG-Epitop kodiert. Komplementations- und Sekretionsanalysen mit Stämmen 85* und 85* $\Delta hrpB2$ zeigten, dass sowohl HrpB2-c-Myc, als auch HrpB2-Flag den *hrpB2*-mutanten Phänotyp nicht komplementierten (Daten nicht gezeigt) und zudem vom Stamm 85* nicht sekretiert wurden (Abbildung 3.4 A und B). Dies deutet darauf hin, dass die ektopische Expression von *hrpB2-c-myc* bzw. *hrpB2-flag* im Stamm 85* einen generell dominant negativen Einfluss auf die Virulenz und die Typ III-abhängigen Sekretion besitzt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass im Vergleich zum *Xcv*-Stamm 85* die

Stämme 85* mit HrpB2-c-Myc oder HrpB2-Flag deutlich reduzierte Symptome in der Pflanze auslösten (Daten nicht gezeigt).

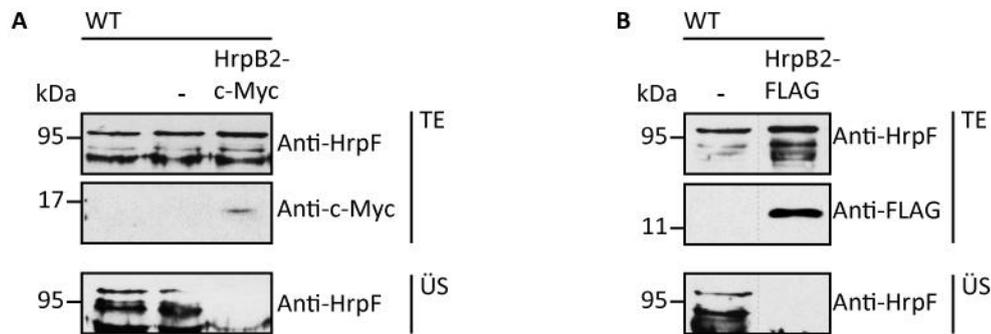


Abbildung 3.4: Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF in *Xcv* nach Expression von *hrpB2-c-myc* und *hrpB2-flag*.

Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurde der *Xcv*-Stamm 85* (WT), welcher das Plasmid pBRM (-) oder (A) HrpB2-c-Myc bzw. (B) HrpB2-FLAG enthielt, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde mittels HrpF-spezifischen Antikörpern (Anti-HrpF) und (A) HrpB2-c-Myc durch c-Myc-spezifische Antikörper (Anti-c-Myc) bzw. (B) HrpB2-FLAG mittels FLAG-spezifischen Antikörpern detektiert. Die Bande oberhalb der 95 kDa entspricht HrpF und weitere Signale stellen Degradationsprodukte von HrpF dar. Die Antikörperreaktionen wurden durch Chemilumineszenz visualisiert.

3.1.3 Analyse des T3S-Signals von HrpB2

Durch die Analyse weiterer HrpB2-Deletionsderivate sollte untersucht werden, ob die essentielle Bedeutung des N-terminalen Aminosäurebereiches von HrpB2 auf Anwesenheit des T3S-Signals beruht, welches in vorausgegangenen Experimenten innerhalb der N-terminalen 25 Aminosäuren lokalisiert wurde (Lorenz et al. 2008b). Da HrpB2 für das T3S-System essentiell ist, sollten diese Experimente präferentiell mit Epitop-markierten HrpB2-Derivaten durchgeführt werden, die jedoch einen dominant-negativen Einfluss auf die Typ III-abhängige Sekretion ausüben (3.1.2 oben). Es wurde daher mit C-terminal um 40 Aminosäuren verkürzten HrpB2-Derivaten gearbeitet (HrpB2_{n-90}), welche vom nativen HrpB2-Protein durch ihre geringere Größe unterscheidbar sind. Die *in vitro*-Sekretionsanalysen wurden mit einer *hpaC*-Deletionsmutante durchgeführt, die eine verstärkte HrpB2-Sekretion ermöglicht. Neben HrpB2₀₁₋₉₀ wurde die Sekretion N-terminal verkürzter Derivate analysiert (Abbildung 3.5). Die HrpB2-Derivate HrpB2₀₁₋₉₀ HrpB2₀₉₋₉₀, HrpB2₁₀₋₉₀ wurden durch *Xcv* in den Kulturüberstand sekretiert, die Sekretion von HrpB2₁₁₋₉₀ war dagegen stark reduziert (Abbildung 3.5 A). Im *Xcv*-Stamm mit dem Expressionskonstrukt für HrpB2₂₁₋₉₀ konnte im Kulturüberstand weder das native HrpB2 noch HrpB2₂₁₋₉₀ detektiert werden (Abbildung 3.5 A). Durch eine zusätzliche Sekretionsanalyse von HrpF (Daten nicht

gezeigt) wurde festgestellt, dass HrpB2₂₁₋₉₀ in *Xcv* als einziges analysiertes HrpB2-Deletionsderivat einen generell negativen Einfluss auf die Typ III-abhängige Sekretion besitzt. Neben sukzessiven Verkürzungen des N-terminalen Bereiches, wurden interne Deletionen eingeführt. Deletionen der Aminosäuren 13 bis 22 und 16 bis 25 führte nicht zu einer Beeinträchtigung der Sekretion von HrpB2₀₁₋₉₀ (Abbildung 3.5 B). Deletionen von Aminosäure 10 bis 25 und 12 bis 25 führte dagegen zu einer Beeinträchtigung der Sekretion von HrpB2₀₁₋₉₀ (Abbildung 3.5 B). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aminosäurereste Isoleucin, Alanin und Glutamat (IAG) an der Position 10, 11 und 12 für die effiziente Sekretion von HrpB2 eine wichtige Rolle spielen und damit einen essentiellen Bestandteil innerhalb des T3S-Signals von HrpB2 darstellen.

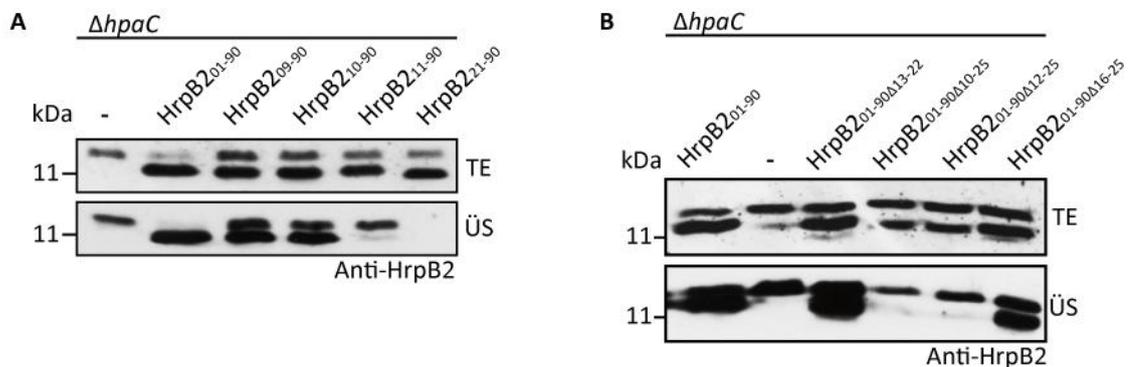


Abbildung 3.5: Analyse des T3S-Signals von HrpB2.

(A) und (B) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpB2₀₁₋₉₀ und HrpB2₀₁₋₉₀-Deletionsderivate in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurde der *Xcv*-Stamm 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welcher das Plasmid pBRM (-) oder HrpB2₀₁₋₉₀ bzw. HrpB2-Deletionsderivate (A) HrpB2_{n-90} oder (B) HrpB2₀₁₋₉₀ Δn enthielt, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Position des ersten Aminosäurerestes in der Aminosäuresequenz (n) der verkürzten HrpB2-Derivate oder die interne Deletion (Δn) ist durch Zahlen angegeben. HrpB2₀₁₋₉₀ unterscheidet sich vom nativen HrpB2-Protein durch die geringere Größe und lässt sich daher im Western-Blot als zweite Bande mit geringerem Molekulargewicht detektieren. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpB2 wurde mittels HrpB2-spezifischen Antikörpern (Anti-HrpB2) detektiert.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung der C-terminalen Proteinregion und konservierter Aminosäurereste von HrpB2

Ergebnisse aus einer früheren Studie wiesen darauf hin, dass unter anderem die Proteinregion zwischen der Aminosäureposition 93 bis 130 aus HrpB2 für die Proteinfunktion und damit für die Pathogenität sowie Typ III-abhängigen Sekretion von *Xcv* wichtig ist (Hartmann *et al.* 2012). Durch eine vergleichende Analyse der C-terminalen Aminosäuresequenz von HrpB2 aus *Xcv* sollten mögliche konservierte Aminosäurereste identifiziert und weitere Hinweise für die potentielle Funktion von HrpB2 gesammelt werden. Hierbei wurde ein bisher unbekanntes Aminosäuremotiv (VxTLxK, Aminosäure 123-128) identifiziert, welches unter den HrpB2-homologen Proteinen aus *Xanthomonas* spp. und in HrpJ aus *R. solanacearum* konserviert ist. Ein ähnliches Motiv wurde in der Aminosäuresequenz der vorhergesagten „inner-rod“ Proteine YscI aus *Yersinia* spp., MxiI aus *S. flexneri* und PrgJ aus *Salmonella* spp. gefunden (Abbildung 3.6). Das VxTLxK-Motiv schließt teilweise ein bereits identifiziertes Motiv (TLMKNQ, Aminosäure 125-130) aus HrpB2-homologen Proteinen von *Xanthomonas* spp. und *R. solanacearum* ein, welches eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *Xac* spielt (Cappelletti *et al.* 2011). Um den Einfluss der konservierten Aminosäurereste 123 bis 128 innerhalb der C-terminalen Proteinregion von HrpB2 für die Pathogenität und Typ III-abhängigen Sekretion von *Xcv* zu überprüfen, wurden HrpB2-Derivate mit Deletionen von 123 bis 128 bzw. 123 bis 130, sowie Punktmutationen in V123, T125, L126 und K128, erstellt (Abbildung 3.6).

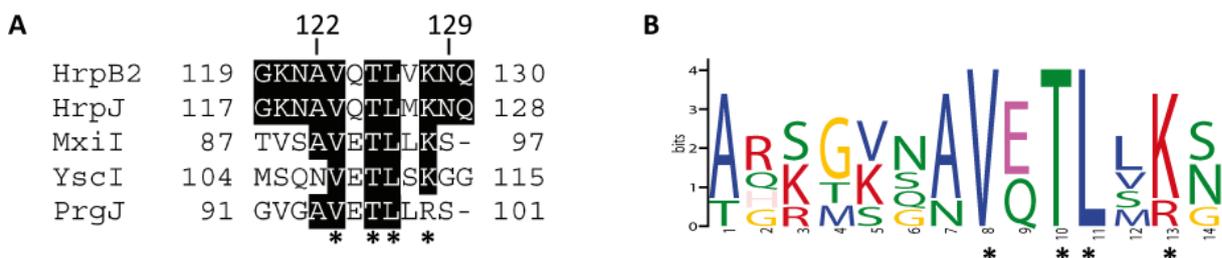


Abbildung 3.6: Vergleich C-terminaler Aminosäurereste von HrpB2 mit HrpJ, MxiI, YscI und PrgJ

(A) Die C-terminale Aminosäuresequenz von HrpB2 aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stamm 85-10 (UniProtKB/TrEMBL: Q3BYK4, GenBank accession number YP_362159), HrpJ aus *R. solanacearum* GM11000 (GenBank accession number NP_522427), MxiI aus *Shigella flexneri* (GenBank accession number AAP79001), YscI aus *Yersinia enterocolitica* Stamm W22703 (UniProtKB/TrEMBL: Q7BRZ3, GenBank accession number AAD16842) and PrgJ aus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* Stamm 14028 (GenBank accession number ACY89885/AAB60190) wurden mittels ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) miteinander verglichen. Konservierte Aminosäurereste sind mit schwarzen Boxen markiert. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Position des jeweiligen Aminosäurerestes in HrpB2. Die Aminosäuren, die in HrpB2 zu Alanin ausgetauscht wurden, sind mit Sternen markiert. (B) Web-Logo der C-terminalen Aminosäuresequenz von HrpB2, HrpJ, MxiI, YscI und PrgJ. Die relative Häufigkeit für das Auftreten eines bestimmten Aminosäurerestes ist in diesem Logo dargestellt (http://meme.sdsc.edu/meme4_6_1/cgi-bin/meme.cgi). Die Aminosäuresequenz entspricht den Positionen 116-129 in HrpB2, 114-127 in HrpJ, 84-97 in MxiI, 101-114 in YscI und 88-101 in PrgJ.

Um die Funktionalität der HrpB2-Derivate zu testen, wurden Infektions- und Sekretionsexperimente durchgeführt. HrpB2 $_{\Delta 123-130}$ und HrpB2 $_{\Delta 123-128}$ waren nicht in der Lage, den mutanten Phänotyp von 85-10 $\Delta hrpB2$ bezüglich Krankheitssymptome oder HR zu komplementieren (Abbildung 3.7 A). Beide Derivate konnten nicht die T3S-Defizienz von 85* $\Delta hrpB2$ komplementieren, wie am Beispiel der HrpF-Sekretion gezeigt wurde (Abbildung 3.7 C). Die eigene Sekretion von HrpB2 $_{\Delta 123-130}$ und HrpB2 $_{\Delta 123-128}$ konnte ebenfalls nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), da die Funktion von HrpB2 auch für seine eigene Sekretion essentiell ist. Ein generell dominant-negativer Einfluss von HrpB2 $_{\Delta 123-130}$ und HrpB2 $_{\Delta 123-128}$ wurde mittels zusätzlicher Infektions- und Sekretionsexperimente ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäuren im Bereich des VxTLxK-Motivs an der Position 123 bis 128 wichtig für die Proteinfunktion von HrpB2 und damit entscheidend für die Typ III-abhängige Sekretion und Pathogenität von *Xcv* sind. Weitere Infektions- und Sekretionsexperimente wurden durchgeführt, um den Einfluss von Punktmutationen in VxTLxK auf die Proteinfunktion zu analysieren. HrpB2 $_{V123A}$ und HrpB2 $_{T125A}$ komplementierten den mutanten Phänotyp von 85-10 $\Delta hrpB2$ vollständig, HrpB2 $_{L126A}$ und HrpB2 $_{K128A}$ dagegen nur partiell (Abbildung 3.8 A). Sekretionsexperimente zeigten, dass HrpB2 $_{L126A}$ und HrpB2 $_{K128A}$ die Sekretion von HrpF im Stamm 85* $\Delta hrpB2$ nicht wiederherstellen konnten (Abbildung 3.8 B). In weiteren Sekretionsexperimenten wurde die Sekretion der HrpB2-Derivate analysiert. Im Gegensatz zu HrpB2 $_{V123A}$ und HrpB2 $_{T125A}$ wurden deutlich geringere Mengen von HrpB2 $_{L126A}$ und HrpB2 $_{K128A}$ im Kulturüberstand nachgewiesen, obwohl alle Derivate in vergleichbaren Mengen im Gesamtzellextrakt detektiert wurden (Abbildung 3.8 B). Wie zuvor beschrieben ist die vollständige Funktion von HrpB2 für seine eigene Sekretion notwendig. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus den Komplementationsanalysen, dass ein HrpB2-Derivat mit einem einzelnen Aminosäureaustausch zu Alanin an der Position L126 und K128 die Pathogenität und T3S einer *hrpB2*-Deletionsmutante nicht vollständig wiederherstellen kann. Dies deutet an, dass die konservierten Aminosäuren L126 und K128 im Bereich des VxTLxK Motiv eine bedeutende Rolle für die Funktion von HrpB2 während der Typ III-abhängigen Sekretion besitzen.

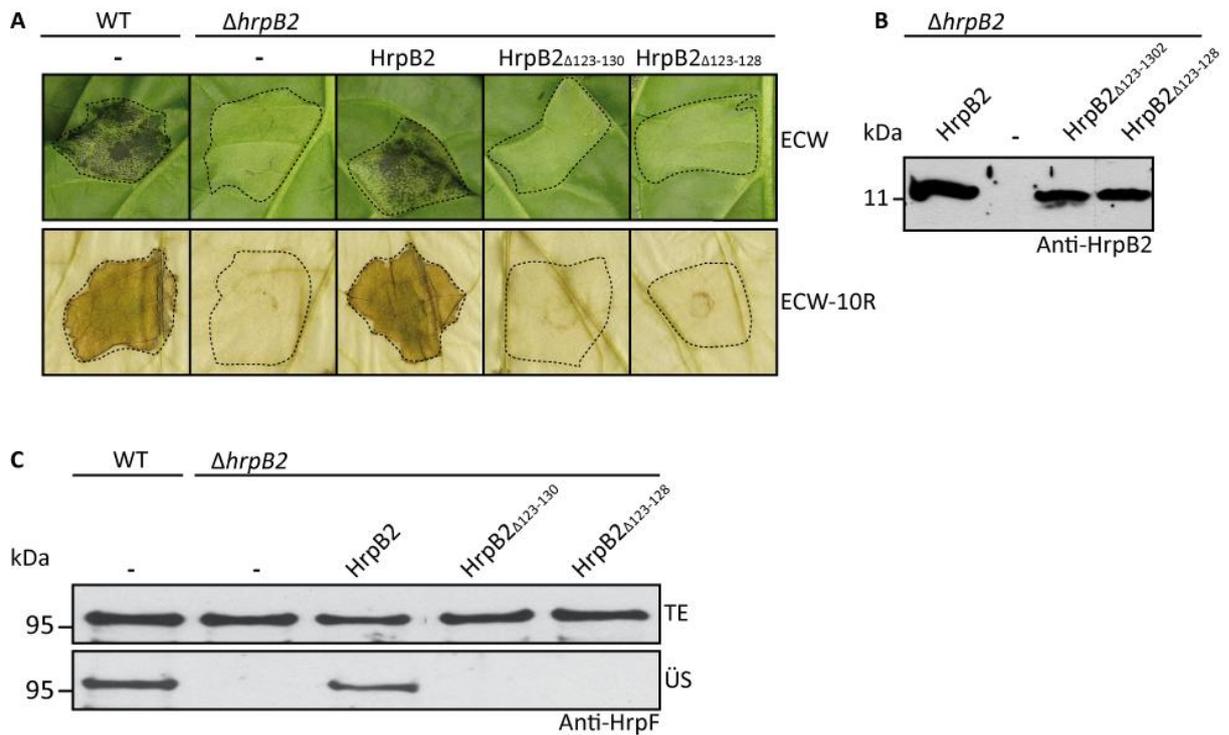


Abbildung 3.7: Komplementationsanalyse mit C-terminal verkürzten HrpB2-Deletionsderivaten.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die Plasmide pBRM (-) oder die pBRMhrpB2-Expressionskonstrukte für HrpB2 (HrpB2) bzw. HrpB2-Derivate (HrpB2 $_{\Delta 123-130}$ und HrpB2 $_{\Delta 123-128}$) enthielten, infiltriert. Die Krankheitssymptome bei der suszeptiblen Pflanze wurden fünf Tage nach der Infiltration dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze zwei Tage nach der Infiltration in EtOH gebleicht und dokumentiert. Alle *Xcv*-Stämme wurden mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,4$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Proteinstabilität. Die *Xcv*-Stämme wurden in NYG angezogen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-Page (10%) und Western-Blot analysiert. HrpB2 wurde mittels HrpB2-spezifischer Antikörper (Anti-HrpB2) nachgewiesen. (C) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv* Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die oben genannten Plasmide oder Expressionskonstrukte enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) detektiert.

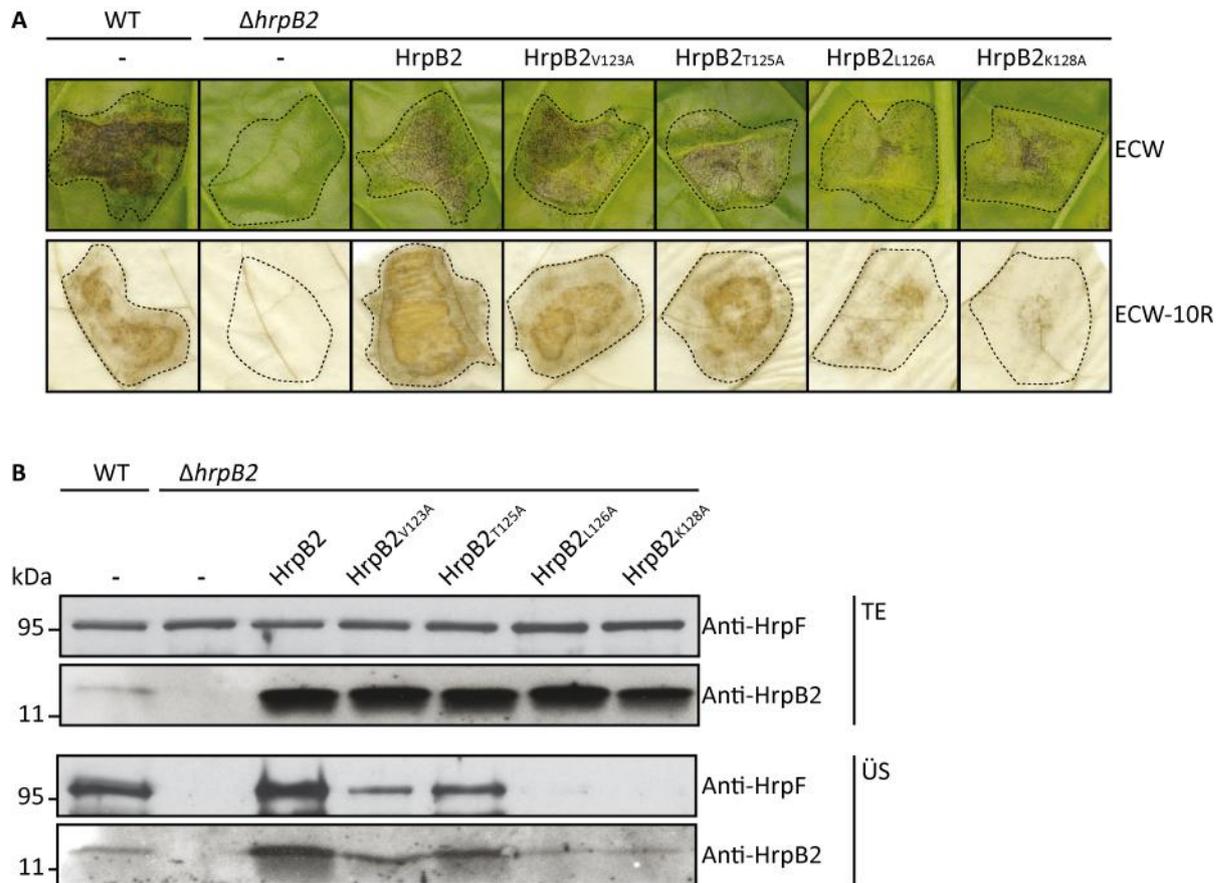


Abbildung 3.8: Komplementationsanalyse mit HrpB2-Derivaten mit Punktmutationen im konservierten VxTLxK-Motiv.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die Plasmide pBRM (-) oder die pBRMhrpB2-Expressionskonstrukte für HrpB2 (HrpB2) bzw. HrpB2-Derivate mit einem Aminosäureaustausch (V123A, T125A, L126A und K128A) enthielten, infiltriert. Die Krankheitssymptome der suszeptiblen Pflanze wurden acht Tage nach der Infiltration dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze ein Tag nach der Infiltration in EtOH gebleicht und dokumentiert. Die *Xcv*-Stämme wurden in die Blätter der suszeptiblen Pflanze mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,1$ und resistenten Pflanze mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,02$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2 in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv* Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die oben genannten Plasmide oder Expressionskonstrukte enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) und HrpB2 mittels HrpB2 spezifischen Antikörpern detektiert.

3.1.5 Einfluss von HrpB2 auf die stabile Assemblierung der T3S-Pili

In weiteren Experimenten sollte mittels EM analysiert werden, ob die konservierten Aminosäuren innerhalb des VxTLxK-Motives von HrpB2 einen Einfluss auf die generelle Assemblierung und Ausbildung der T3S-Pili von *Xcv* besitzen. Zu diesem Zweck wurde der *Xcv*-Stamm 85* und 85* Δ *hrpB2* der das Plasmid pBRM oder *hrpB2*-Expressionskonstrukte enthielt, unter Sekretionsbedingungen auf speziell behandelten Gitterrosten, sogenannte „gold-grids“, inkubiert (2.7 oben), (Weber *et al.* 2005b). Diese speziellen Gitter erleichtern die *in-vitro* Assemblierung von intakten T3S-Pili und ermöglichen deren anschließende Auswertung auf elektronenmikroskopischer Ebene. In Kooperation mit Gerd Hause (Biozentrum, Martin-Luther University Halle-Wittenberg) und der technischen Unterstützung durch Simone Fraas (Biozentrum) wurde die Anzahl der T3S-Pili von annähernd 300 Bakterien je *Xcv*-Stamm mittels EM bestimmt. Hierbei wurden nur intakte und direkt mit den Bakterien assoziierte T3S-Pili in die Zählung und statistische Auswertung aufgenommen. Wie erwartet, wurden keine T3S-Pili beim Stamm 85* Δ *hrpB2* beobachtet (Abbildung 3.9 A), da HrpB2 für die Bildung des extrazellulären T3S-Pilus notwendig ist (Weber *et al.* 2005b). Jedoch wiesen nur ca. 5% der Bakterienzellen vom Wildtypstamm 85* zwei bis drei T3S-Pili und ca. 35% einen intakten T3S-Pilus auf. In ca. 60% der analysierten Bakterienzellen vom Wildtypstamm 85* war der Nachweis von direkt assoziierten T3S-Pili nicht möglich (Abbildung 3.9 B). Da T3S-Pili ähnliche Strukturen häufig in direkter oder näherer Umgebung der Bakterienzellen beobachtet wurden, ist die tatsächliche Anzahl der T3S-Pili vor der Aufbereitung der EM-Gitter für die mikroskopische Aufnahme wahrscheinlich größer und diese brechen während der Probenaufbereitung ab. Die Pilusbildung im Stamm 85* Δ *hrpB2* konnte durch HrpB2, nicht jedoch durch HrpB2 $_{\Delta 123-130}$ und HrpB2 $_{\Delta 123-128}$ wiederhergestellt werden (Abbildung 3.9 A). Die ektopische Expression von *hrpB2* führte sogar zu einer erhöhten Anzahl von Pili im Vergleich zu 85* (Abbildung 3.9 B). In Gegenwart von HrpB2 $_{L126A}$ und HrpB2 $_{K128A}$ war die Anzahl der beobachteten T3S-Pili signifikant reduziert (Abbildung 3.9 B). Dies deutet darauf hin, dass das VxTLxK-Motiv und speziell die Aminosäuren Leucin (L) an Position 126 und Lysin (K) an Position 128 von HrpB2 für eine stabile Assemblierung der T3S-Pili in *Xcv* wichtig sind.

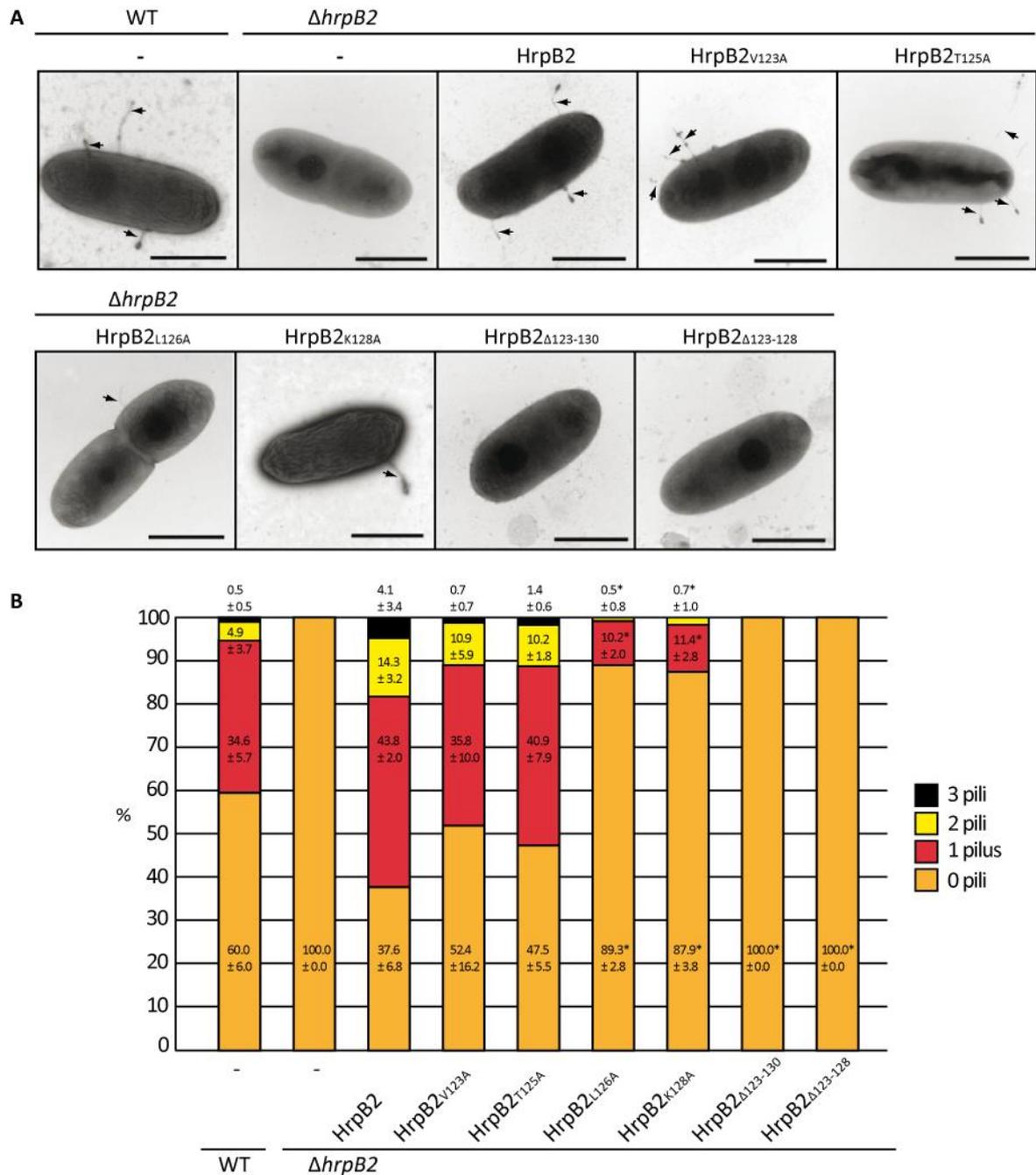


Abbildung 3.9: Einfluss des VxTLxK-Motivs in HrpB2 auf die stabile Assemblierung des T3S-Pilus.

(A) EM-Aufnahmen der *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* Δ *hrpB2* (Δ *hrpB2*), welche die Plasmide pBRM (-) oder die pBRMhrpB2-Expressionskonstrukte für HrpB2 (HrpB2) bzw. HrpB2-Derivate mit einem Aminosäureaustausch (V123A, T125A, L126A und K128A) oder einer Deletion (Δ 123-130 und Δ 123-128) enthielten. Die Bakterien wurden unter Sekretionsbedingungen auf „gold-grids“ inkubiert und für die EM-Aufnahmen negativ-kontrastiert. Schwarze Pfeile zeigen die mit den Bakterien direkt assoziierten T3S-Pili. Der schwarze Balken entspricht 1 μ m. (B) Diagramm der statistischen Auswertung beobachteter T3S-Pili. Die Anzahl der intakten mit der äußeren Membran assoziierten T3S-Pili wurde von annähernd 300 Bakterien je *Xcv*-Stamm und Gitter aus jeweils drei Replikaten bestimmt. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der Zellen mit jeweils 0,1,2 oder 3 Pili an der Gesamtzahl der ausgezählten Bakterien (100 %) pro *Xcv*-Stamm. Signifikante prozentuale Unterschiede im Vergleich zu 85* Δ *hrpB2* (Δ *hrpB2*) mit HrpB2 und nach dem ungepaarten Student's t-Test ($P < 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.6 HrpB2 ist vermutlich keine Komponente des extrazellulären T3S-Pilus

Da HrpB2 entscheidend an der Pilusbildung beteiligt ist, konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei HrpB2 um eine Komponente des Pilus handelt. Als Hauptbestandteil des Pilus wurde in früheren Experimenten jedoch HrpE identifiziert (Weber *et al.* 2005b). Um eine mögliche Funktion von HrpB2 als Pilusprotein zu analysieren, wurde der Wildtypstamm 85* unter Sekretionsbedingungen auf „gold-grids“, inkubiert (2.7 oben) und in Kooperation mit Gerd Hause mittels EM untersucht. Dabei wurden HrpB2 und HrpE mit polyklonalen Antiseren und mit Goldpartikel gekoppelten, sekundären Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 3.10). Nach Inkubation der Proben mit HrpE-spezifischen Antikörpern, konnten direkt mit dem T3S-Pilus assoziierte und perlenschnurartig aneinander gereihete Goldpartikel dokumentiert werden (Abbildung 3.10). Dieses spezifische Muster bestätigt frühere Studien und zeigt dass HrpE ein Bestandteil des T3S-Pilus von *Xcv* ist (Weber *et al.* 2005b). Für HrpB2 konnten dagegen nur wenige Goldpartikel in unmittelbarer Nachbarschaft des T3S-Pili nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Da die Sekretion von HrpB2 in $\Delta hpaC$ signifikant verstärkt ist (Lorenz *et al.* 2008b), wurden weitere EM-Analysen mit dem Stamm 85* $\Delta hpaC$ durchgeführt. In diesem Fall wurden für HrpB2 signifikant mehr Goldpartikel, diese aber im Gegensatz zu HrpE nur in der näheren Umgebung der T3S-Pili, detektiert (Abbildung 3.10). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass HrpB2 im Vergleich zu HrpE wahrscheinlich keine Hauptkomponente des T3S-Pilus ist.

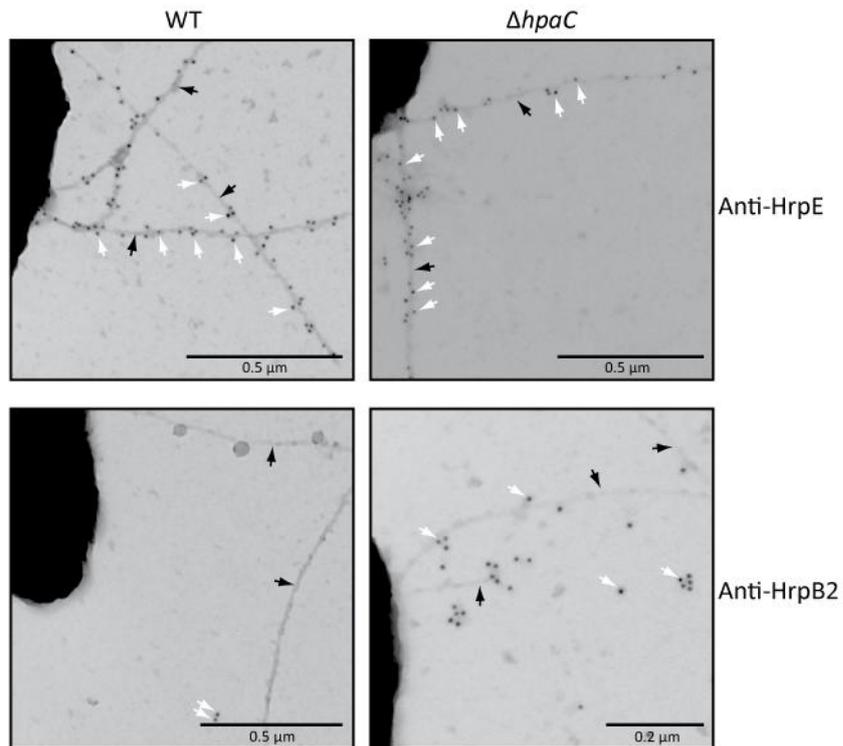


Abbildung 3.10: Immunologische Goldmarkierung von HrpE und HrpB2.

EM-Aufnahmen der *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$). Die Bakterien wurden unter Sekretionsbedingungen auf „gold-grids“ inkubiert und für die EM-Aufnahmen negativ-kontrastiert. Die einzelnen Proben wurden mit primären Antikörpern gegen HrpE (Anti-HrpE) und HrpB2 (Anti-HrpB2) inkubiert. Die spezifische Erkennung der Proteine wurde mit Goldpartikel gekoppelten, sekundären Antikörpern visualisiert (weiße Pfeile) und am EM dokumentiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen T3S-Pili, die direkt mit den Bakterien assoziiert sind.

3.1.7 HrpB2 ist vermutlich im Periplasma von *Xcv* lokalisiert

Da HrpB2 vermutlich kein Pilusprotein ist, sollten seine subzelluläre Lokalisierung in *Xcv* analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde der *Xcv*-Stamm 85* Δ *hrpB2*, welcher Expressionskonstrukte für HrpB2, HrpB2₂₁₋₁₃₀ oder HrpB2 Δ ₁₂₃₋₁₂₈ enthielt, unter T3S-induzierenden Bedingungen angezogen. Mittels Ultrazentrifugation wurden Fraktionen aus Zytoplasma, Periplasma, innere und äußere Membran voneinander separiert und die Proteine in den unterschiedlichen Fraktionen mittels SDS-Page sowie Western-Blot analysiert (2.6 oben) (Thein *et al.* 2010). HrpB2, HrpB2₂₁₋₁₃₀ und HrpB2 Δ ₁₂₃₋₁₂₈ wurden ausschließlich im Gesamtzellextrakt, in der mit Periplasma und äußeren Membran angereicherten Fraktion detektiert, nicht jedoch in der mit Zytoplasma oder mit inneren Membran angereicherten Fraktion (Abbildung 3.11 A). Als Kontrolle wurden die Western-Blots mit Anti-HrcC inkubiert. Entsprechend früherer Beobachtungen war HrcC in allen Fraktionen detektierbar (Abbildung 3.11 A). Bei den in inneren Membran und Periplasma detektierten Proteinen handelt es sich möglicherweise um Transportintermediate von HrcC, welches vermutlich Sec-abhängig über die innere Membran transportiert wird. Die experimentellen Daten deuten an, dass HrpB2 insbesondere im Periplasma sowie der Äußeren Membran lokalisiert ist. Auf die subzelluläre Lokalisierung besitzen die Aminosäuren 123 bis 128 und die 20 N-terminalen Aminosäurereste von HrpB2 hierbei keinen Einfluss. Die Detektion von HrpB2₂₁₋₁₃₀ im Periplasma war unerwartet, da dieses Derivat vom T3SS nicht mehr sekretiert wird (Abbildung 3.3). Um zu überprüfen, ob die subzelluläre Lokalisierung von HrpB2 von einem aktiven T3SS abhängig ist, wurden die Lokalisierungsstudien mit 85-10-Derivaten unter nicht T3S-induzierenden Bedingungen durchgeführt. HrpB2 wurde ektopisch in 85-10 Δ *hrpB2* exprimiert. Die Detektion von HrpB2 erfolgte wiederum hauptsächlich in der mit Periplasma und äußeren Membran angereicherten Fraktion (Abbildung 3.11 B). Dies deutet darauf hin, dass HrpB2 unabhängig vom T3S-System in das Periplasma und der äußeren Membran transportiert wird.

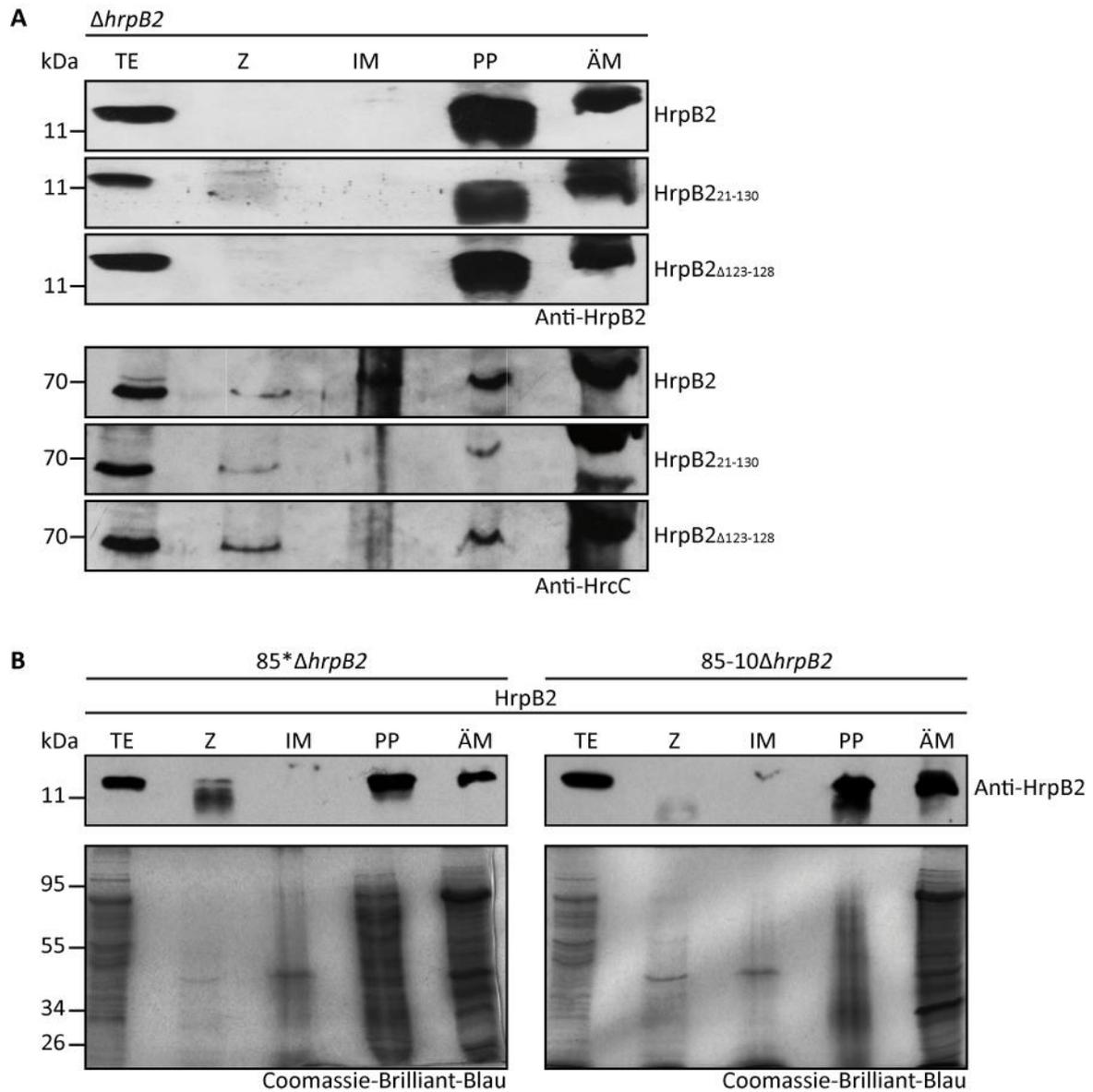


Abbildung 3.11: Die subzelluläre Lokalisierung von HrpB2.

(A) Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von HrpB2 und HrpB2-Derivaten wurde der *Xcv*-Stamm 85**ΔhrpB2* (*ΔhrpB2*) mit pBRMhrpB2-Expressionskonstrukten für HrpB2 (HrpB2) oder HrpB2-Derivaten (HrpB2₂₁₋₁₃₀ und HrpB2_{Δ123-128}) in Sekretionsmedium angezogen. (B) Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von HrpB2 unter nicht-induzierenden Bedingungen wurden die *Xcv* Stämme 85**ΔhrpB2* und 85-10 *ΔhrpB2* mit pBRMhrpB2-Expressionskonstrukt (HrpB2) in komplexen NYG-Medium angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,9 wurden die Bakterien geerntet und Gesamtzellextrakte (TE) hergestellt. Mittels Ultrazentrifugation wurden Zytoplasma (Z), Inneren Membran (IM), Periplasma (PP) und Äußeren Membran (ÄM) voneinander getrennt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (15%) und Western-Blot analysiert. HrpB2 (Anti-HrpB2) und HrcC (Anti-HrcC) wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Aliquots der Fraktionen wurden zusätzlich auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

3.1.8 PrgJ oder YscI übernehmen nicht die funktionelle Rolle von HrpB2

Die periplasmatische Lokalisierung von HrpB2 weist darauf hin, dass es sich bei HrpB2 möglicherweise um eine Komponente ähnlich des vorhergesagten „Inner Rod“ vom T3S-System aus *Yersinia* spp. oder *Salmonella* spp. handelt (Marlovits *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008; Hartmann *et al.* 2012). HrpB2 weist jedoch nur geringfügige Homologie mit YscI aus *Yersinia* spp. oder PrgJ aus *Salmonella* spp. auf (Abbildung 3.12).

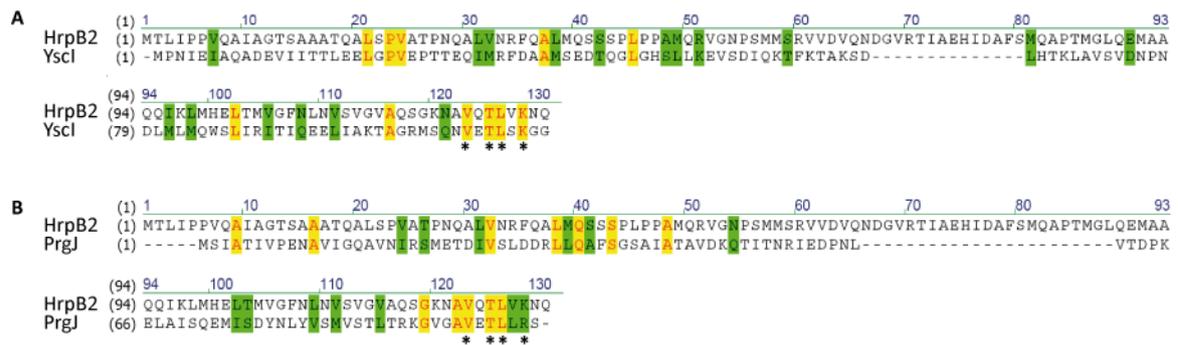


Abbildung 3.12: Vergleich der Aminosäuresequenz von HrpB2 mit YscI und PrgJ.

Aminosäuresequenzvergleich zwischen HrpB2 vom Xcv Stamm 85-10 (UniProtKB/TrEMBL: Q3BYK4) und (A) YscI von *Yersinia enterocolitica* Stamm W22703 (UniProtKB/TrEMBL: Q7BRZ3) und (B) PrgJ aus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* Stamm 14028 (Accession: ACY89885) mittels AlignX (VectorNTI Advance™ 11.0). Identische Aminosäuren sind rot auf gelbem Hintergrund und Aminosäurereste mit vergleichbaren chemischen Eigenschaften sind grün unterlegt. Sterne kennzeichnen die einzelnen Aminosäuren vom VxTLxK-Motiv. Die korrespondierende Aminosäureposition in HrpB2 ist angegeben. Die Aminosäuresequenz von YscI bzw. PrgJ ist jeweils mit 8,5 % identisch zur Aminosäuresequenz von HrpB2.

Um zu überprüfen, ob YscI und PrgJ eine genomische *hrpB2*-Deletionsmutante komplementieren können, wurden beide Gene unter Kontrolle von *lacP* in Fusion mit einer 3-fachen *c-myc*-Epitop kodierenden Sequenz im Stamm 85-10 Δ *hrpB2* und 85* Δ *hrpB2* ektopisch exprimiert. Für Komplementationsstudien wurden die Bakterien in Blätter von suszeptiblen und resistenten Paprikapflanzen inokuliert. Die ektopische Expression von *yscI* oder *prgJ* im Wildtypstamm 85-10 übte keinen sichtbaren Einfluss auf die Symptombildung aus (Daten nicht gezeigt). Beide Gene waren ebenfalls nicht in der Lage den mutanten Phänotyp einer genomischen *hrpB2*-Deletionsmutante zu komplementieren (Abbildung 3.13 A). Dies lag nicht an der Proteinstabilität, da sowohl YscI-c-Myc als auch PrgJ-c-Myc immunologisch in den Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse zeigten die Sekretionsanalysen. So konnte die Sekretionsdefizienz vom Stamm 85* Δ *hrpB2* durch PrgJ-c-Myc und YscI-c-Myc nicht aufgehoben werden (Abbildung 3.13 B). Es besteht die Möglichkeit, dass die translationale Fusion des c-Myc-Epitops mit YscI und PrgJ die Proteinfunktion negativ beeinflusst. Aus diesem Grund wurden die Gene *yscI* bzw. *prgJ* zusätzlich ohne *c-myc*-Epitop kodierenden

Sequenz im Stamm 85-10 Δ *hrpB2* und 85* Δ *hrpB2* ektopisch exprimiert. Die Infektionsexperimente und Sekretionsanalysen zeigten jedoch, dass PrgJ oder YscI den mutanten Phänotyp einer *hrpB2*-Deletionsmutante nicht komplementieren (Abbildung 3.13 A und B). PrgJ oder YscI sind daher vermutlich nicht in der Lage die funktionelle Rolle von HrpB2 zu übernehmen. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob PrgJ-c-Myc und YscI-c-Myc von *Xcv* sekretiert werden können. Jedoch konnte weder für PrgJ-c-Myc oder YscI-c-Myc eine Sekretion in den Kulturüberstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da die Sekretion von PrgJ und YscI im Wildtypstamm 85* möglicherweise vergleichbar zu HrpB2 sehr gering ist, wurden Sekretionsanalysen auch in 85* Δ *hpaC* durchgeführt. Wie im Stamm 85*, konnten PrgJ-c-Myc und YscI-c-Myc jedoch auch in 85* Δ *hpaC* nicht im Kulturüberstand nachgewiesen werden und werden daher von *Xcv* vermutlich nicht sekretiert.

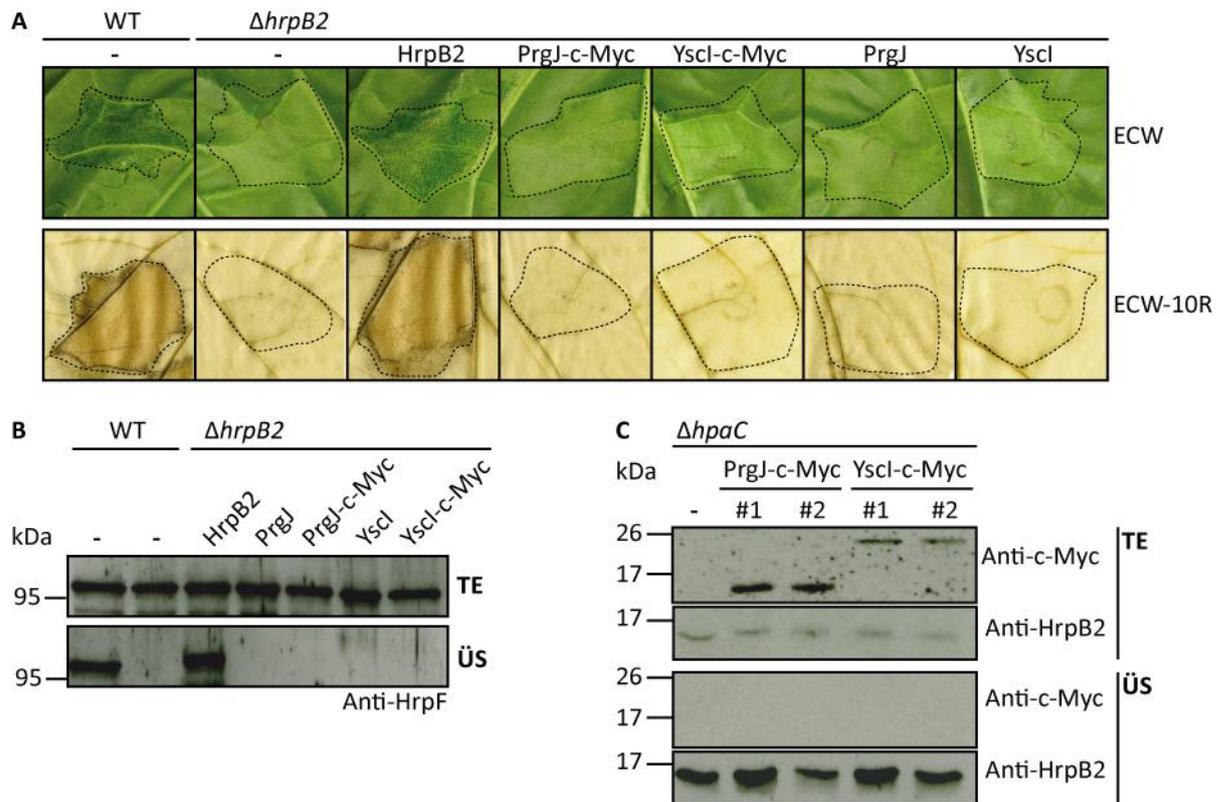


Abbildung 3.13: Funktionelle Analyse von PrgJ und Yscl in *Xcv*.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Susceptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche das Plasmid pBRM (-), das pBRM-Expressionskonstrukte für HrpB2 oder die Expressionskonstrukte für PrgJ-c-Myc bzw. Yscl-c-Myc oder PrgJ bzw. Yscl enthielten, infiltriert. Die Krankheitssymptome bei der susceptiblen Pflanze wurden acht Tage nach der Infiltration dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze zwei Tage nach der Infiltration mit EtOH gebleicht und dokumentiert. Alle *Xcv*-Stämme wurden mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,4$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Ergebnisse der Sekretionsanalyse. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv* Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hrpB2$ ($\Delta hrpB2$), welche die oben genannten Konstrukte enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE (10%) sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) detektiert. (C) Ergebnisse der *in vitro*-Sekretionsanalyse von PrgJ-c-Myc bzw. Yscl-c-Myc in *Xcv*. Der *Xcv* Stamm 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welcher das Plasmid pBRM (-) oder das Expressionskonstrukt für PrgJ-c-Myc bzw. Yscl-c-Myc enthielt, wurde in Sekretionsmedium inkubiert und die Proben wie oben beschrieben analysiert. PrgJ-c-Myc bzw. Yscl-c-Myc wurden durch c-Myc-spezifische Antikörper (Anti-c-Myc) detektiert. Zur Überprüfung der Typ III-abhängigen Sekretion wurde die Membran mit HrpB2-spezifischen Antikörpern (Anti-HrpB2) reinkubiert. #1 und #2 stellen jeweils unabhängige *Xcv*-Konjuganten dar.

3.1.9 HrpB2 interagiert mit HpaC und HrcU₂₆₅₋₃₅₇

In früheren Experimenten konnte bereits eine Interaktion zwischen dem T3S4-Protein HpaC und HrpB2-c-Myc nachgewiesen werden (Lorenz *et al.* 2008b). Um Proteinregionen in HrpB2 zu identifizieren, die maßgeblich an der Interaktion mit HpaC beteiligt sind, wurden GST-, „pull down“-Analysen mit HpaC und N- bzw. C-terminal verkürzten HrpB2-Deletionsderivaten durchgeführt. Hierfür wurden GST-HrpB2, GST-HrpB2₀₁₋₉₀, GST-HrpB2₀₁₋₁₂₂ und GST-HrpB2₉₀₋₁₃₀ an eine Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaC-c-Myc enthält. Wie erwartet, wurden HpaC-c-Myc im Eluat von GST-HrpB2 nicht jedoch von GST nachgewiesen (Abbildung 3.14 A). Im Vergleich zu GST-HrpB2 wurden im Eluat mit GST-HrpB2₀₁₋₉₀ (nicht gezeigt), GST-HrpB2₉₀₋₁₃₀ und GST-HrpB2₀₁₋₁₂₂ reduzierte Proteinmengen von HpaC-c-Myc detektiert (Abbildung 3.14 A). Damit konnte keine für die Interaktion bevorzugte Proteinregion in HrpB2 identifiziert werden, da sowohl N- als auch C-terminale Deletionen einen Einfluss auf die Interaktion haben. Zusätzlich zur Interaktion mit HpaC, sollte ein möglicher Einfluss N- und C-terminaler Proteinregionen von HrpB2 auf die Interaktion mit HrcU₂₆₅₋₃₅₇ analysiert werden. Im Vergleich zu GST-HrpB2 wurden im Eluat mit GST-HrpB2₀₁₋₉₀ reduzierte Proteinmengen von HrcU₂₆₅₋₃₅₇-c-Myc und im Eluat mit GST-HrpB2₉₀₋₁₃₀ kein HrcU₂₆₅₋₃₅₇-c-Myc detektiert (Abbildung 3.14 B). Damit weisen die Daten darauf hin, dass der Bereich von Aminosäureposition 90 bis 130 aus HrpB2 einen Einfluss auf die Affinität zwischen HrpB2 und HrcU₂₆₅₋₃₅₇ besitzt, jedoch selbst für eine effiziente Interaktion mit HrcU₂₆₅₋₃₅₇ nicht ausreicht.

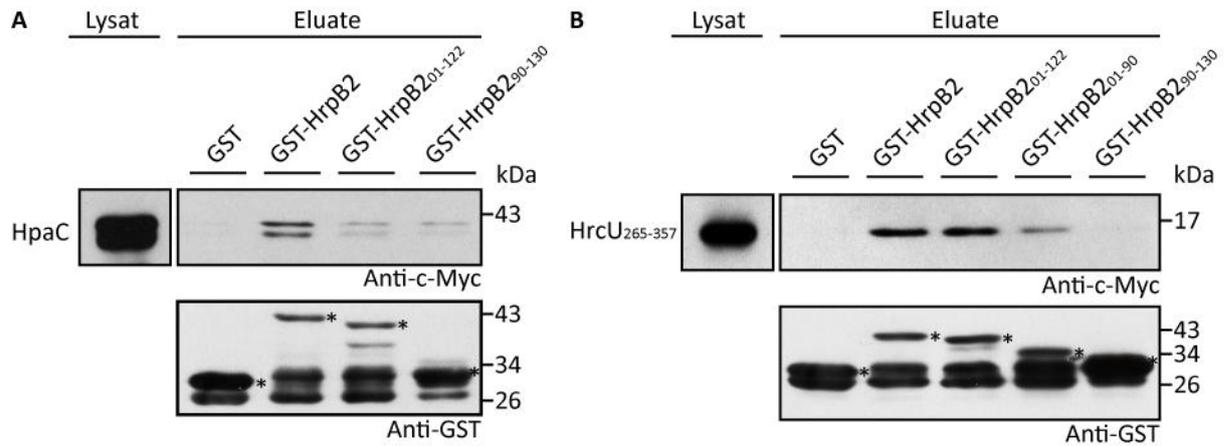


Abbildung 3.14: Nachweis der Interaktion von HrpB2 mit HpaC und HrcU₂₆₅₋₃₅₇.

(A) HrpB2 und HrpB2-Derivate interagieren mit HpaC. Für die GST-„pull down“-Analyse wurden GST, GST-HrpB2, GST-HrpB2₀₁₋₁₂₂, GST-HrpB2₉₀₋₁₃₀ an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaC-c-Myc enthielt. Das Lysat (Gesamtzellextrakt) und die Eluate wurden durch Western-Blot mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern auf verschiedenen Membranen analysiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. (B) HrpB2 und HrpB2-Derivate interagieren mit HrcU₂₆₅₋₃₅₇. Für die GST-„pull down“-Analyse wurden GST und die GST-Fusionsproteine an eine Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HrcU₂₆₅₋₃₅₇-c-Myc enthielt. Das Lysat und die Eluate wurden wie oben beschrieben analysiert.

3.2 HpaC - ein Kontrollprotein des T3S-Systems mit potentieller T3S4-Domäne

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das T3S4-Protein HpaC charakterisiert, welches die effiziente Sekretion von HrpB2 inhibiert, die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen dagegen fördert. Mittels einem "PSI-BLAST" und dem Abgleich von Hydrophobizitätsmuster konnte bereits gezeigt werden, dass die T3S4-Domäne, welche während des Wechsels der Substratspezifität eine entscheidende Rolle spielt, wahrscheinlich nicht ausschließlich auf Proteine aus tierpathogenen Bakterien beschränkt ist (Agrain *et al.* 2005a). Die Ergebnisse aus dieser Studie deuten darauf hin, dass das Protein HpaP (27% identisch zu HpaC) aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *R. solanacearum* im C-terminalen Bereich Sequenzähnlichkeiten mit T3S4-Domänen von bekannten T3S4-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien sowie zu HpaC besitzt (Agrain *et al.* 2005a; Lorenz *et al.* 2008b) (Abbildung 3.15). Homologe Sequenzen zwischen HpaC und T3S4-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien wurden jedoch nicht identifiziert. Um Hinweise für eine mögliche Struktur von HpaC zu erhalten, wurde eine webbasierte, bioinformatische Vorhersage der Sekundärstruktur durchgeführt. Mittels „GLOBPLOT“ (<http://globplot.embl.de/>) konnte in HpaC eine potentielle globuläre Domäne ab der Aminosäureposition 112 bis 113 identifiziert werden. Für die Identifizierung funktioneller Proteinregionen in HpaC, wurden C-Terminal c-Myc-markierte HpaC-Derivate mit sequentiellen 10 Aminosäure umfassenden Deletionen erstellt (Abbildung 3.20). Leider schlug die Erstellung eines Expressionskonstruktes für HpaC_{Δ52-61} auch nach mehrfachen Ansätzen fehl. Die korrekte Amplifikation der entsprechenden Nukleotidsequenz war durch die eingeschränkte Wahl der spezifischen Oligonukleotide nicht ohne Fehler möglich. Aus diesem Grund wurde HpaC_{Δ52-61} aus den weiteren Betrachtungen ausgenommen. Die erstellten Expressionskonstrukte für die HpaC-Deletionsderivate wurden in die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10Δ*hpaC* sowie die *Xcv* 85-10-Derivate 85* und 85*Δ*hpaC* konjugiert und funktionell analysiert.

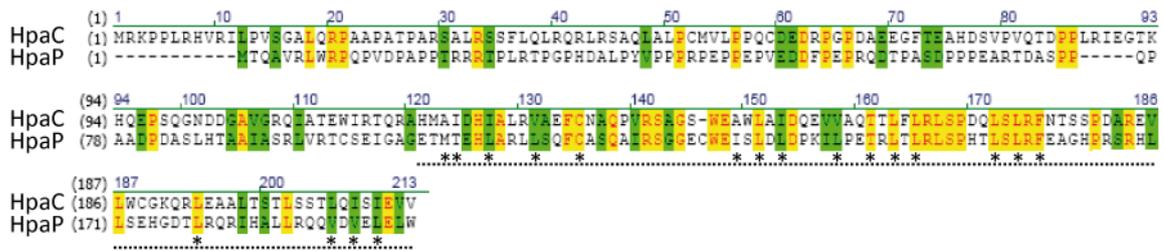


Abbildung 3.15: Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von HpaC aus *Xcv*.

(A) Aminosäuresequenzabgleich zwischen HpaC vom *Xcv* Stamm 85-10 („accession number“ CAJ22055) und HpaP aus *Ralstonia solanacearum* („accession number“ CAB58249) mittels AlignX (VectorNTI Advance™ 11.0). Identische Aminosäuren sind rot auf gelben Hintergrund und Aminosäurereste mit vergleichbaren chemischen Eigenschaften sind grün unterlegt. Die Aminosäureposition von HpaC ist angegeben. HpaC und HpaP besitzen einen Anteil von 27% identischen und 36,2% ähnlichen Aminosäuren. Die C-terminale Proteinregion von HpaP besitzt eine vorhergesagte T3S4-Domäne (gepunktete Linie). Die mit Sternen gekennzeichneten Aminosäurereste sind zwischen HpaP und anderen Proteinen mit einer T3S4-Domäne konserviert (Agrain 2005).

3.2.1 Identifizierung funktioneller Proteinregionen

Durch Infektionsstudien wurden die HpaC-Derivate auf ihre Fähigkeit getestet, den mutanten Phänotyp vom Stamm 85-10 Δ *hpaC* zu komplementieren. Die Deletion von *hpaC* führt zu einer reduzierten Virulenz von *Xcv*, welche sich durch sichtbar reduzierte Krankheitssymptome und HR nach der Infiltration in suszeptiblen und resistenten Paprikapflanzen nachweisen lässt (Büttner *et al.* 2006), (Abbildung 3.16). Wie in früheren Studien bereits gezeigt, wurde der mutante Phänotyp der genomischen *hpaC*-Deletionsmutante durch ectopischen Expression von *hpaC* komplementiert (Büttner *et al.* 2006), (Abbildung 3.16). Komplementation wurde ebenfalls für HpaC-Deletionsderivate beobachtet mit Deletionen im Bereich von Aminosäureposition 42 bis 101 (Abbildung 3.16). Deletionen im Bereich von Aminosäureposition 02 bis 41 und 102 bis 212 führten dagegen zu einem Funktionsverlust von HpaC (Abbildung 3.16). Dies ist nicht auf einen dominant-negativen Effekt dieser Derivate zurückzuführen, da die Expression aller *hpaC*-Derivate im Wildtypstamm 85-10 nicht zu einer Beeinträchtigung der Symptomausbildung auf suszeptiblen und resistenten Paprikapflanzen führte. (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls wurde die stabile Expression von *hpaC* und der *hpaC*-Deletionsderivate mittels c-Myc-spezifischer Antikörper überprüft. Im Vergleich zu HpaC wurden für die HpaC-Deletionsderivate keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge im Gesamtzellextrakt detektiert (Daten nicht gezeigt). Damit zeigen die Ergebnisse der Infektionsstudien, dass im Gegensatz zur zentralen Proteinregion (Aminosäureposition 42 bis 101), die N-terminalen- (Aminosäureposition 02 bis 41) und C-terminalen Aminosäurebereiche (Aminosäureposition 102 bis 212) aus HpaC

für die Unterstützung der Proteinfunktion von HpaC notwendig sind. Neben Infektionsexperimenten sollte durch Sekretionsstudien überprüft werden, inwieweit die reduzierte Sekretion von HrpF und verstärkte Sekretion von HrpB2 in 85* Δ *hpaC* durch die erstellten HpaC-Deletionsderivate komplementiert werden kann (Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008b). Die Sekretionsanalysen wurden wie zuvor beschrieben in *Xcv*-Stämmen mit einer konstitutiv aktiven Version von HrpG (HrpG*) durchgeführt. Nach Induktion der T3S wurden die Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände auf die Anwesenheit von HrpF und HrpB2 untersucht. Die Sekretion von HrpF in der genomischen *hpaC*-Deletionsmutante konnte durch HpaC und HpaC-Deletionsderivate mit Deletionen im Bereich der Positionen 42 bis 101 partiell oder vollständig komplementiert werden (Abbildung 3.17). Im Gegensatz dazu wurde die Sekretion von HrpF durch HpaC-Deletionsderivate mit Deletionen in der Region von der Aminosäure 02 bis 41 sowie 102 bis 212 nicht wiederhergestellt (Abbildung 3.17). Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Infektionsanalysen. Im Gegensatz zu HrpF wird HrpB2 in 85* Δ *hpaC* verstärkt sekretiert. Dies konnte durch Expression von *hpaC* nicht jedoch der meisten *hpaC*-Deletionsderivate komplementiert werden (Abbildung 3.17). Ein dominat-negativer Einfluss der HpaC-Deletionsderivate im *Xcv*-Stamm 85*auf die Typ III-abhängige Sekretion von HrpF oder HrpB2 wurde nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aminosäuren 42 bis 101 einen Einfluss auf die Sekretion von HrpB2 besitzen, jedoch die Kontrolle der Sekretion von HrpB2 und HrpF durch HpaC vermutlich unterschiedlichen Mechanismen unterliegt. HpaC selbst wird wahrscheinlich nicht Typ III-abhängig sekretiert, da weder HpaC noch die HpaC-Deletionsderivate im Kulturüberstand von 85* Δ *hpaC* detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

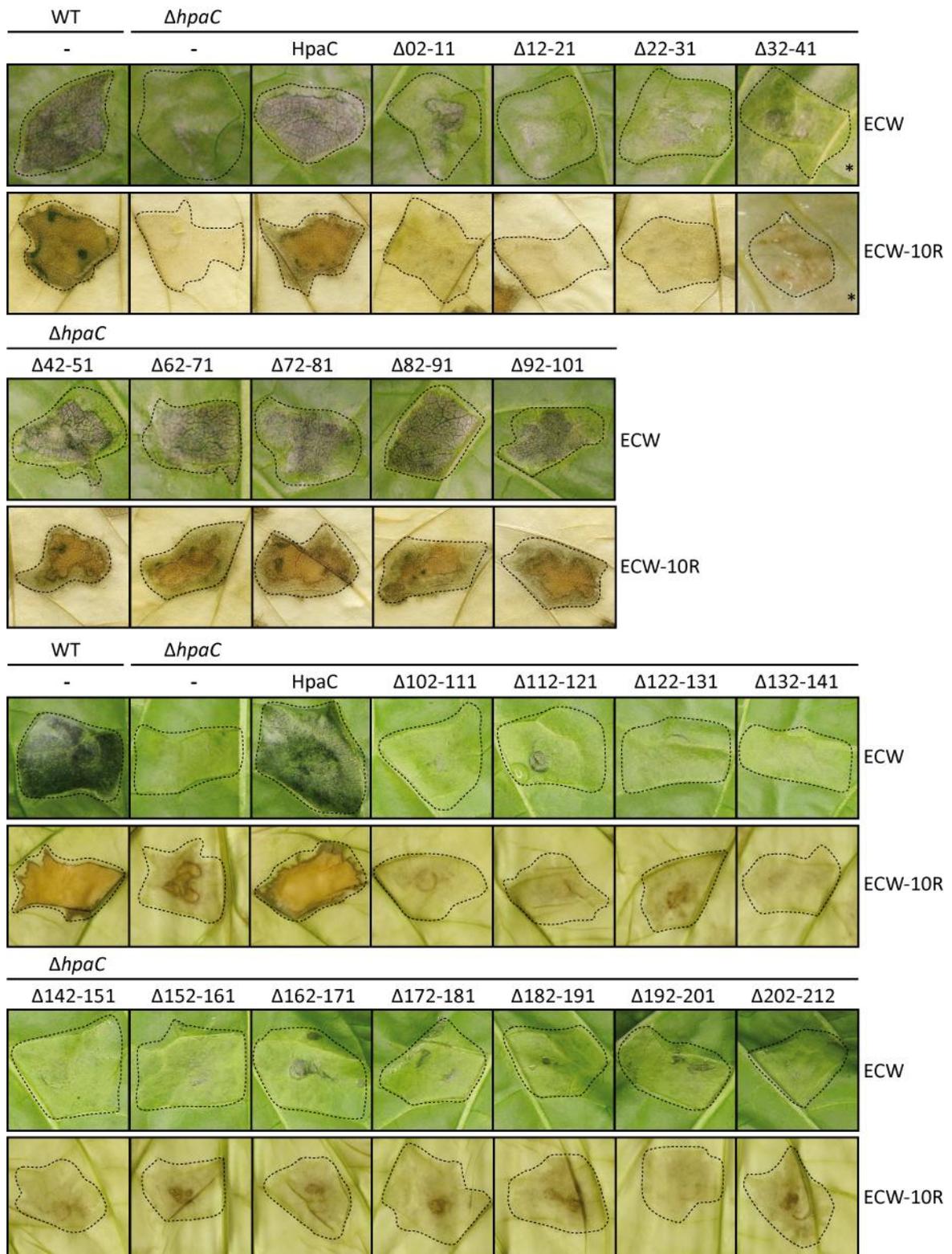


Abbildung 3.16: Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (1).

Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Plasmide pDGW4M (-) oder Expressionskonstrukte für HpaC bzw. HpaC-Deletionsderivate ($\Delta 02-11$ = Deletion von Aminosäureposition 02 bis 11) enthielten, infiltriert. Die Dokumentation der Symptome bei der suszeptiblen Pflanze erfolgte acht Tage nach der Infiltration. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanze drei Tage nach der Infiltration in EtOH gebleicht und dokumentiert. Alle *Xcv*-Stämme wurden mit einer Bakteriendichte $OD_{600} = 0,2$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. Stern kennzeichnet eine unabhängige Inokulation.

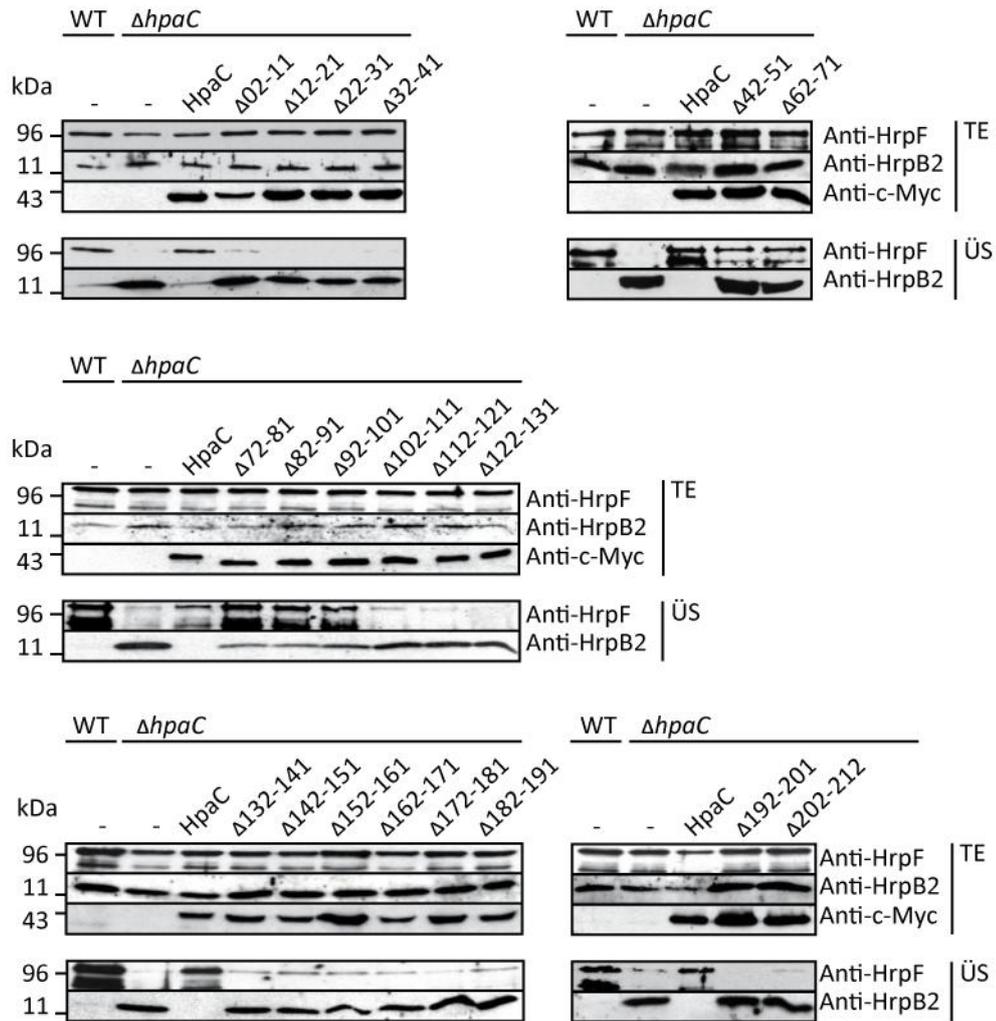


Abbildung 3.17: Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (2).

Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2 in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Plasmide pDGW4M (-) oder Expressionskonstrukte für HpaC bzw. HpaC-Deletionsderivate ($\Delta 02-11$ = Deletion von Aminosäureposition 02 bis 11) enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden voneinander getrennt und anschließend durch SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) bzw. HrpB2 durch HrpB2-spezifische Antikörper und HpaC mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) detektiert. Die Bande oberhalb der 95 kDa entspricht HrpF und weitere Signale stellen Degradationsprodukte von HrpF dar.

Auf Grundlage der Ergebnisse der Komplementationsanalysen und der Hinweise aus dem Aminosäuresequenzvergleich (Abbildung 3.15) wurden weitere HpaC-Deletionsderivate erstellt, die in den Aminosäuren 42 bis 101 bzw. 62 bis 91 oder 164 bis 168 bzw. 171 bis 175 deletiert sind (Abbildung 3.20) und analog analysiert (Abbildung 3.18). Infektionsstudien und Sekretionsanalysen zeigten, dass die Deletion der Aminosäuren 42 bis 101 bzw. 62 bis 91 nicht zu Beeinträchtigung der Proteinfunktion von HpaC führte (Abbildung 3.18 A und C). Dagegen komplementierten die Derivate HpaC $_{\Delta 164-168}$ und HpaC $_{\Delta 171-175}$ den mutanten Phänotyp nicht, was für eine essentielle Bedeutung der Region 164 bis 168 und 171 bis 175 spricht (Abbildung 3.18 A und C).

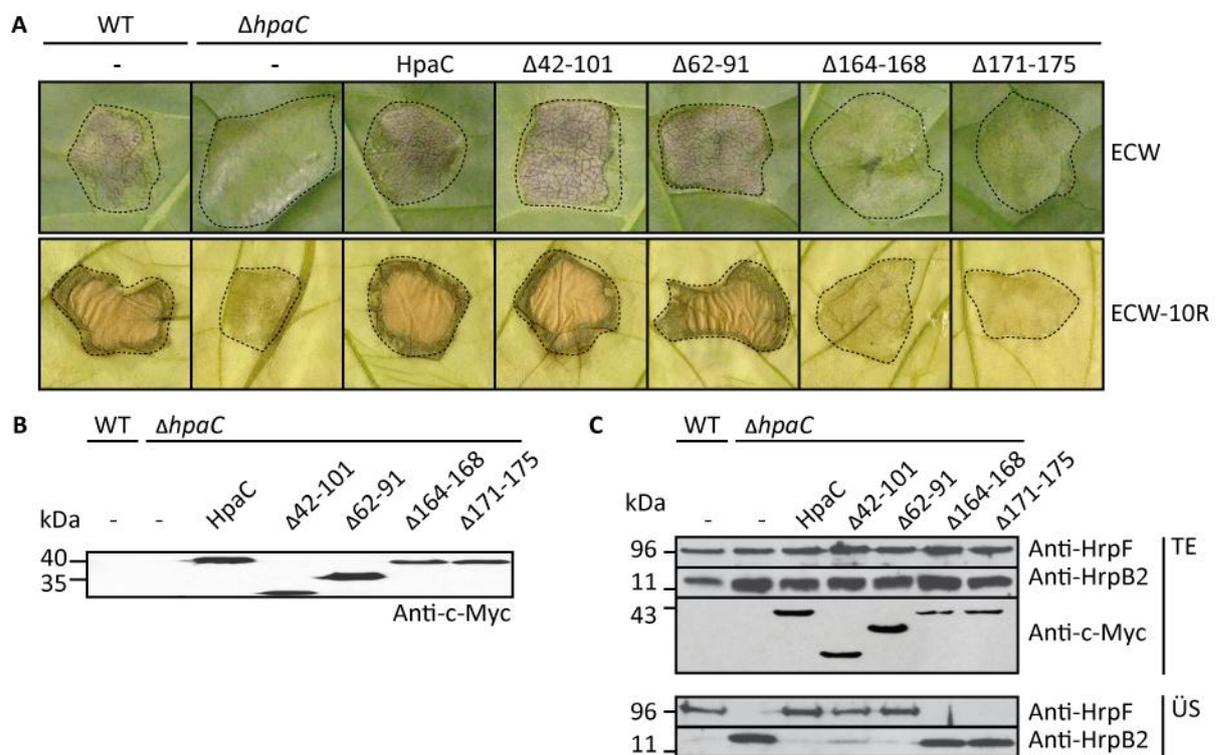


Abbildung 3.18: Komplementationsanalyse mit den erstellten HpaC-Deletionsderivaten (3).

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Plasmide pBRM (-) oder - Expressionskonstrukte für HpaC (HpaC) bzw. HpaC-Deletionsderivate ($\Delta 42-101$ = Deletion von Aminosäureposition 42 bis 101) enthielten, infiltriert. Krankheitssymptome der suszeptiblen Pflanze wurden sechs Tage nach der Infiltration dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden Blätter der resistenten Pflanze drei Tage nach der Infiltration in EtOH gebleicht. Die Blätter der suszeptiblen Pflanze wurden mit einer $OD_{600} = 0,1$ und resistenten Pflanze mit $OD_{600} = 0,02$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Proteinexpression. Die in A analysierten *Xcv*-Stämme wurden in NYG-Medium über Nacht angezogen und Gesamtzellextrakte mittels Western-Blot analysiert. (C) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Expressionskonstrukte für HpaC enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) bzw. HrpB2 durch HrpB2-spezifische Antikörper und HpaC mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) detektiert.

3.2.2 Die Bindestelle von HrcU₂₅₅₋₃₅₇ ist in der C-terminalen Region von HpaC lokalisiert

In früheren Experimenten konnte bereits die Interaktion zwischen dem T3S4-Protein HpaC und der C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne von HrcU (HrcU₂₅₅₋₃₅₇) nachgewiesen werden (Lorenz *et al.* 2008b). Um Regionen und Aminosäurereste in HpaC zu identifizieren, die maßgeblich an der Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ beteiligt sind, wurden die HpaC-Deletionsderivate mittels GST-„pull down“-Analyse analysiert. Aus diesem Grund wurden GST und das Fusionsprotein GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ an eine Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaC-c-Myc oder Deletionsderivate davon enthielten (Abbildung 3.19). Eine spezifische Interaktion mit dem Fusionsprotein GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ konnte für alle HpaC-Deletionsderivate mit Deletionen im Bereich der Aminosäuren von Position 02 bis 121 gezeigt werden (Abbildung 3.19). Im Vergleich zu HpaC war jedoch die detektierte Proteinmenge für HpaC Δ ₁₁₂₋₁₂₁ im Eluat mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu konnte kein HpaC-Deletionsderivat mit einer Deletion im Bereich von Aminosäure 122 bis 212 im Eluat mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ nachgewiesen werden (Abbildung 3.19 A). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war die Interaktion zwischen HpaC und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ auch bei Deletion der Aminosäuren 62 bis 91 nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.19 B). HpaC-Derivate mit Deletionen im Bereich der Aminosäuren 164 bis 168 oder 171 bis 175 waren dagegen nicht mehr im Eluat mit GST HrcU₂₅₅₋₃₅₇ nachweisbar (Abbildung 3.19 B). Die Analyse der Interaktion zwischen HpaC-Deletionsderivaten und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ zeigt, dass die C-terminale Region von HpaC im Bereich der Aminosäuren 112 bis 212 für eine stabile Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ notwendig ist, wohingegen die N-terminale und zentrale Region von HpaC bis zur Aminosäure 111 für die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ nicht erforderlich sind (Abbildung 3.20).

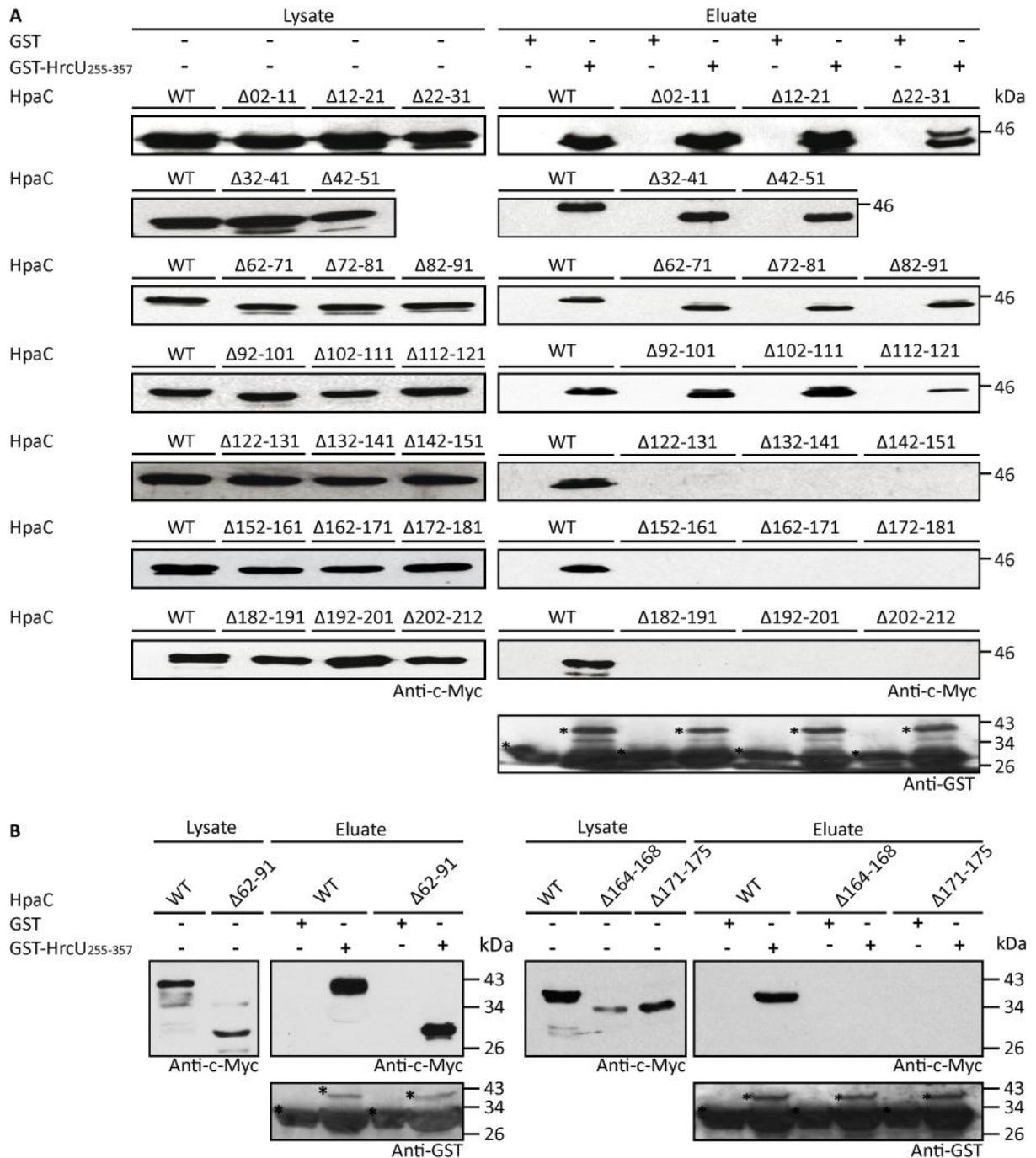


Abbildung 3.19: Interaktionsanalyse zwischen HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und HpaC-Derivaten.

(A) Ergebnisse der Interaktionsstudie zwischen HpaC-Derivaten und HrcU₂₅₅₋₃₅₇. Für die GST-„pull down“-Analyse wurden GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaC-c-Myc (WT) oder die HpaC-Deletionsderivate (Δ) enthielten. Lysate sowie Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. HpaC-Derivate wurden mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) und GST oder GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ mittels GST-spezifischer Antikörper (Anti-GST) detektiert. Ein Nachweis der GST-Fusionsproteine ist an einem Western-Blot repräsentativ gezeigt und wurde für jeden GST-„pull down“ mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. Antikörperreaktionen wurde mittels Chemilumineszenz visualisiert. (B) Ergebnisse der Interaktionsstudie zwischen HpaC-Deletionsderivaten und HrcU₂₅₅₋₃₅₇. Lysate und Eluate wurden wie oben beschrieben analysiert.

3.2.3 Zusammenfassung: Identifizierung funktioneller Proteinregionen

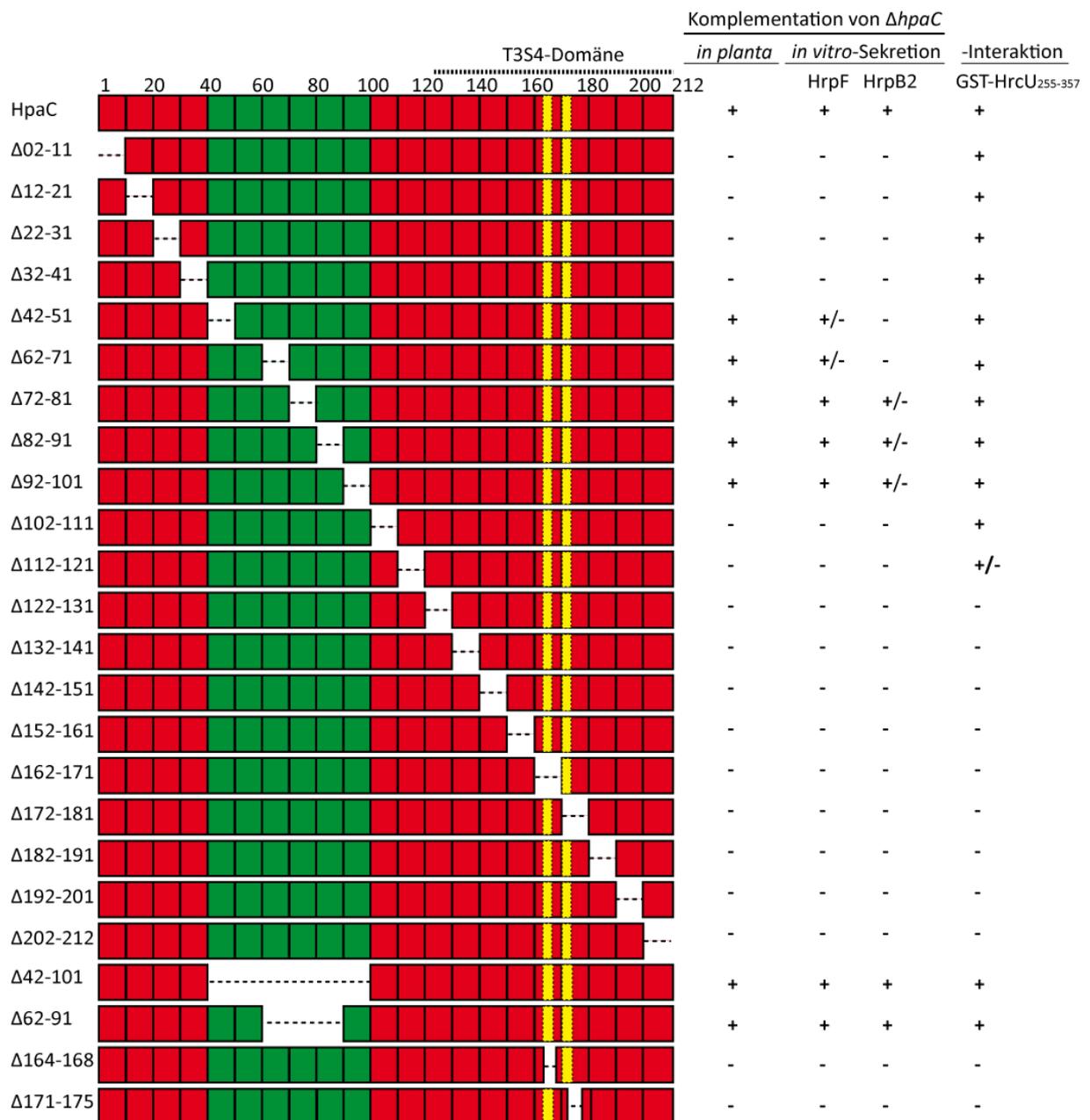


Abbildung 3.20: Zusammenfassung: Identifizierung funktioneller Proteinregionen in HpaC.

Übersicht der in dieser Studie funktional analysierten HpaC-Deletionsderivate. Zur Identifizierung funktioneller Proteinregionen in HpaC wurde die Aminosäuresequenz in 21 Blöcke unterteilt. Einzelne Blöcke entsprechen 10 bzw. 11 Aminosäuren, gestrichelte Linien entsprechen Deletionen (Δ) und die Zahlen entsprechen der Aminosäureposition. Die gepunktet Linie markiert die Region in HpaC, welche die vorhergesagte T3S4-Domäne einschließt. Essentielle Regionen in HpaC sind rot, Regionen ohne Einfluss auf die Proteinfunktion sind grün unterlegt. Gelbe Bereiche in HpaC zeigen die zwischen HpaC und HpaP konservierten Aminosäurereste. C-terminal c-Myc-Epitop markierte HpaC-Derivate wurden im *Xcv*-Stamm 85-10 $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$) getestet, den mutanten Phänotyp bezüglich Krankheitssymptome und HR in Paprikapflanzen zu komplementieren. Zur Analyse der HrpF- und HrpB2-Sekretion wurden die *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche HpaC-c-Myc oder Deletionsderivate enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Um die Interaktion zwischen GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und HpaC-Derivaten zu studieren, wurden GST-„pull-down“-Analysen durchgeführt. (+) Komplementation der Krankheitssymptome und HR *in planta*, Komplementation von HrpF- und HrpB2-Sekretion *in vitro* sowie Interaktion von HpaC-c-Myc Derivaten mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇; (-) keine Komplementation der Symptome *in planta*, reduzierte HrpF-Sekretion bzw. Übersekretion von HrpB2 *in vitro* und keine nachweisbare Interaktion von HpaC-c-Myc Derivaten mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇; (+/-) partielle Komplementation bzw. reduzierte Interaktion von HpaC-c-Myc mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇.

3.2.4 Charakterisierung der T3S4-Domäne von HpaC.

Nach experimentellen Hinweisen auf die Beteiligung konservierter Aminosäurereste innerhalb der T3S4-Domäne von HpaC an der Virulenz und Kontrolle der Typ III-abhängigen Sekretion von *Xcv* sowie der effizienten Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ (Abbildung 3.20), sollte die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste und die funktionelle Rolle der potentiellen T3S4-Domäne von HpaC in *Xcv* charakterisiert werden. Hierfür wurden Derivate von HpaC-c-Myc mit einzelnen Aminosäureaustauschen in den konservierten Aminosäureresten Leucin an der Position 164, 171, 173 und Phenylalanin an der Position 175 zu Alanin erstellt. Zusätzlich wurde ein weiteres Derivat erstellt, welches lediglich die Aminosäuresequenz der C-terminalen Region aus HpaC (Aminosäure 112 bis 212) mit der angenommenen T3S4-Domäne enthält. Durch HpaC_{Δ02-111} sollte überprüft werden, ob die Aminosäuresequenz 112 bis 212 aus HpaC einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-System in einer genomischen *hpaC*-Deletionsmutante induziert. Wie in vorherigen Infektionsstudien und Sekretionsanalysen beschrieben, wurde die Funktionalität der erstellten HpaC-Derivate in *Xcv* getestet. Infektionsexperimente zeigten, dass HpaC-Derivate mit einem Aminosäureaustausch an der Position 164, 171 oder 173 den mutanten Phänotyp einer genomischen *hpaC*-Deletionsmutante bezüglich Krankheitssymptome und HR komplementierten (Abbildung 3.21 A). Im Gegensatz dazu konnte HpaC_{F175A} die Virulenz von 85-10Δ*hpaC* nur partiell wiederherstellen (Abbildung 3.21 A). Die Deletion der Aminosäuren bis zur Position 111 führte hingegen zu einem vollständigen Funktionsverlust von HpaC (Abbildung 3.21 A). Die reduzierte Sekretion von HrpF und Übersekretion von HrpB2 in 85*Δ*hpaC* konnte durch HpaC-Derivate mit Aminosäureaustausche an den Positionen 164, 171 und 173 komplementiert werden (Abbildung 3.21 B). Dagegen komplementierte das Derivat HpaC_{F175A} den mutanten Phänotyp von 85*Δ*hpaC* nicht vollständig, was mit vorherigen Infektionsexperimenten übereinstimmt und für eine essentielle Bedeutung des konservierten Phenylalanin während der Kontrolle des Wechsels von frühen zu späten Substraten des T3S-System spricht. HpaC_{Δ02-111} inhibierte in 85*Δ*hpaC* unerwartet die verstärkte Sekretion von HrpB2 (Abbildung 3.21 B). Dieses Ergebnis ist vermutlich mit einen dominant-negativen Einfluss von HpaC_{Δ02-111} in *Xcv* zu begründen, da die ektopische Expression von *hpaC*_{Δ02-111} im Wildtypstamm 85* ebenfalls zu einer reduzierten Sekretion von HrpF und HrpB2 führte (Abbildung 3.21 B). In Infektionsstudien der Stämme 85-10 und 85* mit HpaC_{Δ02-111} wurde jedoch kein signifikanter Einfluss auf die bakterielle Virulenz beobachtet (Schulz und Büttner 2011). Die Ergebnisse der Infektionsexperimente und Sekretionsanalysen deuten darauf hin, dass die T3S4-Domäne allein für die Proteinfunktion von HpaC nicht ausreicht und die

ektopische Expression der T3S4-Domäne einen negativen Einfluss auf die Kontrolle der Typ III-abhängigen Sekretion von *Xcv* besitzt.

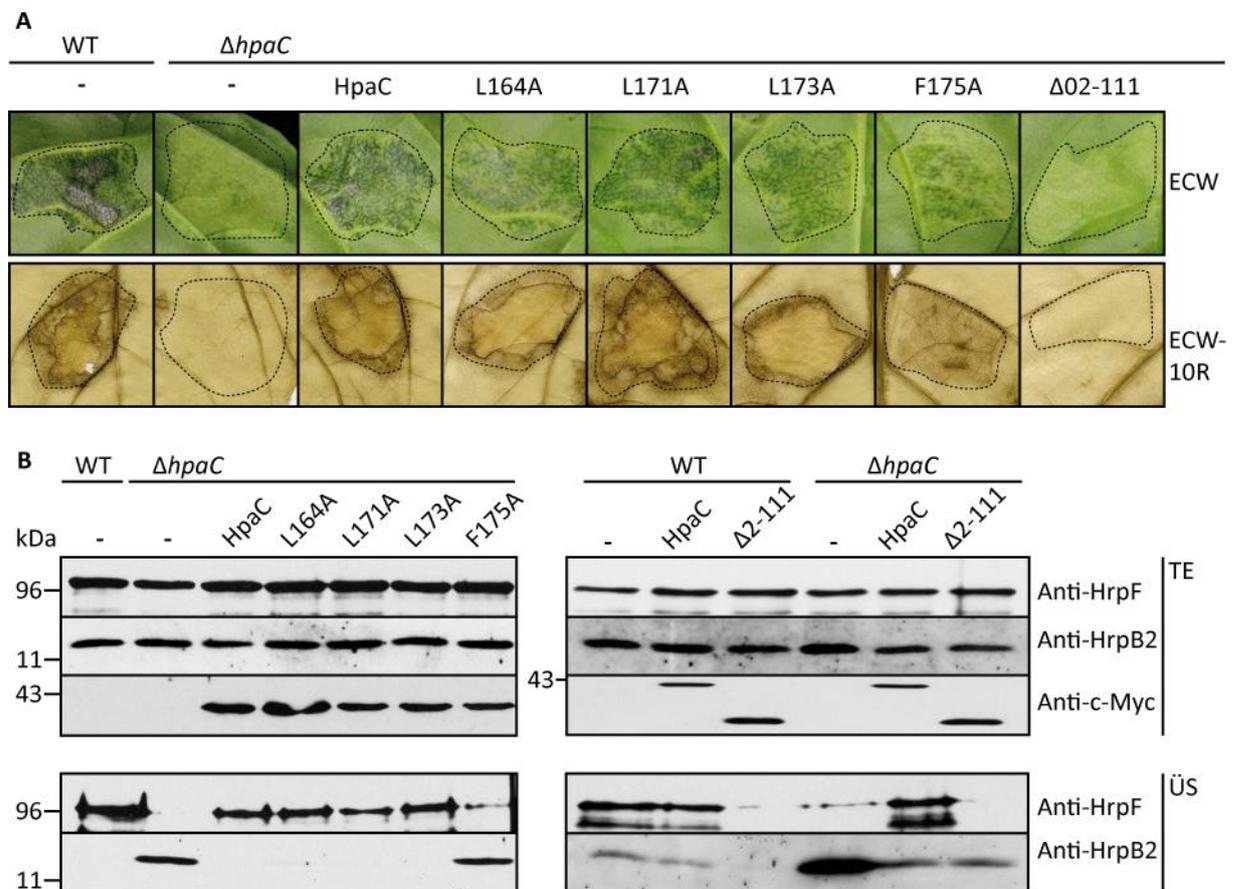


Abbildung 3.21: Komplementationsanalyse mit HpaC-Punktmutanten und der T3S4-Domäne.

(A) Ergebnisse der Infektionsstudien. Suszeptible (ECW) und resistente (ECW-10R) Paprikapflanzen wurden mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (WT) und 85-10 $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die Plasmide pBRM (-) oder Expressionskonstrukte für HpaC (HpaC) bzw. HpaC-Derivate (L164A, L171A, L173A, F175A bzw. $\Delta 02-111$) enthielten, infiltriert. Punktmutationen führten an der angegebenen Aminosäureposition zu einem Austausch zu Alanin. Krankheitssymptome der suszeptiblen Pflanze wurden fünf Tage nach der Infiltration dokumentiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden Blätter der resistenten Pflanze zwei Tage nach der Infiltration in EtOH gebleicht. Die Blätter der suszeptiblen und resistenten Pflanze wurden mit einer $OD_{600} = 0,1$ inokuliert. Markierte Blattbereiche kennzeichnen die Inokulationsfläche. (B) Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2 in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv* Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche die oben angegebenen Expressionskonstrukte für HpaC enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) bzw. HrpB2 durch HrpB2-spezifische Antikörper und HpaC mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) detektiert. Die Antikörperreaktionen wurden durch Chemilumineszenz visualisiert.

3.2.5 Einfluss von Punktmutationen in der T3S4-Domäne von HpaC auf die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ und T3S von *Xcv*

Nach Hinweisen dass die C-terminale Region von HpaC für eine stabile Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ eine wichtige Rolle spielt, sollte die Beteiligung der T3S4-Domäne aus HpaC und der unter T3S4-Proteinen konservierten Aminosäuren mittels GST-„pull down“-Analyse wie oben beschrieben untersucht werden. HpaC-c-Myc sowie Derivate mit einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Alanin an der Position 164, 171 und 173 konnten im Eluat mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ aber nicht mit GST detektiert werden (Abbildung 3.22 A). Die im Eluat nachgewiesenen Proteinmengen von HpaC_{L164A}, HpaC_{L171A} und HpaC_{L164A} waren jedoch im Vergleich zu HpaC deutlich reduziert (Abbildung 3.22 A). Im Gegensatz dazu konnte das HpaC-Derivat mit dem Austausch des konservierten Phenylalanins an der Position 175 weder im Eluat mit GST noch GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ detektiert werden (Abbildung 3.22 A). Die Ergebnisse zeigen, dass Punktmutationen in HpaC, welche zu einem Aminosäureaustausch an der Position 164, 171 oder 173 führen, die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ beeinträchtigt. Ein Austausch des konservierten Phenylalanins an Position 175 hingegen verhinderte die Bindung von HrcU₂₅₅₋₃₅₇ vollständig. Um die direkte Interaktion zwischen der T3S4-Domäne von HpaC und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ zu analysieren, wurden GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ zusätzlich mit einem Lysat inkubiert, welches das HpaC-Deletionsderivat HpaC_{Δ02-111} enthielt. In den Eluaten mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ konnten HpaC und das Deletionsderivat HpaC_{Δ02-111} in vergleichbaren Proteinmengen nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 B). Da keines der beiden HpaC-Derivate im Eluat mit GST detektiert wurde, kann die Interaktion von HpaC_{Δ02-111} und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ als spezifisch betrachtet werden. Der Einfluss der konservierten Aminosäurereste Leucin und Phenylalanin an der Position 171 bzw. 175 auf die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ sollte dabei auch in diesem HpaC-Deletionsderivat überprüft werden. Daher wurden in HpaC_{Δ02-111}-c-Myc zusätzlich Punktmutationen eingeführt, welche den erwähnten Aminosäureaustausch zur Folge hatten und mittels GST-„pull-down“ analysiert. HpaC_{Δ02-111 L171A} und HpaC_{Δ02-111 F175A} konnten im Gegensatz zu HpaC_{Δ02-111} im Eluat mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ nicht detektiert werden (Abbildung 3.22 B). Die GST-„pull-down“ Analysen bestätigen, dass der Aminosäureaustausch an der Position 171 und 175 in HpaC_{Δ02-111} die effiziente Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ negativ beeinflusst und zeigen, dass die T3S4-Domäne ausreichend für die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ ist. Daher sollte zusätzlich der Zusammenhang zwischen der Interaktion von HrcU₂₅₅₋₃₅₇ mit der T3S4-Domäne und dem negativen Einfluss von HpaC_{Δ02-111} auf die Kontrolle der Typ III-abhängige Sekretion von *Xcv* untersucht werden. Interessanterweise zeigten Sekretionsexperimente mit den Stämmen 85*

und 85* $\Delta hpaC$, dass der dominant-negative Einfluss von HpaC $_{\Delta 02-111}$ durch den Aminosäureaustausch L171A und F175A vollständig aufgehoben wird (Abbildung 3.23).

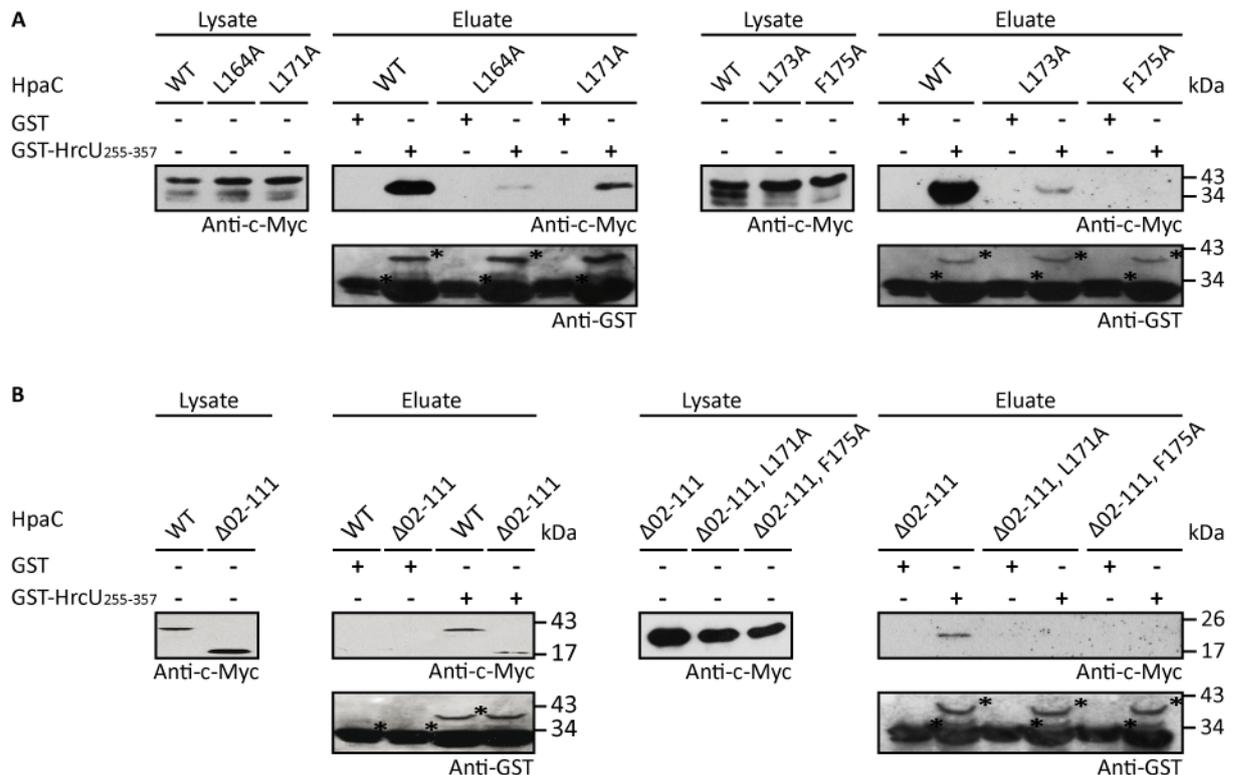


Abbildung 3.22: Interaktionsanalyse zwischen HpaC-Derivaten mit Punktmutationen der T354-Domäne von HpaC und HrcU₂₅₅₋₃₅₇.

Ergebnisse der Protein-Protein Interaktionsstudien von HpaC-Derivaten und HrcU₂₅₅₋₃₅₇. Für die GST-„pull down“-Analysen wurden GST und GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaC-c-Myc (WT) oder Derivate mit (A) einem Aminosäureaustausch (L164A, L171A, L173A, F175A) oder (B) das HpaC-Deletionsderivat (Δ 02-111) bzw. HpaC _{Δ 02-111}-Derivate mit einem Aminosäureaustausch (Δ 02-111, L171A und Δ 02-111, F175A) enthielten. Lysate sowie Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. HpaC-Derivate wurden mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) und GST oder GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ mittels GST-spezifischer Antikörper (Anti-GST) detektiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar.

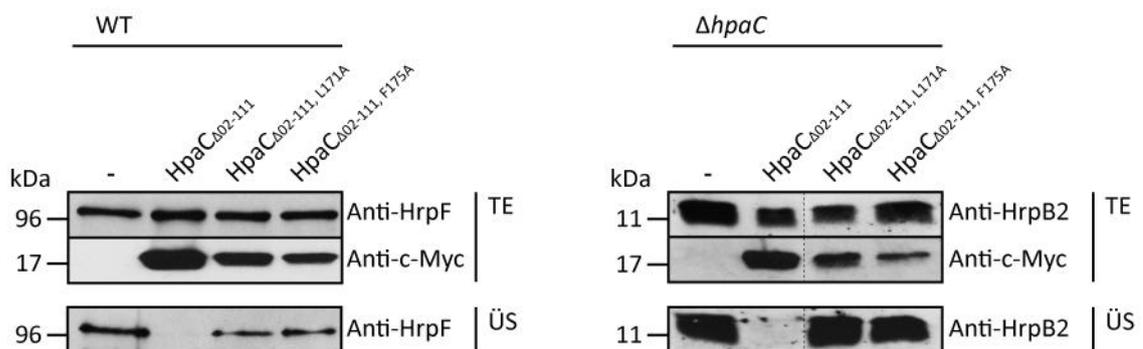


Abbildung 3.23: Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2.

Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion von HrpF und HrpB2 in *Xcv*. Für die *in vitro*-Sekretionsanalyse wurden die *Xcv* Stämme 85* (WT) und 85* Δ hpaC (Δ hpaC), welche die Plasmide pBRM (-) oder Expressionskonstrukte für HpaC _{Δ 02-111}-c-Myc (HpaC _{Δ 02-111}) oder HpaC _{Δ 02-111}-Derivate (HpaC _{Δ 02-111, L171A} oder HpaC _{Δ 02-111, F175A}) enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (TE) sowie Kulturüberstände (ÜS) wurden mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert. HrpF wurde durch HrpF-spezifische Antikörper (Anti-HrpF) bzw. HrpB2 durch HrpB2-spezifische Antikörper und HpaC mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) detektiert.

3.2.6 Selbstinteraktion von HpaC wird durch die C-terminale Region unterstützt.

In einer früheren Studie zur Protein-Protein-Interaktion von HpaC konnte bereits gezeigt werden, dass HpaC die Fähigkeit besitzt mit mindestens einem weiteren HpaC-Protein eine stabile Interaktion einzugehen. (Büttner *et al.* 2006). Bisher wurden jedoch keine an einer Selbstinteraktion beteiligten spezifischen Aminosäurereste oder Regionen aus HpaC eingegrenzt. Aus diesem Grund sollten mittels GST-„pull-down“-Analyse Proteinregionen oder spezifische Aminosäurereste aus HpaC identifiziert werden, welche maßgeblich an der Selbstinteraktion von HpaC beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden immobilisiertes GST und GST-HpaC mit Lysaten inkubiert, welche HpaC-c-Myc oder Derivate enthielt. Hierbei konnte eine Interaktion zwischen GST-HpaC und HpaC-c-Myc wiederholt bestätigt werden. GST-„pull-down“-Analysen mit HpaC-Deletionsderivaten zeigten ebenfalls, dass die N-terminalen 31 Aminosäuren vermutlich nicht für die Selbstinteraktion von HpaC notwendig sind (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das HpaC-Deletionsderivat HpaC $_{\Delta 02-111}$, welches die C-terminale Region mit T3S4-Domäne aus HpaC einschließt (Aminosäure 112 bis 212), ebenso analysiert. HpaC $_{\Delta 02-111}$ konnte im Eluat mit GST-HpaC detektiert werden, jedoch deutete ein schwaches Signal von HpaC $_{\Delta 02-111}$ im Eluat mit GST auf eine leicht unspezifische Bindung hin (Abbildung 3.24). Die detektierten Proteinmengen von HpaC $_{\Delta 02-111}$ im Eluat mit GST waren aber signifikant reduziert und lassen sich auf eine neue Charge aliquotierter c-Myc-spezifischer Antikörper zurückführen. Im Gegensatz dazu wurden weder HpaC $_{\Delta 02-111}$ L171A noch HpaC $_{\Delta 02-111}$ F175A in den Eluaten mit GST oder GST-HpaC nachgewiesen (Abbildung 3.24). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäuren aus HpaC bis zur Position 111 für die Bindung eines weiteren HpaC-Moleküles vermutlich nicht benötigt werden und die C-terminale Region aus HpaC (Aminosäure 112 bis 212) wahrscheinlich die Bindestelle eingrenzt. Zusätzlich beeinträchtigt der Austausch konservierter Aminosäurereste (L171A und F175A) in der T3S4-Domäne die Selbstinteraktion von HpaC.

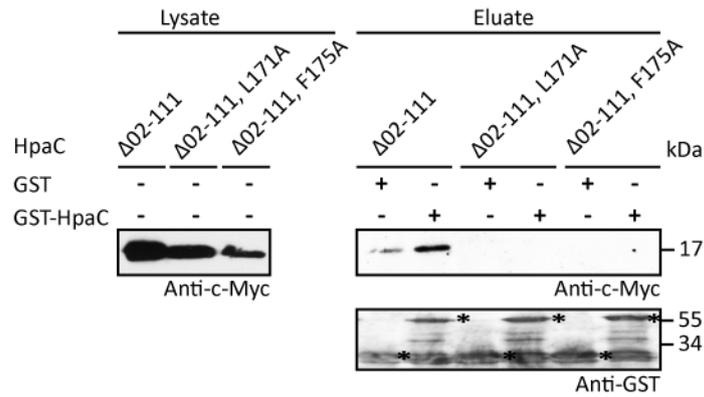


Abbildung 3.24: Analyse der Interaktion zwischen HpaC und HpaC-Deletionsderivaten.

Ergebnisse der Protein-Protein Interaktionsstudie von HpaC und HpaC-Deletionsderivaten. Für die GST-„pull down“-Analyse wurden GST und GST-HpaC an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche HpaC $_{\Delta 02-111}$ -c-Myc ($\Delta 02-111$) oder HpaC $_{\Delta 02-111}$ -c-Myc-Derivate mit einem Aminosäureaustausch ($\Delta 02-111, L171A$ bzw. F175A) enthielten, inkubiert. Lysate sowie Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. HpaC-Derivate wurden mittels c-Myc-spezifischer Antikörper (Anti-c-Myc) und GST oder GST-HpaC mittels GST-spezifischer Antikörper (Anti-GST) detektiert. GST und GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar.

3.2.7 Zusammenfassung: Charakterisierung der T3S4-Domäne aus HpaC

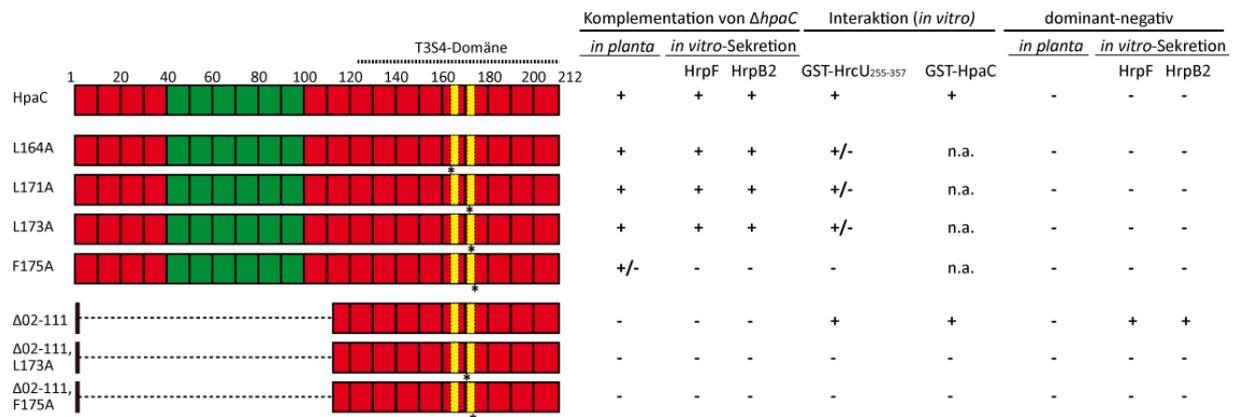


Abbildung 3.25: Zusammenfassung: Charakterisierung der C-terminalen Region aus HpaC.

Die Aminosäuresequenz von HpaC wurde in 21 Blöcke unterteilt. Einzelne Blöcke entsprechen 10 bzw. 11 Aminosäuren, gestrichelte Linien entsprechen Deletionen (Δ) und die Zahlen entsprechen der Aminosäureposition. Die gepunktete Linie markiert die Region in HpaC, welche die vorhergesagte T3S4-Domäne einschließt. Essentielle Regionen in HpaC sind rot, Regionen ohne Einfluss auf die Proteinfunktion sind grün unterlegt. Gelbe Bereiche in HpaC zeigen die zwischen HpaC und HpaP konservierten Aminosäurereste. C-terminale c-Myc-Epitop markierte HpaC-Derivate wurden im *Xcv*-Stamm 85-10 $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$) getestet, den mutanten Phänotyp bezüglich Krankheitssymptome und HR in Paprikapflanzen zu komplementieren. Durch ektopische Expression von *hpaC-c-myc* und Derivaten im *Xcv*-Stamm 85-10 wurde der dominant-negative Einfluss C-terminaler c-Myc-Epitop markierte HpaC-Derivate bezüglich Krankheitssymptome und HR *in planta* überprüft. Zur Analyse der HrpF- und HrpB2-Sekretion wurden die *Xcv*-Stämme 85* (WT) und 85* $\Delta hpaC$ ($\Delta hpaC$), welche HpaC-c-Myc oder Deletionsderivate enthielten, in Sekretionsmedium inkubiert. Um die Interaktion zwischen GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ bzw. GST-HpaC und HpaC-Derivaten zu studieren, wurden GST-„pull-down“-Analysen durchgeführt. (+) Komplementation der Krankheitssymptome und HR *in planta*, Komplementation von HrpF- und HrpB2-Sekretion *in vitro*, sowie Interaktion von HpaC-c-Myc-Derivaten mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ bzw. GST-HpaC und ektopische Expression von *hpaC*-Derivaten ist dominant-negativ; (-) keine Komplementation der Symptome *in planta*, reduzierte HrpF-Sekretion bzw. Übersekretion von HrpB2 *in vitro*, keine nachweisbare Interaktion von HpaC-c-Myc-Derivaten mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ bzw. GST-HpaC und kein dominant-negativer Einfluss; (+/-) partielle Komplementation oder reduzierte Interaktion von HpaC-c-Myc mit GST-HrcU₂₅₅₋₃₅₇ bzw. GST-HpaC

4. Diskussion

4.1 Identifizierung funktionaler Regionen aus HrpB2

Das Nicht-Effektorprotein HrpB2 ist für die Pathogenität von *Xcv*, die Typ III-abhängige Sekretion extrazellulärer Komponenten des T3S-Systems und Translokation von Effektoren erforderlich (Rossier *et al.* 2000; Lorenz *et al.* 2008b). Interessanterweise wird HrpB2 *in vitro* selbst Typ III-abhängig sekretiert und besitzt ein Sekretionssignal, wahrscheinlich zwischen den ersten 10 bis 25 Aminosäuren (Lorenz *et al.* 2008b). Zudem wurde in vorherigen Studien gezeigt, dass eine effiziente Sekretion von HrpB2 durch das T3S4-Protein HpaC unterbunden wird. Es wird daher angenommen, dass HrpB2 ein „frühes“ T3S-Substrat darstellt und damit als eines der ersten Substrate den Sekretionsapparat passiert (Lorenz *et al.* 2008b). Wie genau HrpB2 die Sekretion von *Xcv* unterstützt und welche Funktion HrpB2 während der Assemblierung des Sekretionsapparates übernimmt war bisher weitestgehend unbekannt. HrpB2 ist in Bakterien der Spezies *Xanthomonas* konserviert, jedoch nicht in anderen pflanzenpathogenen Bakterien. So sind die HrpB2 homologen Proteine aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* zu 70%, aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* zu 98% und aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) zu 96% identisch mit HrpB2 aus *Xcv*. Ein weiteres HrpB2 homologes Protein ist z.B. HrpJ aus *Ralstonia solanacearum*. HrpJ und HrpB2 besitzen eine Sequenzidentität von maximal 32%. Bisher wurde jedoch keine signifikante Übereinstimmung zu Proteinen mit bekannter Funktion gefunden.

4.1.1 Analyse und Charakterisierung des T3S-Signals

Sekretionssignale wurden bislang in T3S-Substraten von tier- und pflanzenpathogenen Bakterien intensiv studiert. Es ist sehr wenig bekannt, welche genauen Signale für eine effektive Sekretion von T3S-Substraten notwendig sind, da es kein eindeutiges Sequenzmotiv gibt. Jedoch konnte für eine Reihe von Effektoren gezeigt werden, dass meist die N-terminale Region für eine Typ III-abhängige Sekretion notwendig ist und diese häufig eine ähnliche Zusammensetzung von Aminosäuren aufweisen (Buchko *et al.* 2010). Zum Beispiel deuten Mutationsstudien von T3S-Signalen darauf hin, dass eventuell eine amphipatische Sequenzabfolge, polare Aminosäuren und Serin-Reste innerhalb der N-terminalen 15 bis 20 Aminosäuren für eine Erkennung als T3S-Substrate förderlich sein könnten (Lloyd *et al.* 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.* 2002; Alfano und Collmer 2004; Ghosh 2004). Aber bisher wurden nicht einmal für T3S-Substrate innerhalb eines Organismus konservierte

Aminosäuren identifiziert oder eine Art Konsensus-Sequenz gefunden (Samudrala *et al.* 2009). In der Literatur werden daher unterschiedlichste Hypothesen zum Aufbau eines typischen T3S-Signals diskutiert. Zum Beispiel könnte eine „chaotische“ N-terminale Aminosäuresequenz eine unstrukturierte oder flexible Sekundärstruktur ausbilden, welche dann als T3S-Signal erkannt wird (Samudrala *et al.* 2009). Es wäre ebenfalls möglich, dass das Sekretionssignal nicht von der Aminosäuresequenz abhängt, sondern durch die mRNA kodiert wird oder dass eine spezifische Bindung durch T3S-Chaperone schließlich das T3S-Substrat zum T3S-System heranführt (Büttner *et al.* 2006; Galan *et al.* 2006; Blaylock *et al.* 2008; Arnold *et al.* 2009; Samudrala *et al.* 2009; Costa *et al.* 2012). Welche dieser Hypothesen schließlich auf HrpB2 zutrifft, ist zu diesem Zeitpunkt eine schwierige Fragestellung. Jedoch entspricht die vorhergesagte, schwach strukturierte N-terminale Region von HrpB2 (Phyre²: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) der Hypothese, nach welcher ein T3S-Signal in der Regel innerhalb der ersten 20 bis 30 Aminosäuren und in einer wenig strukturierten Region zu finden ist (Petnicki-Ocwieja *et al.* 2002; Arnold *et al.* 2009). In früheren Analysen wurden in der N-terminalen Region aus HrpB2 einige polare Aminosäuren kombiniert und einzeln gegen Alanin ausgetauscht, jedoch konnte bislang kein Einfluss dieser Aminosäurereste auf die Sekretion nachgewiesen werden (Büttner D., unpubliziert).

Mit Hilfe von Komplementationsstudien und *in vitro* Sekretionsanalysen wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass Deletionen der Aminosäuren zwei bis neun von HrpB2 keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinfunktion oder Typ III-abhängige Sekretion von HrpB2 besitzen. Im Gegensatz dazu führen jedoch Deletionen der Aminosäuren 2 bis 10 bzw. bis 20 zu einem Funktionsverlust von HrpB2 und korrespondierende HrpB2-Derivate werden in *Xcv* nicht mehr sekretiert (Kapitel 3.1.1 und Tabelle 3.1). Es ist daher wahrscheinlich, dass diesen HrpB2-Deletionsderivaten Aminosäurereste fehlen, die für die Funktion von HrpB2 wichtig sind und vermutlich eine entscheidende Rolle für die Sekretion von HrpB2 spielen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der Funktionsverlust der Derivate HrpB2₁₁₋₁₃₀ und HrpB2₂₁₋₁₃₀ nicht allein auf ihre reduzierte Sekretion zurückzuführen ist, sondern dass die Aminosäuren ab der Position 10 an der Proteinfunktion von HrpB2 beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde auch die Sekretion von HrpB2-Derivaten mit einem C-terminalen c-Myc- bzw. FLAG-Epitop im Wildtyp-Stamm (mit Wildtyp-*hrpB2*-Gen) untersucht.

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass ein C-terminales c-Myc-Epitop-markiertes HrpB2-Protein zwar nicht mehr die Fähigkeit besitzt, eine genomische *hrpB2*-Deletionsmutante zu komplementieren, aber im *Xcv*-Stamm 85* *in vitro* sekretiert werden

kann (Lorenz *et al.* 2008b). Im Gegensatz dazu stellte sich jedoch während dieser Arbeit heraus, dass die pBRM-Plasmid-vermittelte Expression von *hrpB2-c-myc* oder *hrpB2-flag* in *Xcv* einen dominant-negativen Einfluss auf die Pathogenität sowie die Typ III-abhängige Sekretion ausübt. Zudem werden die Proteine HrpB2-c-Myc oder HrpB2-FLAG selbst nicht mehr sekretiert (Kapitel 3.1.2). Für die Hauptkomponente des Hrp-Pilus HrpE aus *Xcv* wurde in früheren Studien Ähnliches beobachtet, denn auch hier führt die C-terminale Fusion mit einem c-Myc-Epitop zum vollständigen Funktionsverlust und zur Blockade der Typ III-abhängigen Sekretion (Christian Lorenz und Daniela Büttner, unveröffentlicht). Es ist denkbar, dass C-terminale Epitop-Markierungen an Komponenten des T3S-Systems z.B. eine strukturelle Fehlorientierung des Proteins provozieren oder Interaktionen mit potentiellen Partnern im bzw. am Sekretionsapparat verhindern und auf diese Weise die fehlerfreie Assemblierung des T3S-Systems behindern. Es konnte in tierpathogenen Bakterien wie z. B. *Yersinia* spp. gezeigt werden, dass in Abhängigkeit eines funktionalen T3S-Signals die C-terminale Fusion von GST an „frühe“ T3S-Substrate (z.B. YscP oder YscH) die Typ III-abhängige Sekretion aller weiteren Substrate blockieren kann (Sorg *et al.* 2006; Riordan *et al.* 2008b). Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass der dominant-negative Einfluss von HrpB2-c-Myc oder HrpB2-FLAG in *Xcv* vermutlich ebenfalls von einem funktionalen T3S-Signal abhängt, da im Hintergrund eines funktionsfähigen T3S-Systems u.a. HrpB2₂₁₋₁₃₀-c-Myc weder sekretiert noch dominant-negativ war (Daten nicht gezeigt).

Um unabhängig von der HrpB2-Funktion am T3S-Signal beteiligte Aminosäuren zu identifizieren, wurde daher die Sekretion von C-terminal um 40 Aminosäuren verkürzter HrpB2-Derivate (HrpB2_{n-90}) im Hintergrund eines *hrpB2*-Wildtypstammes untersucht (Kapitel 3.1.3). Diese *in vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass die C-terminale Region für eine spezifische Sekretion von HrpB2 nicht notwendig ist, da die HrpB2-Derivate HrpB2₀₁₋₉₀, HrpB2₀₉₋₉₀ und HrpB2₁₀₋₉₀ durch *Xcv* Typ III-abhängig sekretiert wurden (Abbildung 3.5). Damit kann die Anwesenheit eines essentiellen T3S-Signals in der C-terminalen Region, wie es z.B. für das Effektorprotein Tir aus EHEC beschrieben wurde, für HrpB2 weitestgehend ausgeschlossen werden (Allen-Vercoe *et al.* 2005). Zusätzlich lässt es den Schluss zu, dass die Aminosäuren zwei bis neun weder für eine effiziente Typ III-abhängige Sekretion, noch für die Funktion von HrpB2 wichtig sind.

Besonders interessant ist das Derivat HrpB2₁₁₋₉₀, welches durch *Xcv* nicht mehr effizient in das extrazelluläre Milieu sekretiert wurde. Die Deletion der Aminosäuren 2 bis 10 führte vermutlich zum Verlust des funktionalen T3S-Signals. Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu den Aminosäuren zwei bis neun der Aminosäurerest Isoleucin (I) an der

Position 10 bereits Teil eines funktionalen T3S-Signals aus HrpB2 ist. Weitere Sekretionsanalysen von HrpB2₀₁₋₉₀-Derivaten mit internen Deletionen führten zu dem Ergebnis, dass die Aminosäurereste an der Position 11 (Alanin) und 12 (Glutamat) für die Sekretion von HrpB2₀₁₋₉₀ ebenfalls entscheidend sind. Deletionen der Aminosäuren 10 bis 25 bzw. 12 bis 25 führten im Gegensatz zu Deletionen der Aminosäure 16 bis 25 bzw. 13 bis 22 zu einer Beeinträchtigung der Sekretion von HrpB2₀₁₋₉₀ (Abbildung 1.1). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Aminosäurereste Isoleucin (I), Alanin (A) und Glutamat (G) an der Position 10, 11 und 12 nicht nur für die effiziente Sekretion des Derivates HrpB2₀₁₋₉₀ eine wichtige Rolle spielen, sondern vermutlich ein essentieller Bestandteil des T3S-Signals von HrpB2 sind. Wahrscheinlich besteht das vollständige T3S-Signal aus mehr als drei Aminosäureresten, jedoch ist die Natur des T3S-Signals schwer auszumachen.

Die Komplementationsanalyse N- und C-terminal verkürzter HrpB2-Derivate weisen jedoch darauf hin, dass ein intaktes T3S-Signal für die Funktion von HrpB2 essentiell ist. Das lässt den Schluss zu, dass HrpB2 nicht nur essentiell für die Typ III-abhängige Sekretion von Pilus, Translokon und Effektoren ist, sondern die Sekretion von HrpB2 für Funktion und das T3S-System zwingend erforderlich ist. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass allein die effiziente Sekretion entscheidend für die Funktion ist. Eine Sekretion von HrpB2 könnte eher die Voraussetzung darstellen, um ein intaktes T3S-System zu unterstützen. Die bisher beschriebenen experimentellen Daten sprechen für eine Rolle von HrpB2 als extrazelluläre Komponente des Sekretionsapparates. Daher ist es denkbar, dass HrpB2 als „frühes“ T3S-Substrat in *Xcv* gemeinsam mit HrpE eine strukturelle Komponente des Hrp-Pilus darstellt (Abbildung 1.4) (Weber und Koebnik 2005a; Weber *et al.* 2005b). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass HrpB2 die Hauptkomponente des Hrp-Pilus bildet, da die Typ III-abhängige Sekretion von HrpB2 im Wildtypstamm sehr gering ist (Lorenz *et al.* 2008b). Zudem existieren bisher keine experimentellen Hinweise darauf, dass der Hrp-Pilus von pflanzenpathogenen Bakterien aus mehreren Komponenten aufgebaut ist. Lediglich für das T3S-System vom symbiontisch lebenden Pflanzenbakterium *Rhizobium* spp. NGR234 konnte gezeigt werden, dass die T3S-System-abhängigen Pili aus mindestens zwei Proteinen, NopA und NopB, bestehen. Hierbei bildet NopA die Hauptkomponente der Pili. NopB ist essentiell für Assemblierung des Pilus und mit selbigem assoziiert (Deakin *et al.* 2005; Saad *et al.* 2005; Saad *et al.* 2008).

4.1.2 Identifizierung des VxTLxK-Motives in HrpB2

Um die genaue Bedeutung von HrpB2 als extrazelluläre Komponente des Sekretionsapparates aufzuklären, wurden zusätzlich zum T3S-Signal weitere für die Funktion wichtige Regionen identifiziert und charakterisiert.

Durch bioinformatisch gestützte Sequenzvergleiche von HrpB2 und Homologen konnte das konservierte C-terminale VxTLxK-Motiv (Aminosäure 123 bis 128) identifiziert werden (Abbildung 3.6) (Hartmann *et al.* 2012). Besonders auffällig hierbei ist die Anwesenheit eines ähnlichen Motives in der sonst stark abweichenden Aminosäuresequenz beschriebener bzw. vorhergesagter „inner rod“ Proteine (z.B. PrgJ aus *Salmonella* spp. oder YscI aus *Yersinia* spp.) von tierpathogenen Bakterien (Tabelle 4.1) (Marlovits *et al.* 2004; Marlovits *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008). Das VxTLxK-Motiv ist vermutlich für die Funktion von HrpB2 wichtig, da eine Deletion der Aminosäuren 123 bis 128 bzw. 123 bis 130 aus HrpB2 zum vollständigen Verlust der Typ III-abhängigen Sekretion *in vitro* und Pathogenität von *Xcv* in der Pflanze führte (Abbildung 3.7). Der separate Austausch V123A und T125A in HrpB2 hatte in *Xcv* hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Pathogenität oder Typ III-abhängigen Sekretion. Jedoch führten HrpB2-Derivate mit einem Austausch der konservierten Aminosäurereste an der Position 126 (L126A) und 128 (K128A) zu einer reduzierten Virulenz in der Pflanze und zu einer stark eingeschränkten Typ III-abhängigen Sekretion *in vitro* (Abbildung 3.8). Daher sind die konservierten Aminosäuren L126 und K128 im Bereich des VxTLxK-Motivs vermutlich an der Funktion von HrpB2 in *Xcv* maßgeblich beteiligt. Interessanterweise führten einzelne Mutationen im VxTLxK-Motiv mit negativem Einfluss auf die Funktion von HrpB2 zugleich zu einer signifikant reduzierten Anzahl von intakten T3S-Pili (Abbildung 3.9). Demnach könnte das VxTLxK-Motiv entscheidend an der Assemblierung der T3S-Pili beteiligt sein.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde im HrpB2-homologen Protein aus *Xac* (HrpB2^{*Xac*}) ein teilweise überlappendes Motiv (TLMKNQ, Aminosäure 125 bis 130) analysiert, welches ebenfalls als Teil einer essentiellen Proteinregion aus HrpB2^{*Xac*} identifiziert wurde (Cappelletti *et al.* 2011). Die Ergebnisse der Analyse von HrpB2^{*Xac*} zeigen jedoch deutliche Unterschiede zu den Beobachtungen für HrpB2 aus *Xcv*. In HrpB2^{*Xac*} führte der Aminosäureaustausch T125A zum Funktionsverlust in der Pflanze, wohingegen der Austausch L126A oder K128A keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *Xac* besaß. Zudem konnte gezeigt werden, dass trotz des Funktionsverlustes in der Pflanze die Derivate HrpB2^{*Xac*}₁₋₅₆, HrpB2^{*Xac*}₁₋₁₂₃ und HrpB2^{*Xac*}_{T125A} im Hintergrund einer *hrpB2*-Deletionsmutante

unverändert sekretiert wurden (Cappelletti *et al.* 2011). Was darauf hindeutet, dass *per se* die Sekretion von HrpB2^{Xac} nicht für eine Ausbildung von Krankheitssymptomen in der Pflanze ausreicht und hierbei vermutlich das C-terminale TLMKNQ-Motiv v.a. die konservierte Aminosäure T125 eine besondere Bedeutung hat (Cappelletti *et al.* 2011)

Welche spezifische Rolle dabei dieses Sequenzmotiv übernimmt muss weiter untersucht werden. Für eine Reihe von beschriebenen „inner rod“-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien konnte gezeigt werden (Tabelle 4.1), dass das gemeinsame C-terminale Sequenzmotiv durch einen Rezeptor (NLRC4) in der Wirtszelle erkannt werden kann und eine Immunantwort hervorruft (Miao *et al.* 2010). Zusätzlich wurde gezeigt, dass dabei die konservierten Aminosäuren vermutlich kritisch für die Proteinfunktion sind, denn eine Mutation verhinderte die Erkennung von PrgJ durch NLRC4 (Miao *et al.* 2010). Die Detektion von unter pathogenen Bakterien strukturell konservierten Komponenten ist sinnvoll. Es versetzt die Wirtszelle in die Lage, ein breites Spektrum an Pathogenen durch ein gemeinsames Merkmal zu erkennen und auf diese Weise schnell eine Abwehr zu induzieren.

So könnte das VxTLxK-Motiv durch Verknüpfung von HrpB2-Molekülen für den Aufbau einer periplasmatischen inneren Struktur des T3S-Systems aus *Xcv* wichtig sein. Die Erkennung von PrgJ findet direkt in der Wirtszelle statt (Miao *et al.* 2010). Dies steht zunächst im Gegensatz zu HrpB2, welches nicht in das Zytosol der Pflanzenzelle transloziert und im Wildtypstamm nur sehr schwach sekretiert wird (Lorenz *et al.* 2008b). Jedoch existieren experimentelle Hinweise dafür, dass die Translokation von HrpB2 grundsätzlich möglich ist. Denn eine Deletion von *hpaC* in *Xcv* führt nicht nur zur verstärkten Sekretion, sondern auch zu einer Translokation von HrpB2 in die pflanzliche Wirtszelle (Lorenz *et al.* 2008b). Es existieren jedoch keine Hinweis oder experimentelle Daten darüber ob HrpB2 in der Pflanzenzelle spezifisch erkannt werden könnte.

Tabelle 4.1: Beispiele von bekannten Proteinen mit Sequenzähnlichkeiten in der C-terminalen Region aus Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.

Protein	Organismus	Mögliche Funktion	Referenz
Tierpathogene Bakterien			
PrgJ	<i>Salmonelle enterica</i>	„inner rod“- Protein	(Marlovits <i>et al.</i> 2004)
MxII	<i>Salmonelle flexneri</i>	putatives „cap“-Protein	
YscI	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	„inner rod“- Protein	(Wood <i>et al.</i> 2008)
BsaK	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	„inner rod“-Protein	(Blocker <i>et al.</i> 2001)
Pflanzenpathogene Bakterien			
HrpJ	<i>Ralstonia solanacearum</i>	unbekannt	(Van Gijsegem <i>et al.</i> 2002)
HrpB2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	„inner rod“-ähnliches Protein	(Hartmann <i>et al.</i> 2012)

4.1.3 HrpB2 ist eine periplasmatische und ÄM-assozierte Komponente des T3S-Systems

Ungeachtet dessen lässt die Vorhersage eines gemeinsamen Aminosäuremotives aus HrpB2 und angenommenen „inner rod“-Proteinen tierpathogener Bakterien eine ähnliche Funktion der Proteine vermuten. Es wird angenommen, dass „inner rod“-Proteine aus Tierpathogenen die Assemblierung der Nadelstruktur unterstützen, indem sie vermutlich im bakteriellen Periplasma unterhalb der Nadel als eine Art innere „Plattform“ zur stabilen Verankerung der Nadelstruktur mit dem Sekretionsapparat dienen. Zugleich werden „inner rod“ Proteine durch das T3S-System sekretiert (Marlovits *et al.* 2004; Marlovits *et al.* 2006; Ogino *et al.* 2006; Wood *et al.* 2008; Izoré *et al.* 2011). Bisher ist nicht bekannt, ob „inner rod“-Proteine bzw. „inner rod“-ähnliche Strukturen in T3S-Systemen pflanzenpathogener Bakterien überhaupt existieren oder in welchem Maße eine periplasmatische Basis zur stabilen Verankerung des Hrp-Pilus benötigt wird.

So könnte HrpB2 als „inner rod“-ähnliche Komponente den Aufbau des Hrp-Pilus unterstützen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen aus den EM- und Subfraktionierungsstudien (Kapitel 3.1.6 und 3.1.7). Mehrere Hinweise lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, dass HrpB2 ähnlich wie z.B. HrpE einen extrazellulären Teil des Hrp-Pilus darstellt. Im *Xcv*-Wildtypstamm konnten im Gegensatz zu HrpE nur einige wenige HrpB2-Moleküle in der näheren Umgebung der T3S-Pili detektiert werden und darüber hinaus lässt sich HrpB2 unter T3S-induzierenden Bedingungen hauptsächlich in der mit PP und ÄM angereicherten Fraktion finden (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Jedoch besitzt das konservierte Sequenzmotiv keinen direkten Einfluss auf die Lokalisierung von HrpB2, da das analysierte Deletionsderivat HrpB2_{Δ123-128} weiterhin in der mit PP und ÄM angereicherten Fraktionen zu finden war (Abbildung 3.11). Welche genaue Aufgabe dieses Motiv aus HrpB2 während der Assemblierung des Pilus hat, muss zusätzlich überprüft

werden. Überträgt man die für HrpB2 erhaltenen experimentellen Daten auf eine mögliche Funktion, könnte HrpB2 demnach als eine Art periplasmatische „Basis“, ähnlich der „inner rod“-Proteine aus tierpathogenen Bakterien, für den Aufbau des Hrp-Pilus erforderlich sein. Ähnlich wie es für die extrazelluläre Nadel des T3S-Systems aus *Salmonella* spp. beschrieben wurde, ist es für *Xcv* denkbar, dass die Basis des Hrp-Pilus bereits im periplasmatischen Zwischenraum auf einer z.B. in *Xcv* aus HrpB2 bestehenden inneren Struktur „aufgesetzt“ wird (Marlovits *et al.* 2004; Marlovits *et al.* 2006; Sani *et al.* 2007; Wood *et al.* 2008).

Von dieser Hypothese ausgehend, sollte die Anwesenheit von HrpB2 im PP bzw. in der ÄM eine Voraussetzung für die stabile Assemblierung des Hrp-Pilus von *Xcv* darstellen. Es wurde festgestellt, dass das Derivat HrpB2₂₁₋₁₃₀, welches weder *in vitro* sekretiert noch *in planta* funktionstüchtig war, unverändert im PP und der ÄM lokalisiert (Kapitel 3.1.1 und 3.1.7). Zudem war es besonders, dass HrpB2 offenbar unabhängig von einem aktiven T3S-System über die IM in das PP transportiert werden kann (Abbildung 3.11). Diese Ergebnisse waren völlig unerwartet und deuten auf einen alternativen Transportweg von HrpB2 aus dem bakteriellen Zytoplasma in den periplasmatischen Raum hin. Bioinformatische gestützte Vorhersagen offenbarten in der N-terminalen Region von HrpB2, je nach verwendetem Modell (SignalP 3.0-NN bzw. -HM und PrediSi) mögliche Schnittstellen eines Signalpeptides zwischen den Aminosäurepositionen 11 bis 12, 25 bis 26 und 31 bis 31 (Dyrløv Bendtsen *et al.* 2004), (<http://www.predisi.de/>). Mit Ausnahme der Vorhersage durch SignalP 3.0-NN wurde jedoch im Sequenzkontext von HrpB2₂₁₋₁₃₀ weder ein Sec-abhängiges Signalpeptid noch eine mögliche Schnittstelle identifiziert. Ob überhaupt ein alternativer Transport von HrpB2 in das Periplasma Sec-abhängig erfolgen könnte, muss daher noch weiter untersucht werden. Da aber alle untersuchten HrpB2-Derivate unverändert im PP detektiert wurden, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisierung und Funktion von HrpB2 besteht.

4.1.4 Ist HrpB2 ein „inner rod“-Protein?

Die Kontrolle der Sekretion des mutmaßlichen „inner rod“-Proteins HrpB2 durch HpaC in *Xcv* ist eine interessante Gegebenheit, da für einige beschriebene „inner rod“-Proteine (z.B. YscI oder PrgJ) aus Tierpathogenen bereits ähnliche Mechanismen gezeigt werden konnten. So unterliegt z.B. in *Yersinia pseudotuberculosis* die Sekretion von YscI ebenfalls der Kontrolle des T3S4-Proteins YscP, indem es die effiziente Sekretion von YscI verhindert (Wood *et al.* 2008). Ein weiteres Beispiel ist die durch das T3S4-Protein InvJ kontrollierte Assemblierung der vermutlich aus PrgJ bestehenden, „inner rod“-Struktur aus *Salmonella*

enterica (Marlovits *et al.* 2006). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine Deletion von *invJ* die Ausbildung der „inner rod“-Struktur verhindert wird und stark verlängerten Nadelstrukturen mit der Basis des Sekretionsapparates assoziiert waren. Im Gegensatz zur sogar verstärkten Sekretion des „inner rod“-Proteins PrgJ, konnte die Sekretion von Effektoren nicht mehr nachgewiesen werden (Collazo *et al.* 1996; Kubori *et al.* 2000; Sukhan *et al.* 2001; Sukhan *et al.* 2003; Marlovits *et al.* 2006). Daher schlägt man für *Salmonella* vor, dass eine kontrollierte Assemblierung der „inner rod“-Struktur Voraussetzung für eine stabile Verankerung der Nadel mit einer genau definierten Länge ist, was wiederum für die effiziente Sekretion von „späten“ Substraten wie Effektoren essentiell ist (Marlovits *et al.* 2006). Findet hingegen keine kontrollierte Assemblierung des „inner rods“ statt, führt dies zu einer Fehlregulierung der Sekretion von Komponenten der extrazellulären Nadel und unterbindet auf diese Weise die effiziente Sekretion von Effektoren (Marlovits *et al.* 2006). Geht man nun von der Hypothese aus, dass HpaC aus *Xcv* eine ähnliche Funktion wie InvJ aus *Salmonella* besitzt, gibt es deutliche Übereinstimmung zwischen beiden Modellorganismen. Ähnlich wie für *invJ* beschrieben führt die Deletion von *hpaC per se* nicht zum Verlust des Hrp-Pilus (Abbildung 3.10), hat aber ebenso die stark reduzierte Sekretion von Effektoren zur Folge (Weber *et al.* 2005b; Lorenz *et al.* 2008b). So konnten für *Xcv* zwar keine signifikant verlängerten Hrp-Pili beobachtet werden, jedoch führt die Deletion von *hpaC* zu einer Fehlregulierung der Sekretion des potentiellen „inner rod“-Proteins HrpB2 (Lorenz *et al.* 2008b). Daher ist es für *Xcv* durchaus denkbar, dass die kontrollierte Assemblierung einer eventuell aus HrpB2 aufgebauten „inner rod“-ähnlichen Struktur, durch HpaC reguliert wird. Zusammenfassend deuten die Hinweise auf eine Funktion von HrpB2 als „inner rod“-ähnliche Komponente des T3S-Systems aus *Xcv* hin (Abbildung 4.1).

Aufgrund der anscheinend ähnlichen Kontrollmechanismen von HrpB2, YscI und PrgJ, der vergleichbaren Proteingröße und dem gemeinsamen C-terminalen VxTLxK-Motiv wurde in weiteren Experimenten untersucht ob PrgJ oder YscI die funktionelle Rolle von HrpB2 in *Xcv* übernehmen könnten (Kapitel 3.1.8). Infektionsexperimente und Sekretionsanalysen zeigten jedoch, dass PrgJ oder YscI weder die Fähigkeit besitzen eine *hrpB2*-Deletionsmutante zu komplementieren noch im *Xcv*-Wildtypstamm oder einer *hpaC*-Deletionsmutante sekretiert werden (Abbildung 3.13). Da die Aminosäuresequenz von HrpB2 nur zu 8,5% identisch zur Sequenz von YscI bzw. PrgJ ist und sich die Sequenzähnlichkeiten im Wesentlichen auf das zuvor identifizierte VxTLxK-Motiv beschränken, war dieses Ergebnisse nicht sonderlich überraschend (Abbildung 3.12). So könnte z.B. schon allein die fehlende Fähigkeit zur

Sekretion von YscI und PrgJ durch das T3S-System aus *Xcv* für den Funktionsverlust eine Erklärung liefern. Um eine mögliche Transkomplementation oder Sekretion von YscI bzw. PrgJ in *Xcv* weiter zu untersuchen, könnte man z.B. chimere YscI bzw. PrgJ Proteine erstellen, welche z.B. die ersten 20 bis 25 Aminosäuren aus HrpB2 enthalten und dessen Fähigkeit zur Sekretion und Komplementation erneut überprüfen.

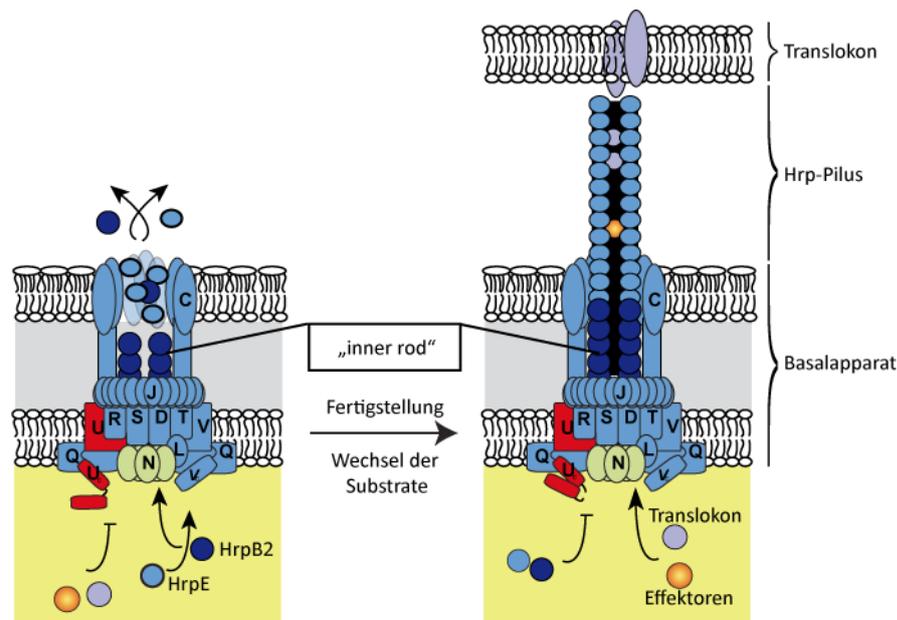


Abbildung 4.1: Modell der Assemblierung von "inner rod"-Struktur und Hrp-Pilus in *Xcv*.

HrpB2 wird als frühes Substrat gemeinsam mit HrpE sekretiert. HrpB2 ist wie HrpE für die Pilusassemblierung notwendig und wird daher als eine essentielle Komponente des Hrp-Pilus angenommen. Die EM-Studien in dieser Arbeit zeigten, dass HrpB2 vermutlich nicht direkt mit dem Hrp-Pilus oder dessen Spitze assembliert ist. Da HrpB2 hauptsächlich im Periplasma und in der äußeren bakteriellen Membran lokalisiert ist, könnte HrpB2 innerhalb des Basalapparates als „inner rod“-ähnliches Protein, ähnlich den vorhergesagten Strukturen aus Tierpathogenen, eine zentrale Struktur bilden. Da der „inner rod“ vermutlich zur stabilen Verankerung extrazellulärer Strukturen (z.B. Hrp-Pilus) erforderlich ist, könnte zusätzlich die kontrollierte Fertigstellung im Inneren des Basalapparates einen Wechsel der Substratspezifität induzieren und zur spezifischen Sekretion später T3S-Substrate (Translokone und Effektoren) führen. HrcC, D, J, L, N, Q, R, S, T, U und V sind konservierte Komponenten des Basalapparates.

4.1.5 Die C-terminale Region aus HrpB2 ist wichtig für eine Interaktion mit HpaC oder HrcU₂₆₅₋₃₅₇

Aus vorherigen Studien über HrpB2 war bekannt, dass HrpB2 mit dem T3S4-Protein HpaC und der C-terminalen Domäne des konservierten IM-Proteins HrcU (HrcU₂₆₅₋₃₅₇) interagiert (Lorenz *et al.* 2008b). Dies ist besonders im Zusammenhang der durch das T3S4-Protein HpaC regulierten Sekretion von HrpB2 und der Beteiligung von HrcU am Wechsel von „frühen“ zu „späten“ T3S-Substraten, interessant. Die Interaktionsstudie zwischen HpaC und HrpB2 deutete hierbei auf einen möglichen Einfluss des VxTLxK-Motivs, da die Deletion der

Aminosäuren 123 bis 130 aus HrpB2 zu einer leicht reduzierten Interaktion mit HpaC führte (Abbildung 3.14). Jedoch sollte diese Schlussfolgerung kritisch betrachtet werden, da die Deletion der N-terminalen Aminosäuren 2 bis 89 ebenso zu einer reduzierten Interaktion mit HpaC führten (Abbildung 3.14). Daher ist es unwahrscheinlich, dass allein das konservierte Motiv aus HrpB2 die Interaktion mit HpaC vermittelt. Mit Blick auf die Interaktionsstudien zwischen HrpB2 und HrcU₂₆₅₋₃₅₇ deutet eher alles darauf hin, dass die C-terminale Region aus HrpB2 von Position 90 bis 130 einen generellen Anteil an der Interaktion mit HpaC oder HrcU₂₆₅₋₃₅₇ besitzt. Es ist schwer nachzuvollziehen, warum die schwach reduzierte Interaktion von HrpB2_{Δ123-130} mit HpaC einen vollständigen Funktionsverlust von HrpB2 zur Folge haben sollte. Wie HpaC die effiziente Sekretion von HrpB2 letztlich verhindert, ist in *Xcv* noch nicht verstanden. Jedoch existieren experimentelle Beweise dafür, dass HpaC und HrpB2 um die gleiche Bindestelle in HrcU₂₆₅₋₃₅₇ konkurrieren könnten (Lorenz und Büttner 2011). Durch ein verändertes Verhältnis der Affinität zwischen HrpB2, HpaC und HrcU₂₆₅₋₃₅₇ könnten die fehlerfreie Kontrolle der Sekretion von HrpB2 und so ein Wechsel in der Spezifität der Substraterkennung negativ beeinflusst sein. Es darf nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Interaktion der analysierten HrpB2-Derivate sowie deren Funktionsverlust auf eine Fehlfaltung des Proteins zurückzuführen ist. Da die Vorhersage der Sekundärstruktur von HrpB2 eine stark strukturierte Region v.a. zwischen den Aminosäuren 88 bis 130 zeigt (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) könnte die C-terminale Region aus HrpB2 aus diesem Grund generell wichtig für eine Interaktion mit HpaC oder HrcU₂₆₅₋₃₅₇ sein.

In zukünftigen Studien sollte überprüft werden, ob HrpB2 Proteinkomplexe ausbilden kann und mit weiteren PP und ÄM assoziierten Komponenten (z.B. HrcC, HrcD oder HrcJ) des T3S-Systems interagiert. Zum Beispiel deuten erste experimentelle Beweise darauf hin, dass HrpB2 mit HrpB1 interagiert. HrpB1 aus *Xcv*, mit bisher unbekannter Funktion, ist ebenfalls essentiell für die Assemblierung des Pilus. Die Analyse und funktionelle Charakterisierung von HrpB2 assoziierten Proteinkomplexen sollte helfen, mehr Hinweise über die Funktion einer möglichen periplasmatischen Struktur vom T3S-System aus *Xcv* zu erhalten. Ähnlich zu den Kryo-EM-Studien aus *Salmonella typhimurium* könnte ein vergleichbarer experimenteller Ansatz auch für HrpB2 aus *Xcv* erfolgreich sein (Marlovits *et al.* 2006). So könnten strukturelle Abweichungen im Basalapparat vom *Xcv*-Wildtypstamm, einer *hpaC*- und *hrpB2*-Deletionsmutante analysiert werden. Zudem könnte zusätzlich versucht werden, z.B. über eine native 2D-Gelelektrophorese Basalapparate aus *Xcv* aufzutrennen und davon ausgehend einzelne Komponenten auf ihre Anwesenheit vergleichen.

4.2 Charakterisierung des T3S4-Proteins HpaC

HpaC aus *Xcv* ist das erste bekannte T3S4-Protein, welches in pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert werden konnte. Es unterstützt die Virulenz von *Xcv* und ähnlich der T3S4-Proteine aus Tierpathogenen, vermittelt HpaC vermutlich einen Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems von „frühen“ (z.B. HrpB2) zu „späten“ T3S-Substraten (z.B. HrpF und Effektoren) (Lorenz *et al.* 2008b). HpaC besitzt keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen mit bekannter Funktion. Lediglich das homologe Protein HpaP aus *Ralstonia solanacearum* ist zu 27% identisch mit der Aminosäuresequenz von HpaC (Abbildung 3.15) (Lorenz *et al.* 2008b). Ähnlich wie HpaC unterstützt HpaP in *Ralstonia solanacearum* eine effiziente Sekretion von Effektoren (z.B. PopA) und fördert die Interaktion mit der Pflanze (Van Gijsegem *et al.* 2002). Die genaue Funktion von HpaP ist dennoch nicht bekannt. Mittels „PSI-BLAST“ und dem Vergleich von Hydrophobizitätsmustern konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass HpaP v.a. im C-terminalen Bereich auffällige Sequenzähnlichkeiten mit T3S4-Proteinen aus tierpathogenen Bakterien besitzt (Agrain *et al.* 2005a). Bekannte T3S4-Proteine aus tierpathogenen Bakterien besitzen eine in der C-terminalen Region gelegene, strukturell konservierte T3S4-Domäne, welche wahrscheinlich für die Proteinfunktion von entscheidender Bedeutung ist. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass HpaC in der C-terminalen Region, ähnlich wie HpaP, konservierte Aminosäuren und Sequenzähnlichkeiten mit T3S4-Proteinen (z.B. YscP oder FliK) aus Tierpathogen besitzt (Abbildung 3.15) (Agrain *et al.* 2005a; Lorenz *et al.* 2008b). Jedoch gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit weder experimentellen Daten zu funktionellen Proteinregionen, noch war etwas über den Einfluss potentiell konservierter Sequenzbereiche bzw. Aminosäurereste aus HpaC bekannt.

4.2.1 Die Kontrollmechanismen für eine Sekretion von HrpF und HrpB2 sind teilweise voneinander unabhängig

Durch Komplementationsstudien und *in vitro*-Sekretionsanalysen von HpaC-Deletionsderivaten wurde festgestellt, dass die N-terminalen 41 und C-terminalen 111 Aminosäuren (102 bis 212) aus HpaC die Virulenz sowie Typ III-abhängige Sekretion unterstützen und für die Proteinfunktion von HpaC essentiell sind (Kapitel 3.2.1). Dagegen ist die zentrale Region (Aminosäure 42 bis 101) für die Funktion von HpaC vermutlich nicht erforderlich (Abbildung 3.20). Es war überraschend, dass HpaC-Derivate mit sequentiellen Deletionen der Aminosäuren 42 bis 101 die Sekretion von HrpF in einer *hpaC*-Deletionsmutante zumeist vollständig wiederherstellen konnten, jedoch die Kontrolle der

Sekretion von HrpB2 weiterhin deutlich beeinflusst war (Abbildung 3.20). Dagegen konnten die Deletionsderivate HpaC $_{\Delta 42-101}$ und HpaC $_{\Delta 62-91}$ nicht nur den mutanten Phänotyp komplementieren, sondern die Sekretion von HrpB2 in der *hpaC*-Deletionsmutante vollständig kontrollieren (Abbildung 3.20). Im Gegensatz dazu führten verhältnismäßig kleine Deletionen von lediglich fünf Aminosäuren (164 bis 168 und 171 bis 175) in der C-terminalen Region von HpaC zum vollständigen Verlust von Funktion und Kontrolle der Proteinsekretion. Die Aminosäuren 164 bis 168 und 171 bis 175 sind zwischen HpaC und HpaP konserviert. Zusätzlich schließen diese Sequenzbereiche konservierte Aminosäurereste von T3S4-Proteinen aus tierpathogener Bakterien ein (Abbildung 3.15). Der Funktionsverlust von HpaC $_{\Delta 164-168}$ und HpaC $_{\Delta 171-175}$ sowie die konservierten Aminosäurereste innerhalb dieses Sequenzabschnittes lassen auf eine bedeutende Rolle für die Proteinfunktion von HpaC schließen. Zudem zeigten die Sekretionsanalysen der unterschiedlichen HpaC-Deletionsderivate, dass die Sekretion von HrpB2 und HrpF unabhängig kontrolliert werden könnte (Abbildung 3.20). Diese Beobachtung legt nahe, dass der Mechanismus für die HpaC-abhängige Sekretion „früher“ T3S-Substrate vom Prozess der HpaC-abhängigen Sekretion „später“ T3S-Substrate entkoppelt werden kann. Diese Hypothese stimmt mit Ergebnissen einer Studie überein, in welcher durch eine spezifische Mutation von HrcU die Sekretion von HrpF in einer *hpaC*-Deletionsmutante wiederhergestellt werden konnte, aber die Übersekretion von HrpB2 unbeeinflusst blieb (Lorenz und Büttner 2011). Im Gegensatz zur Kontrolle der Sekretion von HrpF als „spätes“ T3S-Substrat, ist vermutlich die Anwesenheit von HpaC eine Voraussetzung für die Kontrolle der Sekretion von HrpB2, welches auf unabhängige Kontrollmechanismen für die Sekretion von HrpF und HrpB2 hindeutet.

4.2.2 Die Rolle der Interaktion zwischen HpaC, HrpB2 und der C-terminalen Domäne von HrcU

Eine Interaktion zwischen HrpB2 und dem zytoplasmatischen Protein HpaC wurde bereits nachgewiesen, daher könnte z.B. die stabile Interaktion im Zytoplasma der Bakterienzelle eine übermäßige Sekretion von HrpB2 verhindern (Lorenz *et al.* 2008b). Es ist denkbar, dass hierbei die zentralen Regionen von Aminosäure 42 bis 101 aus HpaC in unterschiedlichem Maße an einer effizienten Bindung von HrpB2 beteiligt sind und verschiedene Deletionen die Interaktion mal mehr oder weniger destabilisieren. Betrachtet man dabei die HpaC-abhängige Sekretion von HrpB2 und den Wechsel der Substratspezifität unabhängig voneinander, so könnten z.B. die Derivate HpaC $_{\Delta 42-51}$ oder HpaC $_{\Delta 62-71}$ grundsätzlich einen Konformationswechsel der C-terminalen Domäne von HrcU induzieren und so den Spezifitätswechsel unterstützen, aber die instabile Bindung zu HrpB2 nicht dessen

übermäßige Sekretion verhindern (Abbildung 3.20). Leider wurde bisher keine bevorzugte Region in HpaC für die spezifische Bindung von HrpB2 identifiziert. Eine Analyse der Interaktion zwischen HpaC- und HrpB2-Derivaten zeigte jedoch, dass HrpB2 wahrscheinlich die Fähigkeit besitzt, mit mehreren Regionen von HpaC eine Bindung einzugehen (Kapitel 3.1.9) (Schulz und Büttner 2011). Aus diesem Grund ist es schwierig den spezifischen Einfluss einer direkten Interaktion zwischen HrpB2 und HpaC bezüglich einer Kontrolle der Sekretion von HrpB2 zu untersuchen.

HpaC, HrpB2 und die C-terminale Domäne von HrcU können jedoch *in vitro* einen multimeren Komplex ausbilden (Schulz und Büttner 2011). Zudem hängt die jeweilige Interaktion von HrpB2 oder HpaC vom konservierten NPTH-Motiv in der C-terminalen Domäne von HrcU ab (Lorenz und Büttner 2011). So ist es denkbar, dass HpaC und HrpB2 um die gleiche Bindestelle am NPTH-Motiv konkurrieren und HpaC innerhalb eines multimeren Komplexes sterisch den Zugang von HrpB2 zur C-terminalen Domäne von HrcU bzw. dem NPTH-Motiv verhindert. Ob beide Proteine um die gleiche Bindestelle konkurrieren muss in zusätzlichen Analysen aufgeklärt werden, jedoch sind Protein-Protein Interaktionen zwischen HpaC, der C-terminalen Domäne von HrcU und HrpB2 entscheidend an der Kontrolle der Sekretion in *Xcv* beteiligt.

4.2.3 Die Bedeutung der C-terminalen Region und potentiellen T3S4-Domäne von HpaC.

Die Analyse der HpaC-Deletionsderivate zeigte, dass die Aminosäuren 112 bis 212 aus HpaC für eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU (HrcU₂₅₅₋₃₅₇) essentiell und ausreichend sind (Abbildung 3.20 und Abbildung 3.25). Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass auch verhältnismäßig kleine Deletionen von fünf Aminosäuren (164 bis 168 bzw. 171 bis 175) oder ein einzelner Austausch des konservierten Phenylalanins an Position 175 in der C-terminalen Region von HpaC zum Verlust der stabilen Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ führten. Interessanterweise hatte in HpaC der Austausch F175A zusätzlich einen negativen Einfluss auf die Virulenz und Kontrolle der Sekretion von HrpF sowie HrpB2 zur Folge. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Phenylalanin an der Position 175 eine tragende Rolle für die Funktion von HpaC besitzt und zugleich an der Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU maßgeblich beteiligt ist. Jedoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass allein die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU für die Funktion von HpaC ausreicht, da Deletionen N-terminaler Aminosäuren aus HpaC ebenfalls zu einem Funktionsverlust führten, aber die Interaktion zwischen HpaC und HrcU₂₅₅₋₃₅₇ unbeeinflusst blieb (Abbildung 3.20). Zusätzlich wird die Bindung von HpaC vermutlich nicht nur durch das konservierte

Phenylalanin vermittelt, da ein Austausch der Aminosäuren an den Positionen 164, 171 oder 173 ebenfalls die stabile Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ negativ beeinflussten (Abbildung 3.25). Nach den Ergebnissen der Interaktionsstudien kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung von HrcU₂₅₅₋₃₅₇ vermutlich durch den gesamten Bereich der C-terminalen 100 Aminosäuren aus HpaC vermittelt wird. Es wäre denkbar, dass eine spezifische Struktur der C-terminalen Region (Aminosäuren 112 bis 212) von HpaC für die effiziente Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ zwingend erforderlich ist.

Durch Deletionen oder einen Austausch von Aminosäuren könnte die Spezifität, welche durch eine bestimmte Struktur vermittelt wird, empfindlich gestört werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Vorhersage einer potentiell globulären Domäne in HpaC (<http://globplot.embl.de/>) beginnend mit dem Aminosäurerest 112, welche vermutlich eine durch α -Helices und β -Faltblättern organisierte Sekundärstruktur besitzt (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Die Vorhersage einer globulären Domäne mit α/β -Faltblattstruktur in der C-terminalen Region von HpaC ist sehr interessant, da diese strukturelle Eigenschaft von T3S4-Domänen aus T3S4-Proteinen wie z.B. YscP und FliK bekannt ist (Agrain *et al.* 2005a; Minamino *et al.* 2006). Daher kann die gesamte C-terminale Region, welche die potentielle T3S4-Domäne enthält, vermutlich als eine funktionelle Einheit betrachtet werden. So könnte eine in der C-terminalen Region von HpaC gelegene T3S4-Domäne die Interaktion mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ vermitteln.

Dieses Modell stimmt z.B. mit Beobachtungen für das bekannte T3S4-Protein FliK aus *Salmonella* spp. überein. FliK interagiert ebenfalls vermittelt durch die T3S4-Domäne mit der C-terminalen Domäne des HrcU homologen Proteins FlhB (Minamino und Macnab 2000a; Minamino und MacNab 2000c). Zudem konnte für *Xcv* gezeigt werden, dass ein HpaC-Derivat (HpaC _{Δ 02-111}) bestehend aus den Aminosäuren 112 bis 212 mit HrcU₂₅₅₋₃₅₇ interagiert und demnach die T3S4-Domäne aus HpaC grundsätzlich für eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU ausreicht (Abbildung 3.25). Jedoch war das Derivat HpaC _{Δ 02-111} weder in der Lage die Virulenz, noch die Kontrolle der Sekretion in einer *hpaC*-Deletionsmutante wiederherzustellen. Was wiederum mit vorherigen Beobachtungen übereinstimmt, wonach die N-terminale Region ebenfalls eine essentielle Bedeutung für die Funktion von HpaC besitzt. Interessanterweise führte die ektopische Expression des Derivates HpaC _{Δ 02-111} im *Xcv* Wildtypstamm zu einer reduzierten Sekretion von frühen und späten T3S-Substraten. Demnach besitzt anscheinend die stark erhöhte Proteinmenge des funktionslosen Derivates HpaC _{Δ 02-111} im *Xcv* Wildtypstamm einen dominant negativen Einfluss auf die Typ

III-abhängige Sekretion. HpaC $_{\Delta 02-111}$ könnte mittels seiner T3S4-Domäne zwar an die C-terminale Domäne von HrcU binden, inhibiert jedoch durch die fehlenden N-terminalen Aminosäuren die notwendigen strukturellen Veränderungen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von HrcU. Zusätzlich sind im Vergleich zum nativen HpaC wesentlich mehr Moleküle des funktionslosen Derivates HpaC $_{\Delta 02-111}$ in der Bakterienzelle vorhanden, was das Verhältnis der Interaktion zwischen HpaC bzw. HpaC $_{\Delta 02-111}$ mit der C-terminalen Region von HrcU immer zu Gunsten von HpaC $_{\Delta 02-111}$ verschiebt. Auf diese Weise wäre es denkbar, dass z.B. ein Wechsel der Substratspezifität zu späten Substraten nur sehr ineffizient bis gar nicht stattfindet oder alternativ der räumliche Zugang zum T3S-System für Substrate, wie z.B. HrpB2 oder HrpF, blockiert bleibt (Lorenz und Büttner 2011). Da für diese Hypothese die Interaktion zwischen HpaC $_{\Delta 02-111}$ und der C-terminalen Domäne von HrcU eine Voraussetzung darstellt, sollte der inhibitorische Effekt von HpaC $_{\Delta 02-111}$ im Fall einer fehlenden Interaktion aufgehoben werden können. In der Tat wurde diese Annahme für die Derivate HpaC $_{\Delta 02-111}$ L171A und HpaC $_{\Delta 02-111}$ F175A bestätigt (Abbildung 3.25).

Der inhibitorische Einfluss von HpaC $_{\Delta 02-111}$ könnte ebenso durch zusätzliche Bindung weiterer für die Typ III-abhängige Sekretion von *Xcv* wichtiger Proteine begründet werden. Da bereits zwischen HpaC und konservierten Komponenten des T3S-Systems (z.B. HrcN und HrcV) oder zusätzlichen T3S-Kontrollproteinen (z.B. HpaB und HpaA) eine Interaktion gezeigt wurde, könnte HpaC $_{\Delta 02-111}$ ebenso mit diesen Proteinen interagieren (Büttner *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2008a; Lorenz und Büttner 2009). Ob auch in diesen Fällen eine funktionelle T3S4-Domäne als potentielle Bindestelle agiert muss noch überprüft werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass für eine Selbstinteraktion von HpaC ebenfalls die C-terminale Domäne von HpaC ausreichend ist und ähnlich der Interaktion mit der C-terminalen Domäne von HrcU ein Austausch der konservierten Aminosäurereste L171 und F175 zu einem Verlust der Selbstinteraktion führt (Abbildung 3.24). Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass die T3S4-Domäne aus HpaC als eine Art universelle Bindestelle für verschiedene Substrate des T3S-Systems dient. Ist die Funktion der T3S4-Domäne aus HpaC z.B. durch einen Austausch von Aminosäuren gestört, könnte diese vermutlich nicht mehr mit den oben genannten Substraten interagieren. Das würde erklären, warum der inhibitorische Effekt von HpaC $_{\Delta 02-111}$ allein durch den Austausch der konservierten Aminosäurereste L171 und F175 aufgehoben werden kann, jedoch die Abwesenheit von HrcU keinen Einfluss besitzt.

Die Identifizierung der C-terminalen Region aus HpaC als potentielle T3S4-Domäne und wahrscheinliche Bindestelle der C-terminalen Domäne von HrcU stimmt mit mehreren Beobachtungen aus tierpathogenen Modellorganismen überein. So wurde z.B. gezeigt, dass das FlhB/YscU homologe Protein Spa40 aus *Shigella flexneri* ebenfalls mit der C-terminalen Region des T3S4-Proteins Spa32 interagiert und ähnlich wie in HpaC diese Region essentiell für die eigene Proteinfunktion ist (Botteaux *et al.* 2008). Wie bereits erwähnt konnten in FliK aus *Salmonella* spp. ähnlich wichtige Regionen und funktionelle Aminosäuren in der C-terminalen Domäne (T3S4-Domäne) identifiziert werden (Minamino *et al.* 2006). Zudem wurde gezeigt, dass die T3S4-Domäne von FliK aus *Salmonella* spp. mit der C-terminalen Domäne des HrcU homologen Proteins FlhB interagiert (Minamino und Macnab 2000a; Minamino und MacNab 2000c). Es wird vorgeschlagen, dass die Interaktion des T3S4-Proteins FliK einen Konformationswechsel in der C-terminalen Domäne von FlhB (FlhB_C) induziert und so einen Wechsel der Substratspezifität des flagellären T3S-Systems von Komponenten des Hakens zu Filamentproteinen auslöst (Minamino *et al.* 2005; Cornelis *et al.* 2006). Für dieses Modell wird desweiteren angenommen, dass die Interaktion zwischen FliK und FlhB_C vermutlich durch die N-terminale Region von FliK kontrolliert wird, da die T3S4-Domäne von FliK den Phänotyp einer *fliK*-Mutante nicht komplementieren konnte (Minamino *et al.* 2004). Dies stimmt ebenfalls mit den Beobachtungen für HpaC aus *Xcv* überein, wonach die N-terminale Region für die Funktion von HpaC zwingend benötigt wird (Abbildung 3.17). Basierend auf den Gemeinsamkeiten der durch das T3S4-Proteins HpaC und HrcU vermittelten Kontrolle der Substratspezifität wird vermutet, dass ein Wechsel von frühen zu späten T3S-Substraten in *Xcv* ähnlich ablaufen könnte (Lorenz und Büttner 2011).

4.2.4 HpaC kontrolliert vermutlich nicht die Länge des Hrp-Pilus in *Xcv*.

Ein wichtiger Unterschied zwischen Tier- und Pflanzenpathogenen betrifft die Kontrolle der Länge der extrazellulären Nadelstruktur, welche mit dem Sekretionsapparat von tierpathogenen Bakterien assoziiert ist. In translokations-assozierten und flagellären T3S-Systemen tierpathogener Bakterien ist die Längenkontrolle der Nadel- bzw. Hakenstruktur zumeist direkt mit dem Wechsel der Substratspezifität gekoppelt. Zum Beispiel ist bekannt, dass das T3S4-Protein FliK nach einer kontrollierten Fertigstellung des Hakens die Sekretion von Filamentproteinen aktiviert, da die Deletion von *fliK* in *Salmonella* spp. u.a. zu einer stark verlängerten Hakenstruktur führt (Hirano *et al.* 1994; Williams *et al.* 1996; Eggenhofer *et al.* 2006). Auf eine ähnlich Weise reguliert das T3S4-Protein YscP aus *Yersinia* spp. im translokations-assozierten T3S-System die Länge der extrazellulären Nadel (Cornelis *et al.*

2006). Im Gegensatz zu HpaC aus *Xcv* wird YscP aber selbst Typ III-abhängig sekretiert (Agrain *et al.* 2005b). Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dass der N-Terminus von YscP mit der Spitze der Nadel verknüpft ist und im Besonderen während einer zunehmenden Länge der Nadelstruktur verankert bleibt. Wird dann eine über YscP definierte Länge der Nadel erreicht, bindet vermutlich der C-terminale Bereich von YscP am Sekretionsapparat und induziert einen Wechsel in der Substratspezifität (Agrain *et al.* 2005b). Entsprechend diesem Modell wird angenommen, dass T3S4-Proteine als eine Art zelluläres Maßband („molecular ruler“) die Länge der Nadelstruktur bestimmen und dieser Prozess vermutlich direkt mit dem Wechsel der Substratspezifität gekoppelt ist (Agrain *et al.* 2005a; Cornelis *et al.* 2006).

Nach einer Vielzahl von Hinweisen aus tierpathogenen Bakterien wurde vorgeschlagen, dass die als „molecular ruler“ fungierenden T3S4-Proteine sich zunächst mit dem N-terminalen Bereich durch den Sekretionsapparat fädeln, welches darauf hin zu einer strukturellen Dehnung oder teilweisen Entfaltung des Proteins führen könnte. Dieser Zustand erlaubt dann bei einer durch das T3S4-Protein definierten Länge eine direkte Interaktion der potentiellen T3S4-Domäne mit der zytoplasmatischen Domäne von Proteinen der FlhB/YscU-Familie und löst damit den Wechsel der Substratspezifität von frühen zu späten T3S-Substraten aus (Cornelis *et al.* 2006; Richard *et al.* 2007; Erhardt *et al.* 2010; Wagner *et al.* 2010). Mit Blick auf den wesentlich längeren extrazellulären Pilus von pflanzenpathogenen Bakterien (Pilus ca. 2 μm vs. Nadel ca. 50 nm) scheint ein vergleichbares Modell für HpaC aus *Xcv* eher unwahrscheinlich. Es ist sterisch kaum vorstellbar, dass HpaC als einziges und verhältnismäßig kleines T3S4-Protein die gesamte Länge des Hrp-Pilus von *Xcv* überbrückt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HpaC im Gegensatz zu z.B. YscP selbst nicht Typ III-abhängig sekretiert wird (Agrain *et al.* 2005b; Büttner *et al.* 2006). Zudem wurde in dieser Arbeit deutlich gemacht, dass eine 60 Aminosäuren umfassende Deletion in der zentralen Region von HpaC keinen Einfluss auf die Funktion oder Sekretion von späten Substraten besitzt, daher eine definierte Länge von HpaC vermutlich keine Bedeutung für den Wechsel der Substratspezifität in *Xcv* hat. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass in Abwesenheit von HpaC die Hauptkomponente des Hrp-Pilus HrpE unbeeinflusst sekretiert wird (Büttner *et al.* 2006). HpaC besitzt als zytoplasmatisches T3S4-Protein zunächst keinen sichtbaren Einfluss auf die Länge des Hrp-Pilus (Kapitel 3.1.6). Aus diesen Gründen besitzt HpaC vermutlich nicht die Funktion als eine Art „molekularer ruler“ die Länge des Hrp-Pilus in *Xcv* zu kontrollieren.

4.2.5 Modell des Wechsels der Substratspezifität des T3S-Systems aus *Xcv*.

Es ist für *Xcv* vorstellbar, dass zunächst das für die Pilusassemblierung benötigte T3S-Substrat HrpB2 an die C-terminale Domäne von HrcU bindet und dieser Zustand die Passage von HrpB2 über die IM durch den Sekretionsapparat fördert. Da das zytoplasmatische T3S4-Protein HpaC ebenfalls mit der C-terminale Domäne von HrcU und zusätzlich mit HrpB2 interagiert, könnten beide vermutlich um die gleiche Bindestelle konkurrieren (Lorenz und Büttner 2011). Bindet nun HpaC an HrpB2 und mit der in dieser Arbeit charakterisierten T3S4-Domäne an die C-terminale Domäne von HrcU, löst dies auf noch unbekannte Weise eine räumliche Umstrukturierung aus, welche die proteolytische Spaltung des NPTH-Motivs der C-terminalen Domäne von HrcU zur Folge hat. Diese Spaltung führt in letzter Konsequenz zu einer vollständigen Konformationsänderung der C-terminalen Domäne von HrcU und induziert damit einen Spezifitätswechsel, welcher die Sekretion später T3S-Substrate fördert, jedoch mit Hilfe von HpaC die Passage von HrpB2 durch den Sekretionsapparat über die bakterielle innere Membran blockiert (Lorenz *et al.* 2008b; Lorenz und Büttner 2011). Auf diese Weise könnte HpaC die Sekretion von HrpB2 kontrollieren und den Spezifitätswechsel induzieren.

In zukünftigen Arbeiten sollte vor allem die spezifische Rolle der N-terminalen Region von HpaC analysiert werden. Hierbei sind noch weitestgehend offenen Fragestellungen zu klären, z.B. welche genaue Rolle die N-terminale Aminosäuresequenz für den Wechsel der Substratspezifität besitzt oder in welchem Maße diese Region an entscheidenden Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein könnte. Es ist durchaus möglich, dass u.a. die N-terminale Region von HpaC entscheidend am vorhergesagten Konformationswechsel der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne von HrcU beteiligt ist. Jedoch bedarf es zusätzlicher Studien wie die N-terminale Region aus HpaC z.B. mit Hilfe zusätzlicher Interaktionspartner (v.a. konservierte Komponenten und Kontrollproteine des T3S-Systems) diesen Prozess unterstützt (Büttner *et al.* 2006; Lorenz und Büttner 2009).

5. Literaturverzeichnis

- Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L. J. Mota and G. R. Cornelis (2005a). "Characterization of a type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*." Mol. Microbiol. **56**(1): 54-67.
- Agrain, C., I. Sorg, C. Paroz and G. R. Cornelis (2005b). "Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity." Mol. Microbiol. **57**(5): 1415-1427.
- Aizawa, S. I. (2001). "Bacterial flagella and type III secretion systems." FEMS Microbiol. Lett. **202**(2): 157-64.
- Aldridge, P. and K. T. Hughes (2001). "How and when are substrates selected for type III secretion?" Trends Microbiol. **9**(5): 209-214.
- Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. I. Ramos, A. C. R. da Silva and C. S. Farah (2004). "New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the Type III Secretion System of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri." J. Bacteriol. **186**(18): 6186-6197.
- Alfano, J. R. and A. Collmer (2004). "Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense." Annu. Rev. Phytopathol. **42**: 385-414.
- Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter and G. R. Cornelis (1994). "YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion." J. Bacteriol. **176**(15): 4534-42.
- Allen-Vercoe, E., M. C. Toh, B. Waddell, H. Ho and R. DeVinney (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**(2): 355-364.
- Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer and O. Schneewind (1999). "Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(22): 12839-12843.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind (1997). "A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*." Science **278**(5340): 1140-1143.
- Andersson, K., K. E. Magnusson, M. Majeed, O. Stendahl and M. Fallman (1999). "*Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH." Infect. Immun. **67**(5): 2567-74.
- Arnold, R., S. Brandmaier, F. Kleine, P. Tischler, E. Heinz, S. Behrens, A. Niinikoski, H. W. Mewes, M. Horn and T. Rattei (2009). "Sequence-based prediction of type III secreted proteins." PLoS Pathog. **5**: e1000376.
- Bender, C. L., F. Alarcon-Chaidez and D. C. Gross (1999). "*Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**(2): 266-92.
- Berger, C., G. P. Robin, U. Bonas and R. Koebnik (2010). "Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Microbiology **156**(7): 1963-1974.
- Bjornfot, A. C., M. Lavander, A. Forsberg and H. Wolf-Watz (2009). "Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins." J. Bacteriol. **191**(13): 4259-67.
- Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2006). "Characterization of the *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion ATPase YscN and Its Regulator, YscL." Journal of bacteriology **188**(10): 3525-3534.
- Blaylock, B., J. A. Sorg and O. Schneewind (2008). "*Yersinia enterocolitica* type III secretion of YopR requires a structure in its mRNA." Mol. Microbiol. **70**(5): 1210-1222.

- Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti and A. Allaoui (2001). "Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton." Mol. Microbiol. **39**(3): 652-663.
- Blocker, A., K. Komoriya and S. Aizawa (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **100**(6): 3027-30.
- Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos and F. Van Gijsegem (1996). "Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria." Mol. Microbiol. **20**(3): 681-3.
- Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz and R. E. Stall (1991). "Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato." Mol. Plant-Microbe Interact. **4**: 81-88.
- Botteaux, A., M. Sani, C. A. Kayath, E. J. Boekema and A. Allaoui (2008). "Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism." Mol. Microbiol. **70**(6): 1515-28.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. **41**: 459-472.
- Buchko, G. W., G. Niemann, E. S. Baker, M. E. Belov, R. D. Smith, F. Heffron, J. N. Adkins and J. E. McDermott (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**(12): 2448-58.
- Burghout, P., R. Van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen and M. Koster (2004). "Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*." Journal of bacteriology **186**(14): 4645.
- Büttner, D. (2012). "Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **76**(2): 262-310.
- Büttner, D. and U. Bonas (2006). "Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion." Curr. Opin. Microbiol. **9**(2): 193-200.
- Büttner, D. and U. Bonas (2002). "Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell." EMBO J. **21**(20): 5313-5322.
- Büttner, D. and U. Bonas (2002). "Port of entry - the type III secretion translocon." Trends Microbiol. **10**(4): 186-192.
- Büttner, D., D. Gurlebeck, L. D. Noel and U. Bonas (2004). "HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion." Mol. Microbiol. **54**(3): 755-68.
- Büttner, D. and S. Y. He (2009). "Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria." Plant. Physiol. **150**(4): 1656-64.
- Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber and U. Bonas (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**(2): 513-27.
- Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klusener and U. Bonas (2002). "Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." J. Bacteriol. **184**(9): 2389-98.

- Büttner, D., L. Noel, J. Stuttmann and U. Bonas (2007). "Characterization of the non-conserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Mol. Plant. Microbe Interact. **20**: 1063-1074.
- Canteros, B. I. (1990). Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, University of Florida.
- Cappelletti, P. A., R. F. dos Santos, A. M. do Amaral, R. A. Homem, S. Souza Tdos, M. A. Machado and C. S. Farah (2011). "Structure-function analysis of the HrpB2-HrcU interaction in the *Xanthomonas citri* type III secretion system." PLoS One **6**(3): e17614.
- Chang, J. H., A. K. Goel, S. R. Grant and J. L. Dangl (2004). "Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria." Curr. Opin. Microbiol. **7**(1): 11-8.
- Chiu, H. J., W. S. Lin and W. J. Syu (2003). "Type III secretion of EspB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Arch. Microbiol. **180**(3): 218-26.
- Collazo, C. M. and J. E. Galan (1996). "Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*." Infect. Immun. **64**(9): 3524-31.
- Coomes, B. K. and B. B. Finlay (2005). "Insertion of the bacterial type III translocon: not your average needle stick." Trends Microbiol. **13**(3): 92-5.
- Coplin, D. L. and D. Cook (1990). "Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria." Mol. Plant-Microbe Interact. **3**: 271-279.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat. Rev. Microbiol. **4**(11): 811-825.
- Cornelis, G. R., C. Agrain and I. Sorg (2006). "Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages." Curr. Opin. Microbiol. **9**(2): 201-206.
- Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." Annu. Rev. Microbiol. **54**: 735-774.
- Costa, S. C. P., A. M. Schmitz, F. F. Jahufar, J. D. Boyd, M. Y. Cho, M. A. Glicksman and C. F. Lesser (2012). "A New Means To Identify Type 3 Secreted Effectors: Functionally Interchangeable Class IB Chaperones Recognize a Conserved Sequence." mBio **3**(1).
- Crepin, V. F., S. Prasanna, R. K. Shaw, R. K. Wilson, E. Creasey, C. M. Abe, S. Knutton, G. Frankel and S. Matthews (2005). "Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ." Mol. Microbiol. **55**(6): 1658-1670.
- Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde and A. H. Fielding (1984). "Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1." EMBO J. **3**: 3323-3328.
- Deakin, W. J., C. Marie, M. M. Saad, H. B. Krishnan and W. J. Broughton (2005). "NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234." Mol. Plant Microbe Interact. **18**(5): 499-507.
- Deane, J. E., P. Abrusci, S. Johnson and S. M. Lea (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." Cell. Mol. Life Sci. **67**(7): 1065-75.
- Deane, J. E., S. C. Graham, E. P. Mitchell, D. Flot, S. Johnson and S. M. Lea (2008). "Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system." Mol. Microbiol. **69**(1): 267-76.
- Deng, W. L., G. Preston, A. Collmer, C. J. Chang and H. C. Huang (1998). "Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants." J. Bacteriol. **180**(17): 4523-4531.
- Desvaux, M., M. Hebraud, I. R. Henderson and M. J. Pallen (2006). "Type III secretion: what's in a name?" Trends Microbiol. **14**(4): 157-160.

- Dharmapuri, S. and R. V. Sonti (1999). "A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence." FEMS Microbiol. Lett. **179**(1): 53-59.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin and D. Helinski (1980). "Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 7347-7351.
- Dyrlov Bendtsen, J., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004). "Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0." Journal of Molecular Biology **340**(4): 783-795.
- Edqvist, P. J., M. Aili, J. Liu and M. S. Francis (2007). "Minimal YopB and YopD translocator secretion by *Yersinia* is sufficient for Yop-effector delivery into target cells." Microbes Infect. **9**(2): 224-33.
- Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz and S. A. Lloyd (2003). "YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system." J. Bacteriol. **185**(7): 2259-2266.
- Eggenhofer, E., R. Rachel, M. Haslbeck and B. Scharf (2006). "MotD of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as FliK." J. Bacteriol. **188**(6): 2144-2153.
- Engler, C., R. Kandzia and S. Marillonnet (2008). "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability." PLoS ONE **3**(11).
- Erhardt, M., K. Namba and K. T. Hughes (2010). "Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome." Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **2**(11): a000299.
- Escobar, L., G. Van den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier and U. Bonas (2001). "Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT." Mol. Plant Pathol. **2**(5): 287-296.
- Feldman, M. F. and G. R. Cornelis (2003). "The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa." FEMS Microbiol. Lett. **219**(2): 151-8.
- Fenselau, S. and U. Bonas (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**(6): 845-854.
- Ferris, H. U., Y. Furukawa, T. Minamino, M. B. Kroetz, M. Kihara, K. Namba and R. M. Macnab (2005). "FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism." J. Biol. Chem. **280**(50): 41236-41242.
- Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**(4): 1648-52.
- Flor, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." Annu. Rev. Phytopathol. **9**: 275-296.
- Galan, J. E. and H. Wolf-Watz (2006). "Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines." Nature **444**(7119): 567-573.
- Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." Int. J. Med. Microbiol. **297**(6): 401-15.
- Ghosh, P. (2004). "Process of protein transport by the type III secretion system." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**(4): 771-95.
- Gophna, U., E. Z. Ron and D. Graur (2003). "Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events." Gene **312**: 151-63.
- Goure, J., P. Broz, O. Attree, G. R. Cornelis and I. Attree (2005). "Protective Anti-V Antibodies Inhibit Pseudomonas and Yersinia Translocon Assembly within Host Membranes." Journal of Infectious Diseases **192**(2): 218-225.

- Grant, S. R., E. J. Fisher, J. H. Chang, B. M. Mole and J. L. Dangl (2006). "Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria." Annu. Rev. Microbiol. **60**: 425-49.
- Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler and J. T. Greenberg (2002). "A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*." Science **295**(5560): 1722-1726.
- Hartmann, N., S. Schulz, C. Lorenz, S. Fraas, G. Hause and D. Buettner (2012). "Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation." Microbiology.
- Hayes, C. S., S. K. Aoki and D. A. Low (2010). "Bacterial contact-dependent delivery systems." Annu. Rev. Genet. **44**: 71-90.
- He, S. Y. and Q. Jin (2003). "The Hrp pilus: learning from flagella." Curr. Op. Microbiol. **6**: 15-19.
- He, S. Y., K. Nomura and T. S. Whittam (2004). "Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens." Biochim. Biophys. Acta **1694**(1-3): 181-206.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa and S. Aizawa (1994). "Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. **176**(17): 5439-5449.
- Hoiczyk, E. and G. Blobel (2001). "Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(8): 4669-74.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(2): 379-433.
- Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik and U. Bonas (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**(6): 1379-1390.
- Izoré, T., V. Job and A. Dessen (2011). "Biogenesis, Regulation, and Targeting of the Type III Secretion System." Structure (London, England : 1993) **19**(5): 603-612.
- Jin, Q., R. Thilmony, J. Zwiesler-Vollick and S. Y. He (2003). "Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*." Microbes. Infect. **5**(4): 301-10.
- Johnson, T. L., J. Abendroth, W. G. Hol and M. Sandkvist (2006). "Type II secretion: from structure to function." FEMS Microbiol. Lett. **255**(2): 175-86.
- Journet, L., C. Agrain, P. Broz and G. R. Cornelis (2003). "The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler." Science **302**(5651): 1757-1760.
- Juhas, M., D. W. Crook and D. W. Hood (2008). "Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence." Cell. Microbiol. **10**(12): 2377-86.
- Kao, C. C., E. Barlow and L. Sequeira (1992). "Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*." Journal of bacteriology **174**(3): 1068-1071.
- Karlinsey, J. E., J. Lonner, K. L. Brown and K. T. Hughes (2000). "Translation/secretion coupling by type III secretion systems." Cell **102**(4): 487-97.
- Kim, B. H., H. G. Kim, J. S. Kim, J. I. Jang and Y. K. Park (2007). "Analysis of functional domains present in the N-terminus of the SipB protein." Microbiology **153**(Pt 9): 2998-3008.
- Klement, Z. (1982). Hypersensitivity. Phytopathogenic prokaryotes. M. S. Mount and G. H. Lacy. New York, Academic Press. **2**: 149-177.
- Knoop, V., B. Staskawicz and U. Bonas (1991). "Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors." J. Bacteriol. **173**: 7142-7150.
- Koebnik, R., A. Krüger, F. Thieme, A. Urban and U. Bonas (2006). "Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes." J. Bacteriol. **188**(21): 7652-7660.

- Kostakioti, M., C. L. Newman, D. G. Thanassi and C. Stathopoulos (2005). "Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane." J. Bacteriol. **187**(13): 4306-14.
- Koster, M., W. Bitter, H. De Cock and A. Allaoui (1997). "The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring shaped multimeric complex." Mol. Microbiol. **26**(4): 789-797.
- Kousik, C. S. and D. F. Ritchie (1998). "Response of Bell Pepper Cultivars to Bacterial Spot Pathogen Races that Individually Overcome Major Resistance Genes." Plant Disease **82**(2): 181-186.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd and K. M. Peterson (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan and S. I. Aizawa (1998). "Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Science **280**(5363): 602-5.
- Kubori, T., A. Sukhan, S.-I. Aizawa and J. E. Galan (2000). "Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(18): 10225-10230.
- Kvitko, B. H., A. R. Ramos, J. E. Morello, H. S. Oh and A. Collmer (2007). "Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors." J. Bacteriol. **189**(22): 8059-72.
- Lara-Tejero, M., J. Kato, S. Wagner, X. Liu and J. E. Galan (2011). "A Sorting Platform Determines the Order of Protein Secretion in Bacterial Type III Systems." Science **331**(6021): 1188-1191.
- Lavander, M., L. Sundberg, P. J. Edqvist, S. A. Lloyd, H. Wolf-Watz and A. Forsberg (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**(16): 4500-9.
- Lee, J., B. Klüsener, G. Tsiamis, C. Stevens, C. Neyt, A. P. Tampakaki, N. J. Panopoulos, J. Noller, E. W. Weiler, G. R. Cornelis, J. W. Mansfield and T. Nürnberger (2001). "HrpZ_{PspH} from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(1): 289-294.
- Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist and H. Wolf-Watz (2001). "*Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals." Mol. Microbiol. **39**(2): 520-532.
- Lloyd, S. A., M. Sjöström, S. Andersson and H. Wolf-Watz (2002). "Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences." Mol. Microbiol. **43**(1): 51-59.
- Lorenz, C. and D. Büttner (2009). "Functional Characterization of the Type III Secretion ATPase HrcN from the Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." J. Bacteriol. **191**(5): 1414-1428.
- Lorenz, C. and D. Büttner (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**(2): 447-67.
- Lorenz, C., O. Kirchner, M. Egler, J. Stuttmann, U. Bonas and D. Büttner (2008a). "HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion." Mol. Microbiol. **69**(2): 344-60.
- Lorenz, C., S. Schulz, T. Wolsch, O. Rossier, U. Bonas and D. Büttner (2008b). "HpaC Controls Substrate Specificity of the *Xanthomonas* Type III Secretion System." PLoS Pathogen **4**(6): e1000094.
- Lountos, G. T., B. P. Austin, S. Nallamsetty and D. S. Waugh (2009). "Atomic resolution structure of the cytoplasmic domain of *Yersinia pestis* YscU, a regulatory switch involved in type III secretion." Protein Sci. **18**(2): 467-74.
- Löwer, M. and G. Schneider (2009). "Prediction of type III secretion signals in genomes of gram-negative bacteria." PLoS ONE **4**(6).

- Magdalena, J., A. Hachani, M. Chamekh, N. Jouihri, P. Gounon, A. Blocker and A. Allaoui (2002). "Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins." J. Bacteriol. **184**(13): 3433-3441.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, M. a. Lara-Tejero, D. Thomas, V. M. Unger and J. E. Galán (2006). "Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome." Nature **441**(7093): 637-640.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan and V. M. Unger (2004). "Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex." Science **306**(5698): 1040-1042.
- McDowell, J. M. and S. A. Simon (2007). "Molecular diversity at the plant-pathogen interface." Dev. Comp. Immunol.
- McMurry, J. L., J. W. Murphy and B. González-Pedrajo (2006). "The FliN-FliH Interaction Mediates Localization of Flagellar Export ATPase FliI to the C Ring Complex. ." Biochemistry **45**(39): 11790-11798.
- McMurry, J. L., J. S. Van Arnam, M. Kihara and R. M. Macnab (2004). "Analysis of the cytoplasmic domains of Salmonella FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery." J. Bacteriol. **186**(22): 7586.
- Ménard, R., P. J. Sansonetti and C. Parsot (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.
- Meyer, D., S. Cunnac, M. Gueneron, C. Declercq, F. Van Gijsegem, E. Lauber, C. Boucher and M. Arlat (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**(13): 4903-17.
- Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf and A. Aderem (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **107**(7): 3076-80.
- Michiels, T. and G. R. Cornelis (1991a). "Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system." J. Bacteriol. **173**(5): 1677-1685.
- Michiels, T., J.-C. Vanooteghem, C. Lambert de Rouvroit, B. China, A. Gustin, P. Boudry and G. R. Cornelis (1991b). "Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*." J. Bacteriol. **173**: 4994-5009.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minamino, T., H. U. Ferris, N. Moriya, M. Kihara and K. Namba (2006). "Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus." J. Mol. Biol. **362**(5): 1148-58.
- Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, K. Yamaguchi, S. I. Aizawa and R. M. Macnab (1999a). "FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in Salmonella, is exported during hook assembly." Mol. Microbiol. **34**(2): 295-304.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (1999b). "Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates." J. Bacteriol. **181**(5): 1388-94.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (2000a). "Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching." J. Bacteriol. **182**(17): 4906-4914.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (2000b). "FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity." Mol. Microbiol. **37**(6): 1494-1503.
- Minamino, T. and R. M. MacNab (2000c). "Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates." Mol. Microbiol. **35**(5): 1052-1064.

- Minamino, T. and A. P. Pugsley (2005). "Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length." Mol. Microbiol. **56**(2): 303-308.
- Minamino, T., Y. Saijo-Hamano, Y. Furukawa, B. Gonzalez-Pedrajo, R. M. Macnab and K. Namba (2004). "Domain organization and function of Salmonella FliK, a flagellar hook-length control protein." J. Mol. Biol. **341**(2): 491-502.
- Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz and R. E. Stall (1990). "Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions." Mol. Plant-Microbe Interact. **3**(1): 41-47.
- Morbiter, R., J. Elsaesser, J. Hausner and T. Lahaye (2011). "Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning." Nucleic Acids Res. **39**(13): 5790-9.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama and C. Sasakawa (2006). "Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery." Journal of Biological Chemistry **281**(1): 599.
- Mota, L. J., I. Sorg and G. R. Cornelis (2005). "Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express." FEMS Microbiol. Lett. **252**(1): 1-10.
- Mudgett, M. B. (2005). "New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants." Annu. Rev. Plant Biol. **56**: 509-531.
- Mueller, C. A., P. Broz and G. R. Cornelis (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." Mol. Microbiol. **68**(5): 1085-1095.
- Murillo, J., H. Shen, D. Gerhold, A. Sharma, D. A. Cooksey and N. T. Keen (1994). "Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23." Plasmid **31**(3): 275-287.
- Napoli, C. and B. Staskawicz (1987). "Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*." J. Bacteriol. **169**(2): 572-578.
- Nennstiel, D., J. Boch and U. Bonas (2000). "Bakterielle Phytopathogenese - *Xanthomonas* als Modellorganismus." Biospektrum: 23-26.
- Nguyen, L., I. T. Paulsen, J. Tchieu, C. J. Hueck and M. H. Saier (2000). "Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **2**(2): 125-144.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Eng. **10**(1): 1-6.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel and U. Bonas (2001). "cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Mol. Microbiol. **41**(6): 1271-81.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel and U. Bonas (2002). "Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island." J. Bacteriol. **184**: 1340-1348.
- Ogino, T., R. Ohno, K. Sekiya, A. Kuwae, T. Matsuzawa, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi and A. Abe (2006). "Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **188**(8): 2801-11.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab and T. Iino (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. **176**(8): 2272-2281.
- Page, A. L. and C. Parsot (2002). "Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades." Mol. Microbiol. **46**(1): 1-11.
- Parsot, C., C. Hamiaux and A. L. Page (2003). "The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems." Curr. Opin. Microbiol. **6**(1): 7-14.

- Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer and J. R. Alfano (2002). "Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**(11): 7652-7.
- Plano, G. V., S. S. Barve and S. C. Straley (1991). "LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response." J. Bacteriol. **173**: 7293-7303.
- Racapé, J., L. Belbahri, S. Engelhardt, B. Lacombe, J. Lee, J. Lochman, A. Marais, M. Nicole, T. Nürnberger, F. Parlange, S. Puverel and H. Keller (2005). "Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco." Mol. Microbiol. **58**(5): 1406-1420.
- Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz and R. G. Tompkins (2000). "Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(16): 8815-8821.
- Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind (2005). "A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal." J. Bacteriol. **187**(2): 707-15.
- Richard, C. W., W. O. T. Paul and A. R. Kieran (2007). "The FliK protein and flagellar hook-length control." Protein Sci. **16**(5): 769-780.
- Riordan, K. E. and O. Schneewind (2008a). "YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes." Mol. Microbiol. **68**(6): 1485-1501.
- Riordan, K. E., J. A. Sorg, B. J. Berube and O. Schneewind (2008b). "Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway." J. Bacteriol. **190**(18): 6204-16.
- Roine, E., W. S. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiäho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk and S. Y. He (1997). "Hrp pilus: A hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**(7): 3459-3464.
- Ronald, P. C. and B. J. Staskawicz (1988). "The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein." Mol. Plant-Microbe Interact. **1**(5): 191-198.
- Rossier, O., G. Van den Ackerveken and U. Bonas (2000). "HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant." Mol. Microbiol. **38**(4): 828-838.
- Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn and U. Bonas (1999). "The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(16): 9368-9373.
- Saad, M. M., H. Kobayashi, C. Marie, I. R. Brown, J. W. Mansfield, W. J. Broughton and W. J. Deakin (2005). "NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages." J. Bacteriol. **187**(3): 1173-81.
- Saad, M. M., C. Staehelin, W. J. Broughton and W. J. Deakin (2008). "Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234." J. Bacteriol. **190**(2): 750-4.
- Sal-Man, N., W. Deng and B. B. Finlay (2012). "EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*." Biochem J. **442**(1): 119-25.
- Samatey, F. A., H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T. R. Shaikh, D. R. Thomas, J. Z. Chen, D. J. DeRosier, A. Kitao and K. Namba (2004). "Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism." Nature **431**(7012): 1062-1068.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samudrala, R., F. Heffron and J. E. McDermott (2009). "Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems." PLoS Pathogen **5**(4): e1000375.
- Sandkvist, M. (2001). "Type II secretion and pathogenesis." Infect. Immun. **69**(6): 3523-35.
- Sani, M., A. Allaoui, F. Fusetti, G. T. Oostergetel, W. Keegstra and E. J. Boekema (2007). "Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*." Micron. **38**(3): 291-301.
- Schechter, L. M., K. A. Roberts, Y. Jamir, J. R. Alfano and A. Collmer (2004). "*Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter." J. Bacteriol. **186**(2): 543-55.
- Schesser, K., E. Frithz-Lindsten and H. Wolf-Watz (1996). "Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes." J. Bacteriol. **178**(24): 7227-7233.
- Schlumberger, M. C., A. J. Müller, K. Ehrbar, B. Winnen, I. Duss, B. Stecher and W. D. Hardt (2005). "Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**(35): 12548.
- Schulte, R. and U. Bonas (1992a). "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.
- Schulte, R. and U. Bonas (1992b). "A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino-acids." Plant Cell **4**(1): 79-86.
- Schulz, S. and D. Büttner (2011). "Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*." Infect. Immun.: IAI.00180-11.
- Silva-Herzog, E., F. Ferracci, M. W. Jackson, S. S. Joseph and G. V. Plano (2008). "Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein." Microbiology **154**(Pt 2): 593-607.
- Slot, K. A. E. v., apos and W. Knogge (2002). "A Dual Role for Microbial Pathogen-Derived Effector Proteins in Plant Disease and Resistance." Critical Reviews in Plant Sciences **21**(3): 229 - 271.
- Sorg, I., S. Wagner, M. Amstutz, S. A. Muller, P. Broz, Y. Lussi, A. Engel and G. R. Cornelis (2007). "YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome." EMBO J. **26**(12): 3015-3024.
- Sorg, J. A., B. Blaylock and O. Schneewind (2006). "Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**(44): 16490-5.
- Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont and G. R. Cornelis (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**(26): 11998-12002.
- Spaeth, K. E., Y.-S. Chen and R. H. Valdivia (2009). "The *Chlamydia* type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex." PLoS Pathogen **5**(9): e1000579.
- Spreter, T., C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller and N. C. J. Strynadka (2009). "A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system." Nat. Struct. Mol. Biol. **16**(5): 468-476.
- Staskawicz, B. J. (2001). "Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance." Plant Physiol. **125**(1): 73-76.
- Sukhan, A., T. Kubori and J. E. Galan (2003). "Synthesis and Localization of the *Salmonella* SPI-1 Type III Secretion Needle Complex Proteins PrgI and PrgJ." J. Bacteriol. **185**(11): 3480-3483.
- Sukhan, A., T. Kubori, J. Wilson and J. E. Galan (2001). "Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex." J. Bacteriol **183**(4): 1159-67.

- Suzuki, H., K. Yonekura and K. Namba (2004). "Structure of the Rotor of the Bacterial Flagellar Motor Revealed by Electron Cryomicroscopy and Single-particle Image Analysis." J. Mol. Biol. **337**(1): 105-113.
- Szczesny, R., M. Jordan, C. Schramm, S. Schulz, V. Coge, U. Bonas and D. Büttner (2010). "Functional characterization of the *Xcs* and *Xps* type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." New Phytologist **187**(4): 983-1002.
- Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai and C. Sasakawa (2000). "Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors." Embo J. **19**(15): 3876-87.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos and M. Kokkinidis (2004). "Conserved features of type III secretion." Cell Microbiol. **6**(9): 805-16.
- Tampakaki, A. P., N. Skandalis, A. D. Gazi, M. N. Bastaki, P. F. Sarris, S. N. Charova, M. Kokkinidis and N. J. Panopoulos (2010). "Playing the Harp: Evolution of Our Understanding of *hrp/hrc* Genes." Annual Review of Phytopathology.
- Thein, M., G. Sauer, N. Paramasivam, I. Grin and D. Linke (2010). "Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies." J. Proteome Res. **9**(12): 6135-47.
- Van Gijsegem, F., J. Vasse, R. De Rycke, P. Castello and C. Boucher (2002). "Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly." Mol. Microbiol. **44**(4): 935-46.
- Veenendaal, A. K. J., C. van der Does and A. J. M. Driessen (2004). "The protein-conducting channel SecYEG." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1694**(1-3): 81-95.
- Vieira, J. and J. Messing (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." Methods Enzymol. **153**: 3-11.
- Wagner, S., I. Sorg, M. Degiacomi, L. Journet, M. D. Peraro and G. R. Cornelis (2009). "The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the Yersinia injectisome." Mol. Microbiol. **71**(3): 692-701.
- Wagner, S., M. Stenta, L. C. Metzger, M. Dal Peraro and G. R. Cornelis (2010). "Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP)." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**(31): 13860-5.
- Weber, E., C. Berger, U. Bonas and R. Koebnik (2007). "Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure." Mol. Plant Microbe Interact. **20**(5): 559-567.
- Weber, E. and R. Koebnik (2005a). "Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." J. Bacteriol. **187**(17): 6175-6186.
- Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Hugué, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas and R. Koebnik (2005b). "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. and U. Bonas (1996a). "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**(12): 3462-3469.
- Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel and U. Bonas (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**(4): 1061-1069.
- Wengelnik, K., O. Rossier and U. Bonas (1999). "Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes." J. Bacteriol. **181**(21): 6828-6831.

- Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken and U. Bonas (1996c). "HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators." Mol. Plant-Microbe Interact. **9**: 704-712.
- Wiesand, U., I. Sorg, M. Amstutz, S. Wagner, J. van den Heuvel, T. Luhrs, G. R. Cornelis and D. W. Heinz (2009). "Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*." J. Mol. Biol. **385**(3): 854-66.
- Wilharm, G., S. Dittmann, A. Schmid and J. Heesemann (2007). "On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion." Int. J. Med. Microbiol. **297**(1): 27-36.
- Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. I. Aizawa, I. Kawagishi and R. M. Macnab (1996). "Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. **178**(10): 2960-2970.
- Wood, S. E., J. Jin and S. A. Lloyd (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**(12): 4252-4262.
- Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller and N. C. Strynadka (2005). "Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly." Nature **435**(7042): 702-707.
- Yip, C. K. and N. C. Strynadka (2006). "New structural insights into the bacterial type III secretion system." Trends Biochem. Sci. **31**(4): 223-230.
- Young, B. M. and G. M. Young (2002). "YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*." J. Bacteriol. **184**(5): 1324-34.
- Young, G. M., D. H. Schmiel and V. L. Miller (1999). "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(11): 6456-61.
- Zarivach, R., W. Deng, M. Vuckovic, H. B. Felise, H. V. Nguyen, S. I. Miller, B. B. Finlay and N. C. J. Strynadka (2008). "Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS." Nature **453**(7191): 124-127.

6. Anhang

6.1 Verwendete Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Expressionskonstrukte sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Modifikation
Oligonukleotide zur Generierung von HrpB2-Expressionskonstrukten		
HrpB2_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG ACG CTC ATT CCT CCT G	<i>Bsal</i>
HrpB2_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTG GTT CTT CAC CAG C	<i>Bsal</i>
HrpB2_stop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT CTT CAC	<i>Bsal</i>
HrpB2_6-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG CCT GTC CAA GCG ATT GC	<i>Bsal</i>
HrpB2_7-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG GTC CAA GCG ATT GCC G	<i>Bsal</i>
HrpB2_8-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG CAA GCG ATT GCC GGC	<i>Bsal</i>
HrpB2_9-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG GCG ATT GCC GGC ACC	<i>Bsal</i>
HrpB2_10-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG ATT GCC GGC ACC AGT GC	<i>Bsal</i>
HrpB2_11-130_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG GCC GGC ACC AGT GCT G	<i>Bsal</i>
HrpB2_12-13_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG GGC ACC AGT GCT GCC	<i>Bsal</i>
HrpB2_12-13_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG CTG TCC CCG GTG GC	<i>Bsal</i>
HrpB2_Flag_Bsal_rev	TTT <u>GGTCTC</u> T CTGGTTCTTCACCAG	<i>Bsal</i>
B2_Flag_for	CCAG GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG TAG	5'-P
B2_Flag_rev	CACC CTA CTT GTC ATC GTC ATC CTT GTA GTC	5'-P
HrpB2_1-90Stop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CAT TTC CTG CAG CC	<i>Bsal</i>
HrpB2_1-90_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CAT TTC CTG CAG CCC	<i>Bsal</i>
HrpB2_1-122Stop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA GGC GTT CTT TCC CG	<i>Bsal</i>
HrpB2_1-122_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC GGC GTT CTT TCC CG	<i>Bsal</i>
HrpB2Δ123_128Stop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT GGC GTT C	<i>Bsal</i>
HrpB2_K128AStop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT CGC CAC C	<i>Bsal</i>
HrpB2_L126AStop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT CTT CAC CGC CGTC	<i>Bsal</i>
HrpB2_T125AStop_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT CTT CAC CAG CGC CTGC	<i>Bsal</i>
HrpB2_V123AStop_Bsal_rev	AAA <u>GGTCTC</u> TCACC CTA CTG GTT CTT CAC CAG CGT CTG CGC GG	<i>Bsal</i>
HrpB2_BamHI_for	TTT <u>GGATCC</u> ATG ACG CTC ATT CCT C	<i>BamHI</i>
HrpB2_XhoI_rev	TTT <u>CTCGAG</u> CTA CTG GTT CTT CAC C	<i>XhoI</i>
HrpB2_1-122_XhoI_rev	TTT <u>CTCGAG</u> CTA GGC GTT CTT TCC CG	<i>XhoI</i>
HrpB2_1-90_BamHI_for	TTT <u>GGATCC</u> GAA ATG GCA GCG CAG	<i>BamHI</i>
HrpB2_1-90_XhoI_for	TTT <u>CTCGAG</u> CTA TTC CTG CAG CCC CAT G	<i>XhoI</i>
B2Δ13-22_for	CCG GTG GCA ACG CCC AAG CAA GCG	5'-P
B2Δ13-22_rev	GCC GGC AAT CGC TTG GAC AGG AGG	5'-P
B2Δ10-25_for	ACG CCC AAC CAA GCG CTG GTG	5'-P
B2Δ10-25_rev	CGC TTG GAC AGG AGG AAT GAG CGT	5'-P
B2Δ12-25_rev	GGC AAT CGC TTG GAC AGG AG	5'-P
B2Δ16-25_rev	AGC ACT GGT GCC GGC AAT CGC TTG	5'-P
Oligonukleotide zur Generierung von PrgJ/YscI-Expressionskonstrukten		
PrgJ_Bsal_for	ACT <u>GGTCTCTT</u> ATG TCGATTGCAACTATTGTC	
PrgJ_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTCTC</u> ACC TGAGCGTAATAGCGTTTC	
YscI_Bsal_for	ACT <u>GGTCTCTT</u> ATG CCGAACATAGAAATAGC	
YscI_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTCTC</u> ACC CCCCCCTTCGACAAGG	
Oligonukleotide zur Generierung von HpaC-Expressionskonstrukten		
HpaC_entry_for		-

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Modifikation
HpaC_entry_rev		-
HpaCΔ02-11for	CTG CCG GTC AGC GGC GCA CTG CAG	5'-P
HpaCΔ02-11revr	CAT GGT GAA GGG GGC GGC CGC GGAG	5'-P
HpaCΔ12-21for	GCG GCT CCA GCC ACG CCG GCC CGG	5'-P
HpaCΔ12-21revr	GAT GCG CAC ATG GCG GAG GGG CGG	5'-P
HpaCΔ22-31for	CTG CGC TCC AGC TTC CTG CAA CTG	5'-P
HpaCΔ22-31revr	CGG CCG CTG CAG TGC GCC GCT GAC	5'-P
HpaCΔ32-41for	CGC TTG CGC AGC GCA CAG CTC GCG	5'-P
HpaCΔ32-41revr	CGC CGA CCG GGC CGG CGT GGC TGG	5'-P
HpaCΔ42-51for	TGC ATG GTG TTG CCA CCG CAG TGC	5'-P
HpaCΔ42-51revr	CTG GCG CAG TTG CAG GAA GCT GG	5'-P
HpaCΔ52-61for	GAT CGG CCG GGG CCT GAT GCC GAG	5'-P
HpaCΔ52-61revr	CTC GTC GCA CTG CGG TGG CAA CAC	5'-P
HpaCΔ62-71for	TTC ACC GAG GCG CAT GAC AGC GTG	5'-P
HpaCΔ62-71revr	CTC GTC GCA CTG CGG TGG CAA CAC	5'-P
HpaCΔ72-81for	CAA ACC GAC CCA CCC TTA CGT ATC	5'-P
HpaCΔ72-81revr	GCC CTC CTC GGC ATC AGG CCC CGG	5'-P
HpaCΔ82-91revr	ACG AAA CAC CAA GAG CCG TCC	5'-P
HpaCΔ82-91revr	CAC GGG CAC GCT GTC ATG CGC C	5'-P
HpaCΔ92-101for	GAC GAT GGC GCA GTG GGG CGA CAG	5'-P
HpaCΔ92-101revr	CCC CTC GAT ACG TAA GGG TGG GTC	5'-P
HpaCΔ102-111for	ACC GAG TGG ATA CGC ACG CAA CGC	5'-P
HpaCΔ102-111revr	GTT GCC TTG GGA CGG CTC TTG GTG	5'-P
HpaCΔ112-121for	ATG GCG ATC GAC CAC ATC GCG CTG	5'-P
HpaCΔ112-121revr	CGC AAT CTG TCG CCC CAC TGC GCC	5'-P
HpaCΔ122-131for	GCC GAG TTC TGC AAT GCC CAA CCG	5'-P
HpaCΔ122-131revr	GTG GGC GCG TTG CGT GCG TAT CC	5'-P
HpaCΔ132-141for	AGC GCA GGG AGC TGG GAA GCG TGG	5'-P
HpaCΔ132-141revr	CAC CCG CAG CGC GAT GTG GTC G	5'-P
HpaCΔ142-151for	ATC GAC CAA GAG GTC GTC GCA CAG	5'-P
HpaCΔ142-151revr	GCG CAC CGG TTG GGC ATT GCA G	5'-P
HpaCΔ152-161for	TTG TTT TTG CGG CTT TCG CCG GAC	5'-P
HpaCΔ152-161revr	AGC CAG CCA CGC TTC CCA GCT CC	5'-P
HpaCΔ162-171for	TCG CTT CGC TTC AAT ACC AGT TCG	5'-P
HpaCΔ162-171revr	CGT CGT CTG TGC GAC GAC CTC TTG	5'-P
HpaCΔ172-181for	GCG CGC GAG GTA CTT TGG TGC GG	5'-P
HpaCΔ172-181revr	TAG CTG GTC CGG CGA AAG CCG C	5'-P
HpaCΔ182-191for	CGC CTG GAG GCT GCA CTG ACG TCC	5'-P
HpaCΔ182-191revr	ATC TGG CGA ACT GGT ATT GAA GCG	5'-P
HpaCΔ192-201for	AGT AGC ACG CTC CAG ATC AGC	5'-P
HpaCΔ192-201revr	CTG CTT TCC GCA CCA AAG TAC CTC G	5'-P
HpaCΔ202-212for	AAG GGT GGG CGC GCC GAC CCA GC	5'-P
HpaCΔ202-212revr	CAG CGT GGA CGT CAG TGC AGC C	5'-P
HpaC_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG CGC AAG CCG CC	Bsal
HpaC_Bsal_rev	ACT <u>GGTCTC</u> TCACC GAC AAC CTC GAT GCT G	Bsal
HpaC_1-122_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG GCG ATC GAC CAC ATC	Bsal
HpaC_1-112_Bsal_for	ACT <u>GGTCTC</u> TTATG ACC GAG TGG ATA CGC	Bsal
HpaC_L164A_for	ACG ACG TTG TTT GCG CGG CTT TCG CCG	5'-P
HpaC_L164A_rev	CTG TGC GAC GAC CTC TTG GTC GAT AGC	5'-P
HpaC_L171A_for	TCG CCG GAC CAG GCA TCG CTT CGC TTC	5'-P
HpaC_L171A_rev	AAG CCG CAA AAA CAA CGT CGT CTG TGC	5'-P
HpaC_L173A_for	GAC CAG CTA TCG GCT CGC TTC AAT ACC	5'-P
HpaC_L173A_rev	CGG CGA AAG CCG CAA AAA CAA CGT CG	5'-P
HpaC_F175A_for	TCG CTT CGC GCC AAT ACC AGT TCG CC	5'-P
HpaC_1-112_EcoRI_for	ACT <u>GAATTC</u> ATG ACC GAG TGG ATA CGC	EcoRI

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Modifikation
HpaCΔ171-175_for	AATACCAGTTCGCCAGATGCGCGC	5-´P
HpaCΔ171-175_rev	CTGGTCCGGCGAAAGCCGCAAAAAC	5-´P
HpaCΔ164-168_for	GACCAGCTATCGCTTCGCTTCAATACC	5-´P
HpaCΔ164-168_rev	AAACAACGTCGTCTGTGCGACGACC	5-´P
vektorspezifische Oligonukleotide		
pBRM_for	AGT TAG CTC ACT CAT TAG G	-
pBRM_rev	CAT CGC AGT CGG CCT ATT G	-
M13_for	GTAAAACGACGGCCAG	-
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	-
pGEX 5`for	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG	-
pGEX 3`rev	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	-

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Daniela Büttner für die Überlassung des spannenden Projektes und vor allem für die Möglichkeit in Ihrer Arbeitsgruppe meine wissenschaftliche Arbeit anfertigen zu können. Zudem möchte ich mich für Ihre tolle Unterstützung durch hilfreiche Anregungen bei allen theoretischen und praktischen Problemen, die ständige Diskussionsbereitschaft und Ihrer unsagbaren Geduld von ganzem Herzen bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas möchte ich mich für ihre tolle Unterstützung, ihr Interesse an meiner Arbeit und nicht zu Letzt für die Bereitstellung der Labore bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere dem erlesenen Kreis aus dem ehemals einzig klimatisierten Labor, welche meinen Alltag stets bereichert haben. Ein ganz besonderes Dankeschön soll an dieser Stelle an Robert Szczesny für die Beantwortung jeglicher Art von Fragen gehen. Auch Matthias Jordan sei für die technische Assistenz gedankt. Ein großer Dank richtet sich ebenso an Bianca Rosinsky für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie und allen meinen Freunden. Allen voran danke ich meinen Eltern Jenny und Enrico und meinem Schwesterherz Steffi, die mir immer alles ermöglicht haben und immer ganz nah an meiner Seite standen. Ebenso möchte ich mich bei Volki und Sebastian S. für die schöne gemeinsame Zeit vor, während und nach des gesamten Studiums bzw. der Promotion sowie den vielen schönen Erlebnisse bedanken und dass sie in den vielen Jahren immer ein offenes Ohr hatten und immer hinter mir standen.

Man(n) ist immer nur so stark, wie die Frau an seiner Seite. Danke meine Perle, denn ohne Deine Stärke, Dein grenzenloses Vertrauen in mich, Deine Geduld, Deiner Motivation und Deiner Wärme hätte ich nicht die geringste Chance gehabt, diese Zeilen zu verfassen oder diesen Teil der Arbeit tatsächlich zu beenden. Danke, dass Du immer an meiner Seite bist, um mit mir auch mal die unzähligen Sterne über der Burg zu zählen.

Lebenslauf

Name: Steve Schulz
Anschrift: Große Brunnenstraße 35 in 06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 30.11.1981
Geburtsort: Magdeburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

09/1988 – 08/1992 Grundschole Wanzleben
09/1992 – 08/2000 Börde-Gymnasium, Wanzleben;
Abschluss: Abitur
10/2000 – 08/2001 Zivildienst, DRK – Wanzleben
10/2001 – 03/2008 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Diplomarbeit am Institut für Genetik in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von Dr. Daniela Büttner,
Thema: Analysen von Typ II- und Typ III-Sekretionssystemen in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
Abschluss: Diplom-Biologe
04/2008 – 12/2011 Promotionsarbeit am Institut für Biologie, Bereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von Dr. Daniela Büttner,
Thema: Molekulare Charakterisierung der Typ III-sekretionsassoziierten Proteine HrpB2 und HpaC aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
seit 07/2012 - wissenschaftlicher Mitarbeiter, NOMAD Bioscience GmbH

Publikationen

- Lorenz, C., S. Schulz, T. Wolsch, O. Rossier, U. Bonas and D. Büttner (2008). "HpaC Controls Substrate Specificity of the *Xanthomonas* Type III Secretion System." PLoS Pathogen **4**(6): e1000094.
- Szczesny, R., M. Jordan, C. Schramm, S. Schulz, V. Coge, U. Bonas and D. Büttner (2010). "Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." New Phytologist **187**(4): 983-1002.
- Schulz, S. and D. Büttner (2011). "Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*." Infect. Immun.: IAI.00180-11.
- Hartmann, N., S. Schulz, C. Lorenz, S. Fraas, G. Hause and D. Büttner (2012). "Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation." Microbiology.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe sowie ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich den, im Literaturverzeichnis aufgeführten, Quellen und Hilfsmittel entnommenen Stellen sind in der Arbeit als Zitat kenntlich gemacht. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle/Saale, 05. November 2012

Steve Schulz