

**„Funktionsanalyse von Komponenten des Typ III-  
Sekretionssystems aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*“**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Jens Hausner

geb. am 11.11.1984 in Halle (Saale)

Gutachter/in

1. PD Dr. D. Büttner
2. Prof. Dr. R. B. Klösgen
3. Prof. Dr. M. Göttfert

Verteidigungsdatum : 01.12.2014

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

Lorenz, C., J. Hausner & D. Büttner, (2012) HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. *PloS one* **7**: e51063.

Hausner, J., N. Hartmann, C. Lorenz & D. Büttner, (2013) The Periplasmic HrpB1 Protein from *Xanthomonas* spp. Binds to Peptidoglycan and to Components of the Type III Secretion System. *Applied and environmental microbiology* **79**: 6312-6324.

Hausner, J. & D. Büttner, (2014) The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates. *Microbiology* **160**: 576-588.

## **Zusammenfassung**

Das Gram-negative pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate. Essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist das Typ III-Sekretionssystem (T3S-System), das durch das „hypersensitive response and pathogenicity“-Gencluster (*hrp*-Gencluster) kodiert wird und zur Übertragung von Effektorproteinen in das Zytoplasma der Wirtszelle dient. In dieser Arbeit wurden die T3S-Komponenten HrcQ, HrcU und HrpB1 funktional charakterisiert. Durch Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, dass HrcQ für die T3S essentiell ist. Die Assoziation von HrcQ mit bakteriellen Membranen sowie die Interaktion mit der T3S-assoziierten ATPase HrcN und ihrem putativen Regulator HrcL lässt vermuten, dass ein Komplex aus den zytoplasmatischen Proteinen HrcQ, HrcN und HrcL an das T3S-System bindet. Die Interaktion von HrcQ mit dem sekretierten putativen „inner rod“-Protein HrpB2 und dem Pilusprotein HrpE sowie mit Effektorproteinen deutet ferner darauf hin, dass HrcQ Bindestellen für T3S-Substrate besitzt. HrcQ interagiert ebenfalls mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne der Membrankomponente HrcU (HrcU<sub>C</sub>), welche am Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt ist und an einem konservierten Motiv gespalten wird. Die Analyse von HrcU-Derivaten, die eine Insertion, Deletion oder Substitution von Aminosäuren enthielten, führte zur Identifizierung von Aminosäuren in HrcU<sub>C</sub>, die einen Beitrag zur Sekretion und Translokation von HrpB2, dem Translokonprotein HrpF sowie dem Effektorprotein AvrBs3 leisten. Weil Mutationen in *hrcU* die Sekretion und Translokation von HrpB2 und Effektorproteinen unterschiedlich beeinflussen, reguliert HrcU die Sekretion von verschiedenen T3S-Substratklassen eventuell durch unabhängige Mechanismen. Obwohl die Spaltung von HrcU<sub>C</sub> für die Pathogenität von *Xcv* sowie für die T3S nicht essentiell ist, könnte die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung und/oder das T3S4-Protein HpaC die Translokation von HrpB2 supprimieren. Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrpB2 mit HrpB1 interagiert. HrpB1 bildet wahrscheinlich Proteinkomplexe aus und interagiert neben HrpB2 auch mit weiteren Komponenten des T3S-Systems. Subfraktionierungs- und Peptidoglykan-Interaktionsstudien zeigten weiterhin, dass HrpB1 in das bakterielle Periplasma lokalisiert und mit Peptidoglykan assoziiert. Die erhaltenen Daten lassen vermuten, dass das periplasmatische Peptidoglykan-bindende Protein HrpB1 Teil einer Struktur des T3S-Systems ist, welche das T3S-System im Periplasma verankert. Um die weitere Charakterisierung von T3S-Komponenten zu erleichtern, wurde ein modulares System entwickelt, welches es erlaubt das *hrp*-Gencluster aus den einzelnen *hrp*-Genen zu assemblieren. Durch dieses System können effizient und gleichzeitig multiple Mutationen in das *hrp*-Gencluster eingebracht werden.

## **Summary**

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of the bacterial spot disease of pepper and tomato. Essential for the pathogenicity is the type III secretion system (T3S system) which is encoded by the *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster and is used to deliver effector proteins into the host cell cytoplasm. In this study, the T3S components HrcQ, HrcU and HrpB1 were functionally characterized. Complementation studies showed that HrcQ is essential for T3S and associates with bacterial membranes. The association of HrcQ to bacterial membranes and the interaction with the T3S-associated ATPase HrcN and its predicted regulator HrcL, led to the assumption that a cytoplasmic complex consisting of HrcQ, HrcN and HrcL binds to the T3S system. Furthermore the interaction of HrcQ with the secreted putative inner rod protein HrpB2 and pilus protein HrpE as well as with effector proteins indicates that HrcQ acts as a substrate docking site for T3S substrates. In addition HrcQ also interacts with the C-terminal cytoplasmic domain of the inner membrane component HrcU (HrcU<sub>C</sub>) which is involved in the substrate specificity switch and is cleaved at a conserved motif. The analysis of HrcU insertion, deletion and point mutant derivatives led to the identification of amino acids residues in HrcU<sub>C</sub> that control T3S and translocation of HrpB2, the translocon protein HrpF and the effector protein AvrBs3. Given that mutations in *hrcU* differentially affected T3S and translocation of HrpB2 and effector proteins, HrcU probably controls the secretion of different T3S substrate classes by independent mechanisms. Although the HrcU cleavage is not crucial for pathogenicity and T3S, it is possible that the HrcU<sub>C</sub> cleavage and/or the T3S4-Protein HpaC suppress the translocation of HrpB2. Protein-protein interactions assays showed that HrpB2 interacts with HrpB1. HrpB1 probably forms protein complexes and interacts besides HrpB2 with other T3S components. Furthermore subfractionation and peptidoglycan studies provided experimental evidence that HrpB1 localizes to the bacterial periplasm and binds to peptidoglycan. These findings suggest that the periplasmic peptidoglycan-binding protein HrpB1 is part of a structure of the T3S system which presumably anchors the T3S system in the periplasm. To facilitate the characterization of T3S components, a modular system was developed to assemble the whole *hrp* gene cluster from the single *hrp* genes. Such a system allows the efficient and simultaneous introduction of mutations into the *hrp* gene cluster.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	II
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	III
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	VIII
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Typ III-Sekretionssysteme sind oft essentielle Pathogenitätsfaktoren .....	1
1.2 Translokations-assoziierte und Flagellum-assoziierte T3S-Systeme besitzen einen strukturell ähnlichen Gesamtaufbau .....	2
1.3 Der Basalapparat von Translokations-assoziierten T3S-Systemen .....	4
1.4 Extrazelluläre Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems .....	5
1.5 Der „inner rod“ bildet eine Struktur innerhalb des Basalapparates .....	6
1.6 Der Exportapparat ist ein Proteinkomplex mit verschiedenen Funktionen .....	6
1.7 Der Substratspezifitätswechsel: Ein Zusammenspiel zwischen Partnern.....	7
1.7.1 T3S-Substratspezifitätswechsellproteine.....	7
1.7.2 Vertreter der YscU-Proteinfamilie .....	8
1.7.3 Die derzeitigen Theorien des Substratspezifitätswechsels .....	12
1.8 Die Erkennung von T3S-Substraten - T3S-Signale und T3S-Chaperone .....	14
1.9 Der vorhergesagte C-Ring ist eine Sortierungsplattform für T3S-Substrate.....	15
1.10 T3S im pflanzenpathogenen Bakterium <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	16
1.10.1 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit .....	16
1.10.2 Das T3S-System wird durch ein Gencluster kodiert.....	17
1.10.3 Die Regulation der <i>hrp</i> -Gene.....	19
1.10.4 Die vorhergesagte Architektur des T3S-Systems aus <i>Xcv</i> .....	20
1.10.5 Der Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems in <i>Xcv</i> .....	21
1.10.5.1 Das zytoplasmatische T3S-Kontrollprotein HpaC .....	21
1.10.5.2 Die IM-Komponente HrcU ist am Substratspezifitätswechsel beteiligt.....	22
1.10.6 Kontrolle der T3S von Translokation- und Effektorproteinen.....	24
1.11 Zielstellung dieser Arbeit .....	27

<b>2. Ergebnisse</b> .....	28
2.1 HrcQ ist eine Substratbindestelle für T3S-Substrate .....	28
2.1.1 Publikation I: „HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from <i>Xanthomonas</i> “ .....	28
2.1.2 Anhang der Publikation I .....	42
2.1.3 Zusammenfassung der Publikation I .....	45
2.2 Das periplasmatische Protein HrpB1 von <i>Xcv</i> .....	46
2.2.1 Publikation II: „The periplasmic HrpB1 protein from <i>Xanthomonas</i> spp. binds to petidoglycan and to components of the type III secretion system“ .....	46
2.2.2 Anhang der Publikation II .....	59
2.2.3 Zusammenfassung der Publikation II .....	67
2.2.4 Ergänzende Ergebnisse .....	68
2.2.4.1 <i>In cis</i> -Expression von <i>hrpB1</i> <sub>C96A</sub> , <i>hrpB1</i> <sub>L97A</sub> oder <i>hrpB1</i> <sub>L128A</sub> in einer <i>hrpB1</i> -Mutante .....	68
2.2.4.2 HrpB1 interagiert mit zytoplasmatischen und IM-Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems .....	69
2.3 HrcU kontrolliert die T3S und Translokation von „frühen“ und „späten“ Substraten ....	70
2.3.1 Publikation III: „The YscU/FlhB homologue HrcU from <i>Xanthomonas</i> controls type III secretion and translocation of early and late substrates“ .....	70
2.3.2 Anhang der Publikation III .....	83
2.3.3 Zusammenfassung der Publikation III .....	88
2.4 Die Erstellung eines modularen <i>hrp</i> -Genclusters .....	89
2.4.1 „proof of concept“ - Die Komplementation einer <i>hrp</i> -Gencluster-Mutante .....	89
2.4.2 Die Assemblierung des <i>hrp</i> -Genclusters aus Modulen .....	91
2.4.3 Experimentelle Vorgehensweise für die Klonierung der Module.....	92
2.4.4 Die Komplementation einzelner <i>hrp</i> -Operonmutanten .....	98
<b>3. Diskussion</b> .....	100
3.1 Die putative C-Ringkomponente HrcQ ist eine Substratbindestelle für T3S-abhängig sekretierte Proteine.....	100
3.1.1 Unter Sekretionsbedingungen assoziiert HrcQ mit bakteriellen Membranen.....	100
3.1.2 Die C-Ringkomponente HrcQ ist eine mögliche Substratbindestelle für T3S-System-abhängig sekretierte Proteine .....	101
3.2 HrcU und der Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems .....	103
3.2.1 Die Spaltung von HrcU ist nicht essentiell für die Proteinfunktion.....	103

3.2.2 Die „linker“-Region und das LARxLY-Motiv könnten für die Rekrutierung von T3S-Komponenten erforderlich sein .....	105
3.2.3 HrcU kontrolliert die Sekretion von „frühen“ und „späten“ Substraten durch unabhängige Mechanismen .....	106
3.2.4 Die HrcU <sub>C</sub> -Spaltung und/oder HpaC supprimieren die Translokation von HrpB2 ...	107
3.3 HrpB1 ist eine putative „inner rod“-Komponente des T3S-Systems .....	108
3.3.1 HrpB1 ist ein periplasmatisches Protein .....	108
3.3.2 Der „inner rod“ des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus <i>Xcv</i> könnte aus HrpB2 und HrpB1 aufgebaut werden .....	109
3.3.3 Das Translokations-assoziierte T3S-System könnte durch HrpB1 im Periplasma verankert werden .....	111
3.3.4 HrpB1 könnte T3S-abhängig in das bakterielle Periplasma transportiert werden .....	111
3.3.5 Die HrpB1/HrcD-Interaktion sowie die HrpB1-Komplexbildung ist möglicherweise für die HrpB1-Proteinfunktion von Bedeutung .....	112
3.4 Modell des Substratspezifitätswechsels in <i>Xcv</i> .....	113
3.5 Die Klonierung des <i>hrp</i> -Genclusters als modulares System .....	115
3.5.1 Die einzelnen <i>hrp</i> -Operons können als funktionelle Einheit agieren.....	115
3.5.2 Die Verwendung von T3S-Systemen als Transportsystem für rekombinante Proteine.....	117
3.5.3 Mögliche Anpassungen des modularen T3S-Systems - die Verwendung des T3S-Systems als Transportsystem für rekombinante Proteine .....	118
<b>4. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>5. Anhang .....</b>	<b>140</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>142</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>143</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>144</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>145</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

3x c-Myc	dreifache Wiederholung der c-Myc-Aminosäuresequenz
ÄM	äußere Membran
Avr	Avirulenz
Bp	Basenpaar(e)
CPPs	„cell-penetrating peptides“
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
ECW	„Early Californian Wonder“
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>hpa</i>	<i>hrp</i> -„associated“, <i>hrp</i> -assoziiert
GE	Gesamtzellextrakt
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HR	„hypersensitive response“
<i>hrc</i>	<i>hrp</i> -„conserved“, <i>hrp</i> -konserviert
<i>hrp</i>	„hypersensitive response and pathogenicity“
IM	innere Membran
KBE	koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PhoA	alkalische Phosphatase
PIP	„plant-inducible promoter“
PM	Plasmamembran
PP	Periplasma
pv.	Pathovar, Pathogen-Varietät
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
SDS	„Sodiumdodecylsulfat“, Natriumdodezylsulfat
SPI-1	<i>Salmonella</i> spp. „pathogenicity island“ 1
SPI-2	<i>Salmonella</i> spp. „pathogenicity island“ 2
spp.	„species“, Arten
T3S	Typ III-Sekretion
T3S4	„T3S substrate specificity switch“
TALEN	„Transcription Activator-Like Effector Nucleases“
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
X-Phos	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Xop	<i>Xanthomonas</i> „outer protein“
Yop	<i>Yersinia</i> „outer protein“
Ysc	„Yop secretion“

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1: Überblick über den Aufbau des Translokations-assozierten und Flagellum-assozierten T3S-Systems ..... 3

Abbildung 1.2: *Xcv* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Tomaten- und Paprikapflanzen ..... 17

Abbildung 1.3: Das *hrp*-Gencluster kodiert für die essentiellen Komponenten des T3S-Systems ... 18

Abbildung 1.4: Modell des Substratspezifitätswechsels in *Xcv*..... 24

Abbildung 1.5: Modell zur Kontrolle der T3S von Translokation- und Effektorproteinen..... 25

Abbildung 2.1: Partielle Komplementation des Phänotyps eines 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes durch die *in cis*-Expression von *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub>..... 68

Abbildung 2.2: Interaktionsstudien von ausgewählten T3S-Komponenten mit HrpB1-c-Myc..... 69

Abbildung 2.3: Infektionsstudien mit *Xcv* auf Paprika- und Tomatenpflanzen sowie auf verschiedenen Nicht-Wirtspflanzen..... 90

Abbildung 2.4: Prinzip der „Golden Gate“-Klonierungsmethode ..... 92

Abbildung 2.5: Vorgehensweise für die Assemblierung des *hrp*-Genclusters aus den einzelnen *hrp*-Genen..... 93

Abbildung 2.6: Methodik für die Generierung der Module und die Assemblierung der einzelnen *hrp*-Operons am Beispiel des *hrpC*-Operons ..... 96

Abbildung 2.7: Die Vektoren der pBRM-O-Serie bestimmen die Position des Operons im Zielvektor ..... 97

Abbildung 2.8: Komplementationsstudien mit verschiedenen *hrp*-Operonmutanten..... 99

Abbildung 3.1: Die „linker“-Region in HrcU könnte eine Positionsveränderung von HrcU<sub>C</sub> ermöglichen..... 104

Abbildung 3.2: HrpB1 ist möglicherweise ein Teil des „inner rod“ des Translokations-assozierten T3S-Systems ..... 110

Abbildung 3.3: Modell des Substratspezifitätswechsels in *Xcv*..... 114

Abbildung 3.4: Die Expression eines Operons könnte von verschiedenen Promotoren abhängig sein ..... 116

Abbildung 3.5: Die Operons sollten einen Transkriptionsterminator enthalten ..... 119

Abbildung 3.6: Mögliche Anpassungen des „modularen“ T3S-Systems ..... 120

Abbildung 5: HrpB1 interagiert mit verschiedenen Komponenten des Translokations-assozierten T3S-Systems aus *Xcv* ..... 141

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1: Ausgewählte pathogene Gram-negative Bakterien mit einem T3S-System ..... 1

Tabelle 1.2: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in YscU-homologen Proteinen auf die T3S .. 10

Tabelle 1.3: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im NPTH-Motiv auf die  
HrcU-Proteinfunktion ..... 23

Tabelle 2: Promotorlänge und Position der PIP-Boxen der einzelnen *hrp*-Operons ..... 94

Tabelle 5: Ausgewählte Komponenten von Translokations-assoziierten und  
Flagellum-assoziierten T3S-Systemen..... 140

## 1. Einleitung

### 1.1 Typ III-Sekretionssysteme sind oft essentielle Pathogenitätsfaktoren

Pathogene Gram-negative Bakterien rufen die verschiedensten Krankheiten in Pflanzen, Tieren und Menschen hervor (siehe Tabelle 1.1). Unterschiedliche pathogene Bakterien besitzen daher vermutlich individuelle Mechanismen, um sich auf dem Wirt zu etablieren. Die Analyse der molekularen Basis der Pathogenitätsmechanismen von tier- und pflanzenpathogenen Bakterien zeigte jedoch, dass einige Infektionsstrategien über Gram-negative pathogene Bakterien weitverbreitet sind. So ist die Pathogenität von vielen Gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien wie *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas syringae* von einem heterooligomeren Proteinkomplex abhängig, der als Translokations-assoziiertes Typ III-Sekretionssystem (T3S-System) bezeichnet wird (Hueck, 1998). Über das Translokations-assoziierte T3S-System werden sogenannte Effektorproteine aus dem bakteriellen Zytoplasma in das Zytoplasma der Wirtszelle übertragen, d. h. transloziert (Cornelis, 2006). In der Wirtszelle interferieren die translozierten Effektorproteine mit Wirtszellprozessen zum Vorteil des Bakteriums (Tosi *et al.*, 2013). Translokations-assoziierte T3S-Systeme sind aber nicht nur essentiell für die Pathogenität, sondern können auch zu Symbiosen beitragen (siehe Tabelle 1.1) (Okazaki *et al.*, 2009, Cusano *et al.*, 2011, Okazaki *et al.*, 2013).

**Tabelle 1.1: Ausgewählte pathogene Gram-negative Bakterien mit einem T3S-System.**

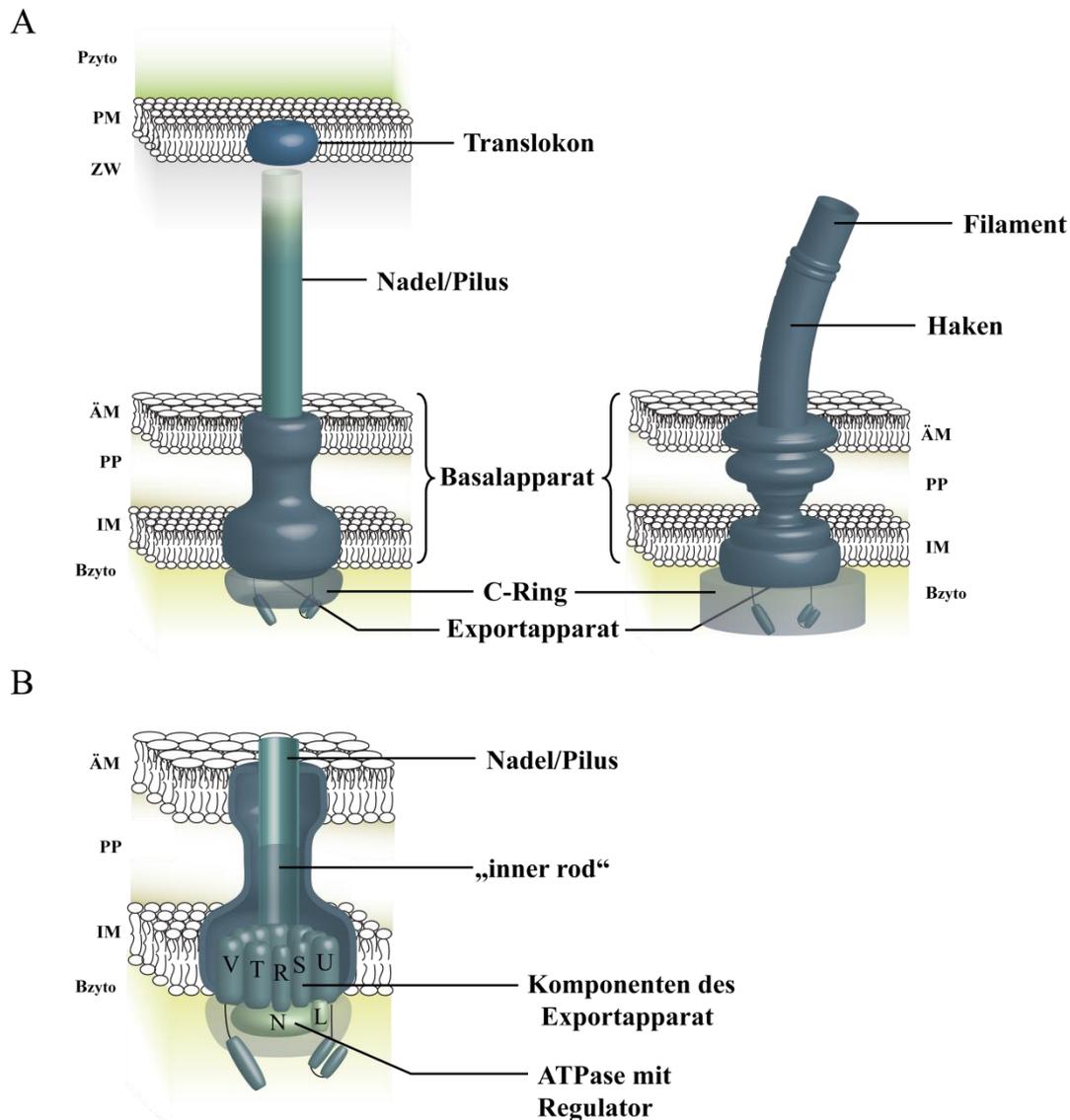
Organismus	Krankheit <sup>1</sup>	Wirt	Referenz
<u>Pathogene Bakterien</u>			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis	Tiere, Menschen	(Cover & Aber, 1989)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis, Sepsis	Tiere, Menschen	(Chen <i>et al.</i> , 2013)
<i>Shigella flexneri</i>	Bakterienruhr	Primaten, Menschen	(Salgado-Pabon <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Bakterielle Fleckenkrankheit	Tomaten	(Buell <i>et al.</i> , 2003)
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Weißblättrigkeit	Reis	(Mew <i>et al.</i> , 1993)
<u>Symbiotische Bakterien</u>			
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	-	Sojabohne, Erdnuss	(Okazaki <i>et al.</i> , 2009, Okazaki <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	Zweifarbiger Lacktrichterling	(Cusano <i>et al.</i> , 2011)
<i>Sodalis glossinidius</i>	-	Tsetsefliege	(Dale & Maudlin, 1999, Dale <i>et al.</i> , 2001)

---

<sup>1</sup> Nach einer Infektion mit dem spezifischen Pathogen auftretende Krankheit.

## **1.2 Translokations-assoziierte und Flagellum-assoziierte T3S-Systeme besitzen einen strukturell ähnlichen Gesamtaufbau**

Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass mindestens neun der circa 20 Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems über pflanzen- und tierpathogene Bakterien eine hohe Aminosäureidentität aufweisen (Diepold & Wagner, 2014). Vermutlich stellen diese Komponenten die Kernkomponenten des T3S-Systems dar. Acht Komponenten der Translokations-assoziierten T3S-Systeme weisen ebenfalls eine hohe Aminosäureidentität mit Komponenten des Flagellums auf, welches der Fortbewegung dient (Abrusci *et al.*, 2014, Diepold & Wagner, 2014). Dies führte zur Annahme, dass Translokations-assoziierte T3S-Systeme und das Flagellum, welches auch als Flagellum-assoziiertes T3S-System bezeichnet wird, einen ähnlichen Gesamtaufbau besitzen könnten (Van Gijsegem *et al.*, 1995). Bestätigt wurde diese Annahme durch kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von Flagellum-assoziierten und Translokations-assoziierten T3S-Systemen (Kubori *et al.*, 1998, Thomas *et al.*, 2006, Schraidt & Marlovits, 2011), die zeigten, dass beide T3S-Systeme aus einem Basalapparat bestehen, der sowohl die innere (IM) als auch die äußere bakterielle Membran (ÄM) durchspannt (siehe Abbildung 1.1). Der Basalapparat ist mit einem zytoplasmatischen Ring („cytoplasmic ring“, C-Ring), einer zytoplasmatischen T3S-assoziierten ATPase sowie mit einem Exportapparat verbunden, der in der IM wahrscheinlich einen Exportkanal ausbildet (Diepold & Wagner, 2014). Obwohl Flagellum-assoziierte und Translokations-assoziierte T3S-Systeme einen ähnlichen Gesamtaufbau besitzen, unterscheiden sie sich in ihren extrazellulären Anhängen. Der Basalapparat Flagellum-assoziiierter T3S-Systeme ist über einen extrazellulären Haken mit dem flagellaren Filament verbunden (siehe Abbildung 1.1). Zum Aufbau des Flagellums werden die Haken- und Filamentproteine über das Flagellum-assoziierte T3S-System sekretiert (Minamino *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Flagellum-assoziierten T3S-Systemen ist der Basalapparat von Translokations-assoziierten T3S-Systemen mit einer extrazellulären Nadel (in Tierpathogenen) bzw. Pilus (in Pflanzenpathogenen) assoziiert, die als Transportkanal für extrazelluläre T3S-Komponenten und Effektorproteine dienen (Ghosh, 2004, He *et al.*, 2004). Für die Translokation von Effektorproteinen in eukaryotische Zellen ist jedoch oft ein Translokon notwendig, welches wahrscheinlich in die Plasmamembran der Wirtszelle inseriert und den Transport von Effektorproteinen über diese Membran vermittelt (siehe Abbildung 1.1) (Mueller *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.1: Überblick über den Aufbau des Translokations-assoziierten und Flagellum-assoziierten T3S-Systems.** **A)** Flagellum-assoziierte und Translokations-assoziierte T3S-Systeme weisen einen ähnlichen Gesamtaufbau des Basalapparates auf, unterscheiden sich jedoch in ihren extrazellulären Anhängen. Das Flagellum-assoziierte T3S-System ist mit einem Haken und flagellarem Filament verbunden, während das Translokations-assoziierte T3S-System von tierpathogenen Bakterien mit einer extrazellulären Nadel und das Translokations-assoziierte T3S-System von pflanzenpathogenen mit einem Pilus verbunden ist. Der Basalapparat durchspannt die IM und ÄM und ist mit einem Exportapparat sowie mit einem vorhergesagten zytoplasmatischen Ring („cytoplasmic“, C-Ring) verbunden. Für die Translokation von Effektoren in die Wirtszelle benötigen Translokations-assoziierte T3S-Systeme ein Translokon, welches vermutlich in die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle inseriert. **B)** Elektronenmikroskopische Studien von isolierten T3S-Apparaten weisen darauf hin, dass im Inneren des Basalapparates eine Struktur vorhanden ist, die als „inner rod“ bezeichnet wird (Marlovits *et al.*, 2004, Marlovits *et al.*, 2006). Der Exportapparat besteht aus mindestens fünf Komponenten (V, T, R, S, U), welche sich in der Anzahl der Aminosäuren, der transmembranen Helices und der zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Komponenten des Exportapparates sind u. a. an der Erkennung von T3S-Substraten sowie an dem Wechsel der Substratspezifität beteiligt. Neben dem C-Ring ist der Basalapparat auf der bakteriellen zytoplasmatischen Seite mit einer ATPase (N) und ihrem putativen Regulator (L) assoziiert. Die Buchstaben V, T, R, S, U, N, L stehen für die konservierten Proteine der jeweiligen Ysc-homologen Proteinfamilien. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PP, Periplasma; PM, Plasmamembran der Wirtszelle; ZW, Zellwand; Bzyto, bakterielles Zytoplasma; Pzyto, pflanzliches Zytoplasma.

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

Der Basalapparat durchspannt beide bakterielle Membranen und besteht aus einem ÄM-Ring und IM-Ring. Der IM-Ring wird in Translokations-assoziierten T3S-Systemen vermutlich aus Mitgliedern der YscJ- und YscD-Proteinfamilien ausgebildet (siehe Anhang, Tabelle 5) (Kubori *et al.*, 1998, Kimbrough & Miller, 2000, Kubori *et al.*, 2000, Blocker *et al.*, 2001, Marlovits *et al.*, 2004, Schraidt *et al.*, 2010). Durch die Analyse von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von IM-Ringen konnte für *Salmonella typhimurium* gezeigt werden, dass der IM-Ring durch zwei konzentrische Ringe aufgebaut wird, wobei der schmalere innere Ring aus 24 Monomeren PrgK (YscJ-homolog) und der äußere IM-Ring aus 24 Monomeren PrgH (YscD-homolog) besteht (Schraidt *et al.*, 2010). Die 24-fache Symmetrie des IM-Rings aus *S. typhimurium* wird sowohl durch die Analyse von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von isolierten Translokations-assoziierten T3S-Systemen aus *S. flexneri* als auch durch die Analyse von Kristallstrukturen des YscJ-homologen Proteins EscJ aus enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und des YscD-homologen Proteins MxiG aus *S. flexneri* unterstützt (Yip *et al.*, 2005, Andre *et al.*, 2007, Sani *et al.*, 2007, McDowell *et al.*, 2011). Für den schmaleren IM-Ring von *S. flexneri* wird alternativ auch eine 12-fache bzw. 15-fache Symmetrie angenommen (Sani *et al.*, 2007, Hodgkinson *et al.*, 2009). Der ÄM-Ring wird durch Proteine der Sekretin-Familie aufgebaut, welche vermutlich in die ÄM integrieren und einen oligomeren Komplex aus 12 bis 14 Monomeren ausbilden (Koster *et al.*, 1997, Crago & Koronakis, 1998, Ogino *et al.*, 2006, Hodgkinson *et al.*, 2009, Schraidt *et al.*, 2010, Korotkov *et al.*, 2011). Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Translokations-assoziierten Basalapparaten weisen jedoch darauf hin, dass der ÄM-Ring in *S. typhimurium* aus 15 Monomeren InvG besteht (Schraidt & Marlovits, 2011). Die effiziente Oligomerisierung der Sekretine und die Assoziation der Sekretine mit der ÄM ist von kleinen Lipoproteinen abhängig, den Pilotinen (Crago & Koronakis, 1998, Daeffer & Russel, 1998, Schuch & Maurelli, 2001, Burghout *et al.*, 2004). Vertreter der Sekretin-Familie interagieren vermutlich über ihre N-terminale Region mit IM-Komponenten des T3S-Systems (Hodgkinson *et al.*, 2009, Schraidt *et al.*, 2010). Für die Sekretine InvG aus *S. typhimurium*, MxiD aus *Shigella flexneri* und EscC aus EPEC konnte bereits gezeigt werden, dass die Sekretine mit dem YscD-homologen Protein des jeweiligen T3S-Systems interagieren (Schuch & Maurelli, 2001, Ogino *et al.*, 2006, Schraidt *et al.*, 2010). Weitere Protein-Protein-Interaktionsstudien weisen darauf hin, dass die ÄM-Ringkomponente EscC und die IM-Ringkomponente EscD aus EPEC mit dem Nadelprotein EscF interagieren (Ogino *et al.*, 2006) und lassen vermuten, dass Komponenten des Basalapparates mit der extrazellulären Nadel des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus EPEC verbunden sind.

#### 1.4 Extrazelluläre Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems

Die Nadel Translokations-assoziiierter T3S-Systeme wird wahrscheinlich aus mehreren Kopien eines Proteins aufgebaut und weist abhängig von dem jeweiligen Bakterium eine Länge zwischen 40-80 nm auf (Kubori *et al.*, 1998, Tamano *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002, Journet *et al.*, 2003). Eine Ausnahme sind EPEC-Stämme, welche durch das Filamentprotein EspA die Nadel bis auf 600 nm verlängern können (Daniell *et al.*, 2001, Sekiya *et al.*, 2001). Der Aufbau der Nadel erfolgt wahrscheinlich durch die Polymerisierung von Nadeluntereinheiten an der Nadelspitze in einer helikalen Anordnung (Cordes *et al.*, 2003, Poyraz *et al.*, 2010). Das Nadelprotein MxiH aus *S. flexneri* polymerisiert dabei wahrscheinlich mit 5,6 Untereinheiten je Windung, während die Nadel aus *S. typhimurium* 6,3 Untereinheiten PrgI je Windung enthält (Cordes *et al.*, 2003, Galkin *et al.*, 2010). Die Ausbildung eines „tip“-Komplexes an der Nadelspitze verhindert vermutlich die Polymerisierung weiterer Nadeluntereinheiten (Poyraz *et al.*, 2010) und ist an der effizienten Ausbildung des Translokons beteiligt (De Geyter *et al.*, 2000, Goure *et al.*, 2004, Picking *et al.*, 2005, Faudry *et al.*, 2006, Broz *et al.*, 2007). Ein „tip“-Komplex ist jedoch nicht in allen Translokations-assoziierten T3S-Systemen zu finden. So weisen Translokations-assoziierte T3S-Systeme aus EPEC vermutlich keinen „tip“-Komplex auf, können die Nadel aber durch das Filamentprotein EspA direkt mit dem Translokon verbinden (Daniell *et al.*, 2001, Sekiya *et al.*, 2001). Das Translokon bildet wahrscheinlich in der Wirtszellplasmamembran eine Pore und besteht gewöhnlich aus zwei hydrophoben Proteinen, die einen heterooligomeren Proteinkomplex ausbilden (Blocker *et al.*, 2008, Diepold & Wagner, 2014). Im Gegensatz zur Nadel, konnte für den Pilus von pflanzenpathogenen Translokations-assoziierten T3S-Systemen noch kein „tip“-Komplex nachgewiesen werden. Über den exakten Aufbau des Pilus ist bisher nicht viel bekannt. Studien mit pflanzenpathogenen Translokations-assoziierten T3S-Systemen weisen jedoch daraufhin, dass der Pilus aus einer Hauptkomponente aufgebaut wird und eine Länge von bis zu 2 µm aufweisen kann, um vermutlich die pflanzliche Zellwand zu überbrücken (Roine *et al.*, 1997, Van Gijsegem *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001, Hu *et al.*, 2001, Jin & He, 2001, Weber *et al.*, 2005). Translokonproteine pflanzenpathogener Translokations-assoziiierter T3S-Systeme sind im Vergleich zu Translokonproteinen aus Tierpathogenen nicht gut untersucht. Unter anderem konnten putative Translokonproteine in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *R. solanacearum*, *P. syringae*, *Rhizobium* spp.-Stamm NGR234 identifiziert werden (Rossier *et al.*, 2000, Marie *et al.*, 2003, Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005, Meyer *et al.*, 2006). Für einige Pflanzenpathogene wie *Erwinia* spp. und *Pseudomonas syringae* konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch sogenannte „harpin“-Proteine in der Translokation von Effektorproteinen involviert sein können (Kvitko *et al.*, 2007, Bocsanczy *et al.*, 2008).

### **1.5 Der „inner rod“ bildet eine Struktur innerhalb des Basalapparates**

Die stabile Verankerung der Nadel bzw. des Pilus mit dem Basalapparat ist wahrscheinlich von einer Struktur abhängig, die als „inner rod“ (innerer Stab) bezeichnet wird und vermutlich einen Kanal im Inneren des Basalapparates ausbildet (siehe Abbildung 1.1, B) (Büttner, 2012). Bisher konnte jedoch nur für *Y. pestis* eine direkte Interaktion zwischen dem Nadelprotein YscF und dem „inner rod“-Protein YscI gezeigt werden (Yang *et al.*, 2013a). Im Periplasma wird der „inner rod“ von Translokations-assoziierten T3S-Systemen wahrscheinlich durch eine sockelähnliche Struktur mit den IM-Ringen des Basalapparates verbunden (Marlovits *et al.*, 2004, Marlovits, 2006 #3398).

Während der „inner rod“ des Flagellum-assoziierten T3S-Systems von *S. typhimurium* aus den Komponenten FlgB, FlgC, FlgF und FlgG besteht, welche einen proximalen und einen distalen „rod“ aufbauen (Homma *et al.*, 1990), wird der „inner rod“ in Translokations-assoziierten T3S-Systemen vermutlich aus mehreren Kopien einer einzelnen Komponente aufgebaut. Elektronenmikroskopische Studien von isolierten T3S-Apparaten weisen darauf hin, dass der „inner rod“ des Translokations-assoziierten T3S-Systems von *S. typhimurium* aus PrgJ aufgebaut wird (Marlovits *et al.*, 2004, Marlovits *et al.*, 2006). Obwohl „inner rod“-Proteine untereinander eine geringe Aminosäureidentität besitzen, konnte durch einen Aminosäuresequenzvergleich von bekannten bzw. vorhergesagten „inner rod“-Proteinen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien ein konserviertes Motiv, das VxTLxK-Motiv, im C-terminalen Bereich der „inner rod“-Proteine identifiziert werden (Hartmann *et al.*, 2012). Welche Bedeutung dieses Motiv für die Funktion von „inner rod“-Proteinen hat ist jedoch noch nicht geklärt. Für PrgJ und andere „inner rod“-Proteine konnte eine Sekretion in das extrazelluläre Milieu nachgewiesen werden (Rossier *et al.*, 2000, Magdalena *et al.*, 2002, Wood *et al.*, 2008, Sal-Man *et al.*, 2012, Lefebre & Galan, 2014), welche vermutlich für die Ausbildung eines funktionalen T3S-Systems von Bedeutung ist. Die Sekretion von „inner rod“-Proteinen ist dabei von Komponenten des Exportapparates abhängig, wie für YscI aus *Y. pseudotuberculosis* gezeigt werden konnte (Wood *et al.*, 2008).

### **1.6 Der Exportapparat ist ein Proteinkomplex mit verschiedenen Funktionen**

Der Exportapparat ist ein heterooligomerer Proteinkomplex, welcher vermutlich einen Kanal in der IM bildet und aus mindestens fünf integralen Membranproteinen der YscR-, YscS-, YscT-, YscU- und YscV-Familien aufgebaut wird (siehe Abbildung 1.1, B) (Diepold & Wagner, 2014). Für *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass SpaP (YscR-homolog), SpaQ (YscS-homolog) oder SpaR (YscT-homolog) für die Rekrutierung von InvA (YscV-homolog) und für die effiziente Assemblierung des Basalapparates notwendig sind (Wagner

*et al.*, 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das Translokations-assoziierte T3S-System aus *Y. enterocolitica* ermittelt werden, welche darauf hinweisen, dass YscR, YscS und YscT als Ausgangspunkt für die Assemblierung des Basalapparates dienen und für die Oligomerisierung von YscV erforderlich sind (Diepold *et al.*, 2011). Eine Oligomerisierung wurde auch für die YscV-homologen Proteine FlhA aus *E. coli* und MxiA aus *S. flexneri* berichtet (Li & Sourjik, 2011, Abrusci *et al.*, 2013) und ist vermutlich für die Ausbildung einer zytoplasmatischen Exportringpore unterhalb des Exportkanals essentiell (Abrusci *et al.*, 2013). Die Exportringpore wird dabei durch die C-terminale zytoplasmatische Domäne von YscV-homologen Proteinen gebildet, die nicht nur mit Komponenten des T3S-Systems, sondern auch mit T3S-Substraten interagiert und somit vermutlich eine Substratbindestelle des T3S-Systems darstellt (Minamino & MacNab, 2000b, Zhu *et al.*, 2002, McMurry *et al.*, 2004, Bange *et al.*, 2010, Stone *et al.*, 2010, Minamino *et al.*, 2011, Minamino *et al.*, 2012, Abrusci *et al.*, 2013). Neben YscV-homologen Proteinen besitzen auch YscU-homologe Proteine eine C-terminale zytoplasmatische Domäne, welche vermutlich an dem Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt ist. Die YscU-Proteinfamilie wird in einem der folgenden Kapitel näher besprochen.

## **1.7 Der Substratspezifitätswechsel: Ein Zusammenspiel zwischen Partnern**

Die effiziente Translokation von Effektorproteinen durch Translokations-assoziierte T3S-Systeme in die Wirtszelle, erfordert wahrscheinlich eine Mindestlänge der Nadel damit bakterielle Oberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharide oder Adhesine überbrückt werden können (Mota *et al.*, 2005, West *et al.*, 2005, Hölzer *et al.*, 2009). Die Sekretion von Nadelproteinen und Proteinen, die für die feste Verankerung der Nadel mit dem Basalapparat verantwortlich sind, wie z. B. „inner rod“-Proteine, sollte somit vor der Sekretion bzw. Translokation von Translokon- und Effektorproteinen erfolgen. Der Sekretionswechsel von „inner rod“-Proteinen und Nadelproteinen, welche als frühe Substrate benannt werden, zu späten Substraten, wie Translokon- und Effektorproteinen, wird als Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems bezeichnet.

### **1.7.1 T3S-Substratspezifitätswechsellproteine**

Der Substratspezifitätswechsel wird vermutlich u. a. durch T3S-Substratspezifitätswechsellproteine („T3S substrate specificity switch protein“, T3S4-Protein) vermittelt (Lohou *et al.*, 2013). In Abwesenheit des T3S4-Proteins InvJ aus *S. typhimurium* war jedoch nicht nur die Sekretion von Translokonproteinen inhibiert, sondern auch die Nadel verlängert (Collazo & Galan, 1996, Kubori *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für *S. flexneri* und

*Yersinia* spp. ermittelt werden, die zeigen, dass in Abwesenheit des T3S4-Wildtypproteins bis zu 10-fach verlängerte Nadeln und eine reduzierte Sekretion von Effektorproteinen auftraten (Magdalena *et al.*, 2002, Edqvist *et al.*, 2003, Journet *et al.*, 2003). T3S4-Proteine tierpathogener Bakterien sind daher vermutlich nicht nur am Substratspezifitätswechsel, sondern auch an der Nadellängenkontrolle beteiligt. Während die bekannten T3S4-Proteine aus tierpathogenen Bakterien über das Translokations-assoziierte T3S-System sekretiert werden (Collazo & Galan, 1996, Payne & Straley, 1999, Magdalena *et al.*, 2002), konnte für T3S4-Proteine aus pflanzenpathogenen Bakterien noch keine Sekretion nachgewiesen werden (Lorenz *et al.*, 2008b, Morello & Collmer, 2009), was darauf hin deutet, dass die Nadellängenkontrolle in pflanzenpathogenen Bakterien Translokations-assoziierten T3S-Systemen vermutlich durch einen anderen Mechanismus reguliert wird. T3S4-Proteine besitzen untereinander nur geringe Aminosäuresequenzidentitäten, weisen jedoch eine strukturell konservierte C-terminale Domäne auf, welche als T3S4-Domäne bezeichnet wird (Minamino *et al.*, 2004, Agrain *et al.*, 2005, Minamino *et al.*, 2006, Botteaux *et al.*, 2008, Lorenz *et al.*, 2008b). Studien mit dem T3S4-Protein Spa32 aus *S. flexneri* zeigten, dass die T3S4-Domäne nicht nur für die Sekretion von Effektorproteinen und die Nadellängenkontrolle essentiell ist, sondern auch für die Interaktion mit dem YscU-homologen Protein Spa40 (Botteaux *et al.*, 2008), wodurch vermutet wurde, dass die Interaktion zwischen T3S4-Proteinen und YscU-homologen Proteinen eine Bedeutung für den Substratwechsel hat (Minamino *et al.*, 2006).

### **1.7.2 Vertreter der YscU-Proteinfamilie**

Vertreter der YscU-Proteinfamilie sind sowohl in tier- und pflanzenpathogenen Translokations-assoziierten T3S-Systemen als auch in Flagellum-assoziierten T3S-Systemen zu finden und bestehen aus einer N-terminalen transmembranen Domäne sowie aus einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne die an einem konservierten Motiv, dem NPTH-Motiv, zwischen dem Asparagin (N) und Prolin (P) gespalten wird (einzelne Buchstaben beziehen sich auf den Einbuchstabencode der Aminosäuren) (Allaoui *et al.*, 1994, Minamino & Macnab, 2000a, Lavander *et al.*, 2002, Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008). Kristallstrukturen der zytoplasmatischen Domäne von EscU aus EPEC, SpaS aus *S. typhimurium*, Spa40 aus *S. flexneri* und YscU aus *Y. pestis* zeigen, dass das konservierte NPTH-Motiv auf einer Schleife an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist und wahrscheinlich autokatalytisch ohne weitere Proteine gespalten wird (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009, Wiesand *et al.*, 2009). Die abgespaltene Domäne bleibt dabei möglicherweise mit der membrangebundenen Domäne des Proteins assoziiert

(Minamino & Macnab, 2000a, Deane *et al.*, 2008, Björnfort *et al.*, 2009, Lontos *et al.*, 2009). Kristallstrukturen von YscU, Spa40, EscU und SpaS, weisen weiter darauf hin, dass die Spaltung des NPTH-Motivs zu einer veränderten Orientierung der PTH-Schleife führt (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Lontos *et al.*, 2009), wodurch eine Änderung der Oberflächenladung in diesem Bereich auftritt, welche möglicherweise wichtig für die Interaktion mit T3S-Komponenten ist (Deane *et al.*, 2008, Lontos *et al.*, 2009).

YscU-homologe Proteine mit einer Substitution des Asparaginrestes oder des Prolinrestes des konservierten NPTH-Motivs werden nicht mehr effizient gespalten und weisen oft ein Sekretionsdefizit für „späte“ Substrate, nicht jedoch für „frühe“ Substrate auf (siehe Tabelle 1.2). So führte die Substitution des Asparaginrestes zu einem Alaninrest im NPTH-Motiv des YscU-homologen Proteins FlhB aus dem Flagellum-assoziierten T3S-System von *Salmonella* spp. zur Sekretion von Hakenproteinen („frühes“ Substrat), aber nicht von Filamentproteinen („spätes“ Substrat) (Fraser *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2009). In Translokations-assoziierten T3S-Systemen erlaubten Aminosäuresubstitutionen im NPTH-Motiv von YscU aus *Yersinia* spp. und SpaS aus *S. flexneri* die Sekretion des T3S4-Proteins („frühes“ Substrat), während Translokonproteine nicht mehr sekretiert wurden (Sorg *et al.*, 2007, Zarivach *et al.*, 2008). Durch diese Ergebnisse wurde angenommen, dass die Spaltung des NPTH-Motivs in Translokations-assoziierten T3S-Systemen an dem Substratspezifitätswechsel von „frühen“ Substraten zu Translokonproteinen beteiligt ist (Sorg *et al.*, 2007, Zarivach *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu YscU und SpaS führten Aminosäuresubstitutionen im NPTH-Motiv von EscU aus EPEC und HrcU aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* zu einem Sekretionsverlust von Translokon- und Effektorproteinen (Zarivach *et al.*, 2008, Lorenz & Büttner, 2011), was darauf hin deutet, dass der Mechanismus der Substratspezifitätskontrolle zwischen Bakterien variieren kann.

Interaktionsstudien mit YscU und YscU-homologen Proteinen zeigten, dass Vertreter der YscU-Familie mit sekretierten T3S-Komponenten, wie z. B. „inner rod“-Proteinen und T3S4-Proteinen interagieren können (Minamino & Macnab, 2000a, Creasey *et al.*, 2003, Botteaux *et al.*, 2008, Riordan & Schneewind, 2008, Lorenz & Büttner, 2009, Morris *et al.*, 2010, Salman *et al.*, 2012), was darauf hin deutet, dass YscU-homologen Proteine auch eine Substratbindestelle des T3S-Systems darstellen könnten. Interessanterweise konnte der Phänotyp einer T3S4-Mutante durch Aminosäuresubstitutionen in der C-terminalen Region der zytoplasmatischen Domäne von YscU aus *Yersinia* spp. komplementiert werden (Edqvist *et al.*, 2003). Auch für *flhB* aus *Salmonella* spp., *escU* aus EPEC und für *hrcU* aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* führten Mutationen zur Komplementation des Phänotyps einer T3S4-Mutante (Hirano *et al.*, 1994, Kutsukake *et al.*, 1994, Williams *et al.*, 1996, Minamino & Macnab, 2000a, Zarivach *et al.*, 2008, Lorenz & Büttner, 2011).

**Tabelle 1.2: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in YscU-homologen Proteinen auf die T3S.<sup>1</sup>**

Aminosäuresubstitution (Genexpression)	Spaltung <sup>2</sup>	Effekt auf T3S <sup>3</sup>	Referenz
<u>YscU (<i>Yersinia</i> spp.)</u>			
N263A ( <i>in cis</i> )	Reduziert	Reduzierte Sekretion des „tip“-Proteins LcrV, des Nadelproteins YscF und von Translokonsowie Effektorproteinen	(Björnfot <i>et al.</i> , 2009)
N263A ( <i>in trans</i> )	Nein / Alternativ	Keine Sekretion des „tip“-Proteins LcrV, keine / reduzierte Sekretion von Translokonproteinen, reduzierte Sekretion des T3S4-Proteins YscP und von Effektorproteinen	(Sorg <i>et al.</i> , 2007, Riordan & Schneewind, 2008)
P264A ( <i>in cis</i> )	Nein	Reduzierte Sekretion des „tip“-Proteins LcrV, des Nadelproteins YscF und von Translokonsowie Effektorproteinen	(Björnfot <i>et al.</i> , 2009)
P264A ( <i>in trans</i> )	Nein / Alternativ	Keine Sekretion des „tip“-Proteins LcrV, reduzierte Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen	(Sorg <i>et al.</i> , 2007)
P264G ( <i>in trans</i> )	Reduziert	Keine Sekretion des „tip“-Proteins LcrV	(Wiesand <i>et al.</i> , 2009)
T265A ( <i>in cis</i> )	Ja	WT-Sekretion des Nadelproteins YscF	(Björnfot <i>et al.</i> , 2009)
H266A ( <i>in trans</i> )	Reduziert	WT-Sekretion des „tip“-Proteins LcrV	(Wiesand <i>et al.</i> , 2009)
Y317D ( <i>in trans</i> )	NA	Reduzierung der YscI-Sekretion durch eine <i>yscP</i> -Mutante, Komplementation des Phänotyps einer <i>yscP</i> -Mutante, reduzierte Sekretion von Effektorproteinen	(Edqvist <i>et al.</i> , 2003, Wood <i>et al.</i> , 2008)
<u>EscU (EPEC)</u>			
N262A ( <i>in trans</i> )	Nein	Keine / Reduzierte Sekretion von Effektorproteinen, keine Sekretion von Translokonproteinen und EspA	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)
P263A ( <i>in trans</i> )	Nein	Keine / Reduzierte Sekretion von Effektorproteinen, keine Sekretion von Translokonproteinen und EspA	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)
H265A ( <i>in trans</i> )	Ja	Keine Sekretion von EspA, Translokon- und Effektorproteinen	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)
Y316D ( <i>in trans</i> )	Reduziert	Reduzierte Sekretion von EspA, Translokon- und Effektorproteinen	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)
<u>SpaS (<i>S. typhimurium</i>)</u>			
N258A ( <i>in trans</i> )	Nein	WT-Sekretion des T3S4-Proteins InvJ, reduzierte Sekretion des Nadelproteins PrgI, keine Sekretion von Translokonproteinen	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)
P259A ( <i>in trans</i> )	Nein	WT-Sekretion des T3S4-Proteins InvJ, reduzierte Sekretion des Nadelproteins PrgI, keine Sekretion von Translokonproteinen	(Zarivach <i>et al.</i> , 2008)

Fortsetzung auf der nächsten Seite.

## Einleitung

Aminosäuresubstitution (Genexpression)	Spaltung <sup>2</sup>	Effekt auf T3S <sup>3</sup>	Referenz
<u>HrcU (<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)</u>			
N264A ( <i>in trans</i> )	Nein	Keine Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen, WT-Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2	(Lorenz & Büttner, 2011)
P265A ( <i>in trans</i> )	Reduziert	Reduzierte Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen, WT-Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2	(Lorenz & Büttner, 2011)
P265G ( <i>in trans</i> )	Nein	Keine Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2 sowie von Translokon- und Effektorproteinen	(Lorenz & Büttner, 2011)
T266A ( <i>in trans</i> )	Ja	WT-Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2 sowie von Translokon- und Effektorproteinen	(Lorenz & Büttner, 2011)
H267A ( <i>in trans</i> )	Ja	Reduzierte Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen, WT-Sekretion des „inner rod“-Proteins HrpB2	(Lorenz & Büttner, 2011)
Y318D ( <i>in trans</i> )	Reduziert	Komplementation des Phänotyps einer <i>hpaC</i> -Mutante, WT-Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen durch eine <i>hpaC</i> -Mutante	(Lorenz & Büttner, 2011)
<u>FlhB (<i>Salmonella</i> spp.)</u>			
N269A ( <i>in trans</i> )	Nein / Alternativ	Keine Sekretion des Filamentproteins FliC, WT-Sekretion des Hakenproteins FlgD	(Fraser <i>et al.</i> , 2003)
P270A ( <i>in trans</i> )	Reduziert / Alternativ	Reduzierte Sekretion des Filamentproteins FliC, WT-Sekretion des Hakenproteins FlgD	(Fraser <i>et al.</i> , 2003)
G293V ( <i>in trans</i> )	Reduziert	Partielle Komplementation des Phänotyps einer <i>fliK</i> -Mutante	(Williams <i>et al.</i> , 1996, Minamino & Macnab, 2000a)
<u>FlhB (<i>Helicobacter pylori</i>)</u>			
N265A ( <i>in trans</i> )	Nein	WT-Sekretion des Hakenproteins FlgE, keine Sekretion von Filamentproteinen	(Smith <i>et al.</i> , 2009)
P266G ( <i>in trans</i> )	Nein	WT-Sekretion des Hakenproteins FlgE, keine Sekretion von Filamentproteinen	(Smith <i>et al.</i> , 2009)
<u>Spa40 (<i>S. flexneri</i>)</u>			
N257A ( <i>in trans</i> )	Nein / Alternativ	Reduzierte Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen, verstärkte Sekretion des Nadelproteins	(Shen <i>et al.</i> , 2012)

<sup>1</sup> Tabelle nach (Büttner, 2012).

<sup>2</sup> Ja, Spaltung der C-terminalen Domäne zwischen dem Asparagin und Prolin; Nein, Keine Spaltung; Reduziert, Reduzierte Spaltung zwischen dem Asparagin und Prolin bezogen auf das Wildtypprotein; Alternativ, Detektion eines Spaltproduktes, welches nicht dem Spaltprodukt des Wildtyps entspricht; NA, Nicht analysiert.

<sup>3</sup> WT-Sekretion, Sekretion des untersuchten Proteins in das extrazelluläre Milieu, die mit dem Wildtypprotein vergleichbar ist.

Weil diese Substitutionen meist den Austausch von hydrophoben Aminosäureresten mit polarem bzw. mit größeren hydrophobem Rest betraf, nahmen die Autoren an, dass die Aminosäuresubstitution eine geringe Veränderung in der Proteinkonformation bewirkt, welche der Konformation von YscU entspricht, wenn das T3S4-Protein YscP in dem selben *Yersinia*-Stamm anwesend ist (Edqvist *et al.*, 2003). Somit wurde angenommen, dass eine Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne von YscU-homologen Proteinen, möglicherweise nach der Interaktion mit einem T3S4-Protein und vermutlich die Spaltung des NPTH-Motivs zu dem Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems führt (Williams *et al.*, 1996, Edqvist *et al.*, 2003, Ferris *et al.*, 2005, Cornelis, 2006, Deane *et al.*, 2008, Minamino *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Björnfort *et al.*, 2009, Lountos *et al.*, 2009, Wiesand *et al.*, 2009, Lorenz & Büttner, 2011).

### 1.7.3 Die derzeitigen Theorien des Substratspezifitätswechsels

Momentan werden verschiedene Theorien über den Substratspezifitätswechsel durch T3S4-Proteine und YscU-homologe Proteine postuliert. Das „molecular ruler“-Modell, welches die Nadellängenkontrolle und Substratspezifitätswechsel in *Yersinia* spp. durch YscP erklären soll, basiert auf der Erkenntnis, dass Deletionen in YscP zu kleineren und Insertionen zu größeren Nadeln führten (Hirano *et al.*, 1994, Journet *et al.*, 2003). Im Rahmen dieses Modells wird angenommen, dass der C-Terminus des T3S4-Proteins an der Basis des Basalapparates verankert ist, währenddessen der N-Terminus das Innere der Nadel durchquert oder sogar mit dem „tip“-Komplex interagiert (Deane *et al.*, 2010). Der Transport von T3S-Substraten erfolgt dabei vermutlich partiell oder ungefalted (Büttner, 2012). Tritt bei einer Verlängerung der Nadel eine Streckung des T3S4-Proteins auf, wird wahrscheinlich durch Interaktion der T3S4-Domäne des T3S4-Proteins mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne eines YscU-homologen Proteins, der Substratspezifitätswechsel initiiert und die Sekretion von Translokonproteinen aktiviert. Experimente mit dem T3S4-Protein Spa32 aus *S. flexneri* wiesen daraufhin, dass das „molecular ruler“-Modell nicht vollständig angewendet werden kann, da unterschiedlich große Deletionen in Spa32 zu keiner großen Variation der Nadellänge führten (Botteaux *et al.*, 2008), was den Experimenten mit YscP widersprach (Hirano *et al.*, 1994, Journet *et al.*, 2003). Für die Bestimmung der Nadellänge in *S. flexneri* wurde dadurch das „molecular tape measure“-Modell postuliert. Dieses beruht im Wesentlichen auf dem „molecular ruler“-Modell, geht jedoch von einer periodischen Sekretion des T3S4-Proteins aus (Botteaux *et al.*, 2008). Ist die erforderliche Nadellänge erreicht, wird der Substratspezifitätswechsel vermutlich durch die Interaktion der T3S4-Domäne des Spa32-Proteins mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von Spa40

(YscU-Homolog) induziert (Botteaux *et al.*, 2008). Im Vergleich zum „molecular ruler“-Modell, beschreibt das „molecular tape measure“-Modell jedoch nicht eindeutig wie die Fertigstellung der Nadel in das Zytoplasma signalisiert wird (Barison *et al.*, 2013).

Eine alternative Theorie für die Kontrolle des Substratspezifitätswechsels berücksichtigt einen möglichen Beitrag von „inner rod“-Proteinen. Für *S. typhimurium* konnte durch Kryoelektronenmikroskopie gezeigt werden, dass in Abwesenheit des T3S4-Proteins InvJ eine strukturelle Differenz im Basalapparat zu erkennen ist, welche möglicherweise auf eine Störung der „inner rod“-Assemblierung hindeutet (Marlovits *et al.*, 2006). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte weiterhin ermittelt werden, dass in einer *invJ*-Mutante der „inner rod“ nicht assemblieren kann und der Betrag von „inner rod“-Proteinen die mit dem Basalapparat assoziieren reduziert ist, was u. a. zu längeren Nadeln und keinem Substratspezifitätswechsel führte (Sukhan *et al.*, 2003, Lefebvre & Galan, 2014). Studien mit *Yersinia* spp. zeigten weiterhin, dass in Abwesenheit des T3S4-Proteins YscP das „inner rod“-Protein YscI verstärkt sekretiert wird (Wood *et al.*, 2008). Nachdem Aminosäuresubstitutionen in YscU nicht nur den Phänotyp einer *yscP*-Mutante supprimierten, sondern auch zu einer Wildtyp-Sekretion von YscI führten, wurde eine Verbindung zwischen dem Substratspezifitätswechsel und der Sekretionskontrolle des „inner rod“-Proteins YscI angenommen (Wood *et al.*, 2008). Das daraus entwickelte Modell postuliert, dass der „inner rod“ sowie die Nadel zur gleichen Zeit aufgebaut werden und die Nadellänge durch die relative Konzentration der zytoplasmatischen „inner rod“- bzw. Nadelproteine als auch durch die Assemblierungsrate des „inner rod“ bestimmt wird (Marlovits *et al.*, 2006). Unterstützt wird diese Theorie durch eine vor kurzem veröffentlichte Studie mit dem „inner rod“-Protein PrgJ aus *S. typhimurium*, die zeigte, dass Aminosäuresubstitutionen in PrgJ zu verlängerten Nadeln führte, deren Länge der Nadellänge einer *invJ*-Mutante entsprachen, während die Sekretion von PrgJ und des T3S4-Proteins InvJ nicht beeinflusst war (Lefebvre & Galan, 2014). Diese Daten vermitteln, dass die Kontrolle der Nadellänge und damit vermutlich die Determinierung des Substratspezifitätswechsels von Substitutionen in PrgJ und nicht von der InvJ-Sekretion abhängig ist. Im Rahmen dieser alternativen Theorie wird nach der Fertigstellung des „inner rod“ die Nadel am Basalapparat verankert und gleichzeitig ein Konformationswechsel induziert, welcher vermutlich zum Substratspezifitätswechsel führt (Marlovits *et al.*, 2004). YscU-homologe Proteine sowie T3S4-Proteine würden demnach ihren Einfluss auf den Substratspezifitätswechsel durch die Regulation der Sekretion von „inner rod“-Proteinen ausüben (Wood *et al.*, 2008).

## 1.8 Die Erkennung von T3S-Substraten - T3S-Signale und T3S-Chaperone

Die Sekretion von T3S-Substraten erfordert ein T3S-Signal, welches oft in den N-terminalen 20 bis 30 Aminosäuren lokalisiert ist (Michiels & Cornelis, 1991, Sory *et al.*, 1995, Schesser *et al.*, 1996, Cardenal-Munoz & Ramos-Morales, 2011, Baison-Olmo *et al.*, 2012). Die N-terminale Region von T3S-Substraten ist auf Ebene der Aminosäuren nicht konserviert, besitzt jedoch oft eine spezifische Aminosäurekomposition (Guttman *et al.*, 2002, Schechter *et al.*, 2004, Arnold *et al.*, 2009, Löwer & Schneider, 2009, Samudrala *et al.*, 2009). So zeigen statistische Analysen von T3S-Effektoren und Nicht-Effektoren, dass in den N-terminalen 30 Aminosäuren von T3S-Effektoren die Aminosäuren Serin und Threonin häufiger vorkommen und der Anteil von hydrophoben und sauren Aminosäureresten verringert ist (Arnold *et al.*, 2009, McDermott *et al.*, 2011, Sato & Frank, 2011, Dong *et al.*, 2013). Neueste *in silico*-Analysen lassen vermuten, dass auch weitere Eigenschaften der N-terminalen Region, wie die Sekundärstruktur, die Zugänglichkeit von Wassermolekülen oder sehr schwach konservierte Aminosäuremotive einen Einfluss auf die Erkennung von Effektorproteinen haben können (Dong *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2013b). Die Analyse der Kristallstruktur des Effektors SipA aus *S. typhimurium* sowie die Untersuchung des Effektorproteins BteA aus *Bordetella bronchiseptica* durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie, weisen ferner darauf hin, dass die N-terminale Region dieser Proteine wahrscheinlich unstrukturiert ist, d. h. keine tertiäre Struktur aufweist (Lilic *et al.*, 2006, Guttman *et al.*, 2013). Die N-terminale unstrukturierte Region von Effektorproteinen ist möglicherweise für die Erkennung von T3S-Substraten durch T3S-Komponenten wichtig (Buchko *et al.*, 2010), wie z. B. durch die C-terminale Domäne von Vertretern der YscV-Familie, den C-Ring oder die T3S-assoziierte ATPase (siehe Kapitel 1.9 und Anhang, Tabelle 5). Die Untersuchung des T3S-Signals der Effektoren YopE, YopN und YopQ aus *Yersinia* spp. zeigte, dass alternative T3S-Signale möglicherweise auch in der mRNA kodiert sein können, wodurch eine kotranslationale Sekretion dieser Effektoren vermutet wurde (Anderson & Schneewind, 1997, Anderson & Schneewind, 1999, Ramamurthi & Schneewind, 2002). Die Existenz eines mRNA-Signals wird jedoch kontrovers betrachtet, da die Mutationen in *yopE* aus *Yersinia* spp. ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, zu keiner Inhibierung der T3S-Sekretion von YopE führten (Lloyd *et al.*, 2001). Weiterhin zeigten Studien mit Effektorproteinen aus *Salmonella* spp., dass die ermittelte Anzahl von Effektorproteinen im bakteriellen Zytoplasma (6000 Proteine SipA, 3000 Proteine SopE, 10000 Proteine SptP) im Vergleich zu den geschätzten 10 bis 100 T3S-Systemen wesentlich höher ist, was einer kotranslationalen Sekretion widerspricht (Kubori *et al.*, 1998, Schlumberger *et al.*, 2005, Schlumberger & Hardt, 2006, Winnen *et al.*, 2008). Experimentelle Daten verdeutlichen jedoch, dass für den Transport von bestimmten

Effektoren wie GtgA, SseL und SteD aus *Salmonella* spp. in die Wirtszelle das RNA-Chaperon Hfq, welches kurze Adenin/Uracil-reiche RNA-Sequenzen bindet, benötigt wird und lässt vermuten, dass möglicherweise ein RNA-Signal auch an der Erkennung von bestimmten Effektorproteinen beteiligt sein kann (Brennan & Link, 2007, Niemann *et al.*, 2013). Die Analyse der N-terminalen Region von verschiedenen Effektorproteinen zeigte weiterhin, dass für den Transport von Effektoren in die Wirtszelle, neben einem T3S-Signal auch ein Translokationssignal von Bedeutung ist, welches häufig in den N-terminalen 50-100 Aminosäuren lokalisiert ist und oft eine Bindestelle für T3S-Chaperone darstellt (Büttner, 2012). T3S-Chaperone sind meist zytoplasmatische Proteine, die als Homo- oder Heterodimere spezifisch mit der Chaperonbindedomäne eines T3S-Substrates interagieren, und dadurch vermutlich die Erkennung von T3S-Effektoren durch T3S-Komponenten fördern (Büttner, 2012, Lohou *et al.*, 2013). T3S-Chaperone fördern jedoch nicht nur die Erkennung von T3S-Substraten, sondern können auch einen Einfluss auf die Translokationshierarchie von T3S-Effektoren besitzen oder Proteindomänen in Effektorproteinen maskieren, wie z. B. die Membranlokalisierungsdomäne des Effektors YopO aus *Y. enterocolitica* durch das T3S-Chaperon SycO verdeckt wird (Boyd *et al.*, 2000, Letzelter *et al.*, 2006, Thomas *et al.*, 2007).

### **1.9 Der vorhergesagte C-Ring ist eine Sortierungsplattform für T3S-Substrate**

Für Flagellum-assoziierte T3S-Systeme konnte ermittelt werden, dass der Basalapparat mit einer zytoplasmatischen Ringstruktur („cytoplasmic“, C-Ring) assoziiert ist, welche u. a. durch FliM und FliN ausgebildet wird (Khan *et al.*, 1992, Francis *et al.*, 1994, Kubori *et al.*, 1997, Lux *et al.*, 2000). In Translokations-assoziierten T3S-Systemen konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Basalapparaten bisher noch kein C-Ring nachgewiesen werden (Blocker *et al.*, 2001, Kudryashev *et al.*, 2013). Das putative C-Ringprotein Spa33 von *S. flexneri* lokalisiert jedoch in Immunogoldmarkierungen an der zytoplasmatischen Seite des T3S-Systems und interagiert mit den IM-Komponenten MxiG und MxiJ sowie mit der T3S-assoziierten ATPase Spa47 (Morita-Ishihara *et al.*, 2006). T3S-assoziierte ATPasen sind an der Rekrutierung von T3S-Substraten beteiligt und fördern durch ATP-Hydrolyse die Trennung von T3S-Substraten von deren T3S-Chaperonen (Gauthier & Finlay, 2003, Akeda & Galan, 2005, Thomas *et al.*, 2005, Lorenz & Büttner, 2009, Yoshida *et al.*, 2014) sowie das Entfalten von T3S-Substraten (Akeda & Galan, 2005). Die Entfaltung des T3S-Substrates ist für den Transport durch das T3S-System notwendig, da der Durchmesser des inneren Kanals der extrazellulären Nadel- oder Pilusstruktur vermutlich zu klein ist, um die Passage von vollständig gefalteten Proteinen zu gewährleisten (Büttner, 2012).

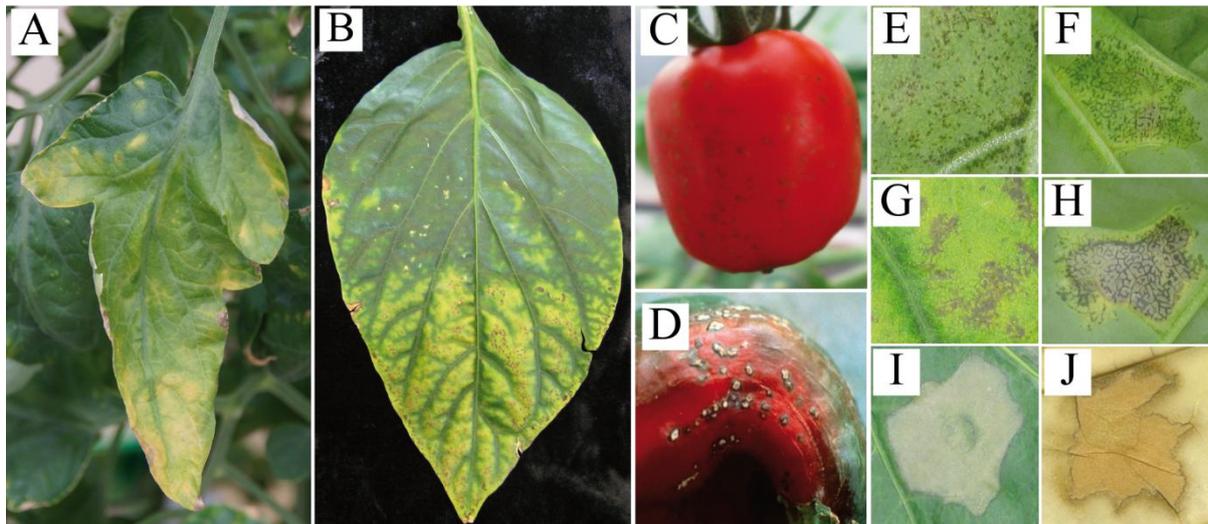
Die vorhergesagten C-Ringkomponenten aus *Y. pseudotuberculosis* und *S. typhimurium* wird durch ein Gen kodiert, dessen Genprodukt einen Komplex mit einem verkürzten Derivat des Volllängenproteins ausbildet, welches durch ein internes Startcodon entsteht und der C-terminalen Hälfte des Volllängenproteins entspricht (Yu *et al.*, 2011, Bzymek *et al.*, 2012). Kristallstrukturen weisen daraufhin, dass das verkürzte Derivat YscQ-C aus *Y. pseudotuberculosis* Homodimere bilden kann und strukturelle Ähnlichkeit mit den C-Ringkomponenten FliN und HrcQ<sub>B</sub> besitzt, welche untereinander selbst strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Fadouloglou *et al.*, 2004, Brown *et al.*, 2005, Bzymek *et al.*, 2012). Proteine der YscQ-Proteinfamilie weisen demnach Ähnlichkeiten mit Komponenten des flagellaren C-Rings auf und könnten einen Teil der C-Ringstruktur in Translokations-assoziierten T3S-Systemen bilden. Weil YscQ und YscQ-homologe Proteine mit Effektorproteinen, T3S-assoziierten ATPasen sowie mit Substrat-Chaperon-Komplexen interagieren wurde vermutet, dass sie als Rekrutierungsplattform für sekretierte Proteine dienen (Jackson & Plano, 2000, Morita-Ishihara *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2008, Spaeth *et al.*, 2009). In der Tat konnte für *S. typhimurium* durch eine Immunopräzipitation des YscQ-homologen Proteins SpaO gezeigt werden, dass ein Komplex, bestehend aus SpaO mit den zytoplasmatischen Proteinen OrgA und OrgB, nacheinander T3S-Substrate wie Nadel- und Translokationskomponenten sowie Effektorproteine rekrutieren kann und dadurch eine definierte Reihenfolge dieser zu sekretierenden Proteine festlegt (Lara-Tejero *et al.*, 2011).

## **1.10 T3S im pflanzenpathogenen Bakterium *X. campestris* pv. *vesicatoria***

### **1.10.1 *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit**

Eines der Modellsysteme zur Analyse von Translokations-assoziierten T3S-Systemen ist das Gram-negative stäbchenförmige pflanzenpathogene Bakterium *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), reklassifiziert als *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 2004). *Xcv* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit („bacterial spot disease“) auf Tomaten- (*Solanum lycopersicum*) und Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) (siehe Abbildung 1.2, A bis D). Die Verbreitung des Bakteriums erfolgt durch Spritzwasser bei Regen. *Xcv* tritt durch Öffnungen, wie Stomata oder durch Verwundungsstellen auf der Pflanzenoberfläche in die Pflanze ein und vermehrt sich lokal in den interzellularen Räumen der Wirtspflanze. Die Infektion von suszeptiblen Paprikapflanzen durch *Xcv* führt zur Ausbildung von Krankheitssymptomen, sogenannte wässrige Läsionen, die durch ein feucht erscheinendes Blattgewebe gekennzeichnet sind, welches im Verlauf der Infektion nekrotisch wird (siehe Abbildung 1.2, E bis H). Resistente Pflanzen hingegen sind in der Lage einzelne bakterielle

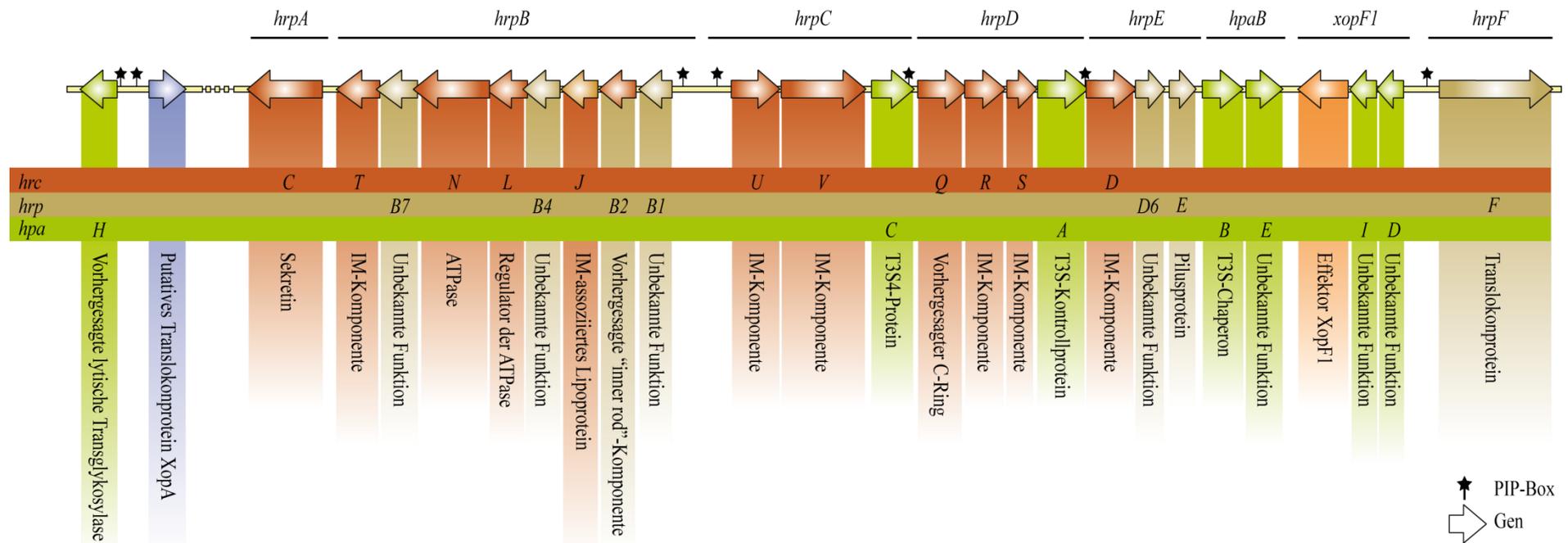
Effektorproteine, die als Avirulenz-Proteine (Avr-Proteine) bezeichnet werden, durch ihr korrespondierendes pflanzliches Resistenzprotein oder Resistenzgen direkt oder indirekt zu erkennen, welches oft mit einem schnellen, lokalen Zelltod („hypersensitive response“, HR) assoziiert ist (Flor, 1971, Greenberg & Yao, 2004). Während eine HR bei natürlichen Infektionen nur auf wenige Pflanzenzellen begrenzt und makroskopisch nicht sichtbar ist, führt die Inokulation von hohen Bakteriendichten in die Blätter von resistenten Pflanzen zu einem sichtbaren lokalen Absterben an der Infektionsstelle (Abbildung 1.2, I und J).



**Abbildung 1.2: *Xcv* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Tomaten- und Paprikapflanzen.** Die Infektion von *Xcv* führt zur Ausbildung von Krankheitssymptomen auf den Blättern von Tomaten- (A) und Paprikapflanzen (B) sowie auf Tomaten- (C) und Paprikafrüchten (D). Die Krankheitssymptome können auf den Blättern in einem frühen Stadium der Infektion als wässrige Läsionen wahrgenommen werden (E, F), welche im Verlauf der Infektion nekrotisch werden (G, H). Die Inokulation von hohen Bakteriendichten in die Blätter von resistenten Paprikapflanzen führt zu einem makroskopisch sichtbaren lokalen Absterben des Blattgewebes (I, J). In den Abbildungen F, H, I und J sind Laborphänotypen dargestellt, die durch die Inokulation von hohen Bakteriendichten erreicht werden. Im Labor werden für eine bessere Visualisierung der HR die Blätter von resistenten Pflanzen in Ethanol gebleicht und anschließend dokumentiert (J). Quellennachweis: Abbildung A bis C und E bis J, Felix Scheibner und Jens Hausner; Abbildung D, (Cerkauskas *et al.*, 2004).

### 1.10.2 Das T3S-System wird durch ein Gencluster kodiert

Das Translokations-assoziierte T3S-System von *Xcv* ist chromosomal in einer circa 23 Kilobasen großen Region kodiert, welche als „hypersensitive response and pathogenicity“-Gencluster (*hrp*-Gencluster) bezeichnet wird (Bonas *et al.*, 1991). Das *hrp*-Gencluster ist in acht Transkriptionseinheiten organisiert und umfasst 25 Gene, die für alle essentiellen Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Apparates sowie für Kontrollproteine kodieren (siehe Abbildung 1.3) (Fenselau & Bonas, 1995, Wengelnik *et al.*, 1996a, Huguet & Bonas, 1997, Huguet *et al.*, 1998, Rossier *et al.*, 2000, Büttner & Bonas, 2002, Büttner *et al.*, 2007, Weber *et al.*, 2007). Die Genprodukte der elf *hrc*-Gene



**Abbildung 1.3: Das *hrp*-Gencluster kodiert für die essentiellen Komponenten des T3S-Systems.** Das *hrp*-Gencluster umfasst 25 Gene, die in acht Transkriptionseinheiten, den Operonen *hrpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* und *hpaB* sowie *xopF1* zusammengefasst sind. Die Gene *hpaH* und *xopA* befinden sich in der flankierenden Region des *hrp*-Genclusters und kodieren Proteine, welche zur Virulenz von *Xcv* beitragen. Das *hpaA*-Genprodukt ist nicht nur ein T3S-Kontrollprotein, sondern auch ein Effektorprotein. Pfeile weisen auf Gene hin und geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. Im unteren Abschnitt der Abbildung ist die mögliche Funktion der Genprodukte angegeben. *hrc*, *hrc*-Gene; *hrp*, *hrp*-Gene; *hpa*, *hpa*-Gene; Stern, weist auf die Anwesenheit einer PIP-Box hin. Abbildung verändert nach (Büttner & Bonas, 2002).

(„*hrp*-conserved“, *hrp*-konserviert) weisen eine hohe Aminosäureidentität mit T3S-Komponenten aus tierpathogenen Translokations-assoziierten T3S-Systemen auf und kodieren vermutlich die Kernkomponenten des T3S-Systems (He *et al.*, 2004). Die Nomenklatur bezieht sich dabei auf die Ysc-Proteine des tierpathogenen Bakteriums *Yersinia* spp. (Bogdanove *et al.*, 1996). Neben den *hrc*-Genen enthält das *hrp*-Gencluster auch sieben *hrp*-Gene, deren Genprodukte wie die Hrc-Proteine essentiell für die Pathogenität von *Xcv*, jedoch nicht über tierpathogene und/oder in pflanzenpathogenen Bakterien konserviert sind (Huguet *et al.*, 1998, Rossier *et al.*, 2000). Die Funktion der meisten *hrp*-Gene wurde noch nicht näher analysiert. Bisher konnte nur für die sekretierten Proteine HrpF als Translokationsprotein, HrpE als Pilusprotein und HrpB2 als mögliches „inner rod“-Protein eine Funktion ermittelt werden (Huguet & Bonas, 1997, Büttner *et al.*, 2002, Weber *et al.*, 2005, Hartmann *et al.*, 2012). Außer den Hrc- und Hrp-Proteinen kodiert das *hrp*-Gencluster, durch die *hpa*-Gene („*hrp*-associated“: *hrp*-assoziiert), sechs Hpa-Proteine, welche nicht essentiell für die T3S sind, aber oft zur Virulenz von *Xcv* beitragen (Huguet *et al.*, 1998, Büttner *et al.*, 2004, Büttner *et al.*, 2006, Büttner *et al.*, 2007, Lorenz *et al.*, 2008a, Lorenz *et al.*, 2008b). Während HpaI und HpaD für die T3S entbehrlich sind, sind HpaE, HpaA, HpaB und HpaC für die T3S bzw. Translokation von T3S-Substraten von Bedeutung (siehe für HpaA und HpaB Kapitel 1.10.6 und für HpaC Kapitel 1.10.5.1). Hpa-Proteine werden jedoch nicht ausschließlich von Genen des *hrp*-Genclusters kodiert, sondern auch durch Gene in den flankierenden Regionen des *hrp*-Genclusters (*hpaH*, *hpaG* und *hpaF*) und durch Gene in anderen Locus (*hpaJ*) (Noël *et al.*, 2002, Noël *et al.*, 2003). Die Deletion von *hpaG* und *hpaF* zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* (Noël *et al.*, 2002), während HpaH wahrscheinlich zur Sekretion und Translokation von Effektorproteinen beiträgt (Büttner *et al.*, 2007). HpaH und HpaJ sind putative lytische Transglykosylasen, welche eventuell die lokale Modifizierung des Peptidoglykans im Periplasma des Bakteriums erlauben. Die lokale Veränderung des Peptidoglykans ist vermutlich für die effiziente Assemblierung des T3S-Systems wichtig, da die Porengröße des Peptidoglykans von circa 2 nm die Passage von Proteinen die mehr als 50 kDa groß sind behindert und somit die Assemblierung von großen Proteinkomplexen nicht möglich wäre (Demchick & Koch, 1996, Koraimann, 2003, Scheurwater & Burrows, 2011).

### 1.10.3 Die Regulation der *hrp*-Gene

Die Expression der *hrp*-Gene erfolgt nicht konstitutiv, sondern wird in der Pflanze oder in einem speziellen Minimalmedium durch die Produkte der Gene *hrpG* und *hrpX* aktiviert (Schulte & Bonas, 1992, Wengelnik & Bonas, 1996, Wengelnik *et al.*, 1996b). HrpG gehört

zu den „response“-Regulatoren von Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystemen der OmpR-Familie und führt nach der Aktivierung zur Expression eines genomweiten Regulons, die sowohl Virulenzgene wie *hrp*-Gene, aber auch Effektorgene betrifft (Wengelnik *et al.*, 1996b, Noël *et al.*, 2001, Thieme *et al.*, 2007, Szczesny *et al.*, 2010, Schulze *et al.*, 2012). Die Aktivierung von HrpG erfolgt nach der Perzeption eines noch unbekanntes pflanzlichen Signals, möglicherweise durch Phosphorylierung (Wengelnik *et al.*, 1996b). In *X. campestris* pv. *campestris* konnte HpaS als mögliche Sensorkinase identifiziert werden, welche HrpG phosphoryliert (Li *et al.*, 2013). Ein Aminosäureaustausch in HrpG (E44K) von *Xcv* führt zur konstitutiven Aktivierung des „response“-Regulators und ermöglicht, unter der Verwendung eines Minimalmediums, die Analyse der T3S-System-abhängigen *in vitro*-Sekretion (Rossier *et al.*, 1999, Wengelnik *et al.*, 1999). Die HrpG-vermittelte Expression von Genen ist in den meisten Fällen von dem zur AraC-Familie gehörenden Transkriptionsaktivator HrpX abhängig (Wengelnik & Bonas, 1996). Mit der Ausnahme des *hrpA*-Operons, welches durch HrpG reguliert wird, werden alle anderen *hrp*-Operone durch HrpX induziert (Wengelnik *et al.*, 1996a). HrpX bindet an die „plant-inducible promoter“-Boxen (PIP-Boxen) in den Promotoren von HrpX-regulierten Genen, welche die Konsensussequenz TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC aufweisen (Wengelnik & Bonas, 1996, Koebnik *et al.*, 2006). Die HrpX vermittelte Expression von Genen betrifft aber auch Gene mit einer imperfekten PIP-Box in ihrem Promotor, wie für *hrpF* gezeigt wurde (Wengelnik & Bonas, 1996, Huguet & Bonas, 1997, Noël *et al.*, 2001). Studien mit *X. oryzae* pv. *oryzicola* weisen darauf hin, dass neben HrpX auch HrpD6 die Expression von bestimmten *hrp*-Genen positiv beeinflussen kann, während HrcT wahrscheinlich einen positiven Einfluss auf die Expression von *hrpX* hat (Li *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014). Für *Xcv* wurde ein möglicher Einfluss von HrpD6 oder HrcT jedoch noch nicht analysiert.

#### **1.10.4 Die vorhergesagte Architektur des T3S-Systems aus *Xcv***

Das Translokations-assoziierte T3S-System aus *Xcv* besteht aus einem Basalapparat, dessen ÄM-Ring vermutlich durch das Sekretin HrcC aufgebaut wird, während der IM-Ring durch HrcJ und HrcD ausgebildet wird. Der Basalapparat ist mit einem Exportapparat assoziiert, dessen Komponenten in der IM möglicherweise einen Exportkanal bilden, durch die T3S-Substrate über die IM transportiert werden können (Büttner, 2012). Einige Komponenten des Exportapparates wie HrcU und HrcV besitzen zytoplasmatische Domänen, die wahrscheinlich Bindestellen für T3S-Substrate darstellen (Lorenz *et al.*, 2008b, Hartmann & Büttner, 2013). So konnte für die C-terminale zytoplasmatische Domäne von HrcV eine Interaktion mit

Effektorproteinen und sekretierten Komponenten des T3S-Systems, wie HrpB2, nachgewiesen werden (Hartmann & Büttner, 2013). HrpB2 ist ein schwach sekretiertes Protein, welches für den Aufbau des extrazellulären Pilus essentiell ist und stellt damit vermutlich eines der ersten Substrate dar, die das T3S-System durchqueren (Rossier *et al.*, 2000, Lorenz *et al.*, 2008b). Die Analyse der HrpB2-Aminosäuresequenz führte zur Identifizierung eines Aminosäuremotivs, welches essentiell für den Beitrag von HrpB2 für die Pilusbildung sowie T3S ist und in vorhergesagten „inner rod“-Proteinen vorkommt (Hartmann *et al.*, 2012). Die Bedeutung des Motivs für die HrpB2-Funktion und die periplasmatische Lokalisierung von HrpB2 deuten darauf hin, dass HrpB2 ein putatives „inner rod“-Protein sein könnte (Hartmann *et al.*, 2012). Möglicherweise bildet HrpB2 somit einen Kanal zwischen der IM und ÄM aus, welcher als Transportkanal durch den periplasmatischen Raum dient. Die extrazelluläre Pilusstruktur besteht in *Xcv* vermutlich aus dem sekretierten Protein HrpE (Weber *et al.*, 2005), während das Translokon wahrscheinlich durch HrpF ausgebildet wird, welches zwei vorhergesagte transmembrane Regionen sowie lipid-bindende und porengebende Aktivität besitzt (Huguet & Bonas, 1997, Büttner *et al.*, 2002). Neben HrpF könnte vermutlich auch XopA ein Teil des Translokons sein (Noël *et al.*, 2002).

Die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen erfordert wahrscheinlich erst den Aufbau des „inner rod“ und des extrazellulären Pilus. Die Sekretion von „frühen“ T3S-Substraten wie HrpB2 zu „späten“ T3S-Substraten wie HrpF und Effektorproteinen, sollte daher durch distinkte Mechanismen kontrolliert werden.

### **1.10.5 Der Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems in *Xcv***

#### **1.10.5.1 Das zytoplasmatische T3S-Kontrollprotein HpaC**

Die Analyse der *in vitro*-Sekretion einer *hpaC*-Mutante zeigte, dass in Abwesenheit von HpaC Translokon- und Effektorproteine reduziert sekretiert werden, während die Sekretion des Pilusproteins HrpE nicht beeinflusst und die Sekretion des putativen „inner rod“-Proteins HrpB2 verstärkt war (Büttner *et al.*, 2006, Lorenz *et al.*, 2008b). In Übereinstimmung mit der reduzierten *in vitro*-Sekretion von „späten“ T3S-Substraten, führte die Inokulation einer *hpaC*-Mutante in suszeptiblen Paprikapflanzen, im Vergleich zu einem Wildtypstamm, zu einer reduzierten Ausbildung von Krankheitssymptomen (Büttner *et al.*, 2006). Da HpaC die Sekretion von „späten“ Substraten fördert, während die Sekretion des „frühen“ Substrates HrpB2 negativ kontrolliert wird, wurde vermutet, dass HpaC wie T3S4-Proteine aus tierpathogenen Bakterien am Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt ist (Lorenz *et al.*, 2008b). *In vitro*-Interaktionsstudien verdeutlichten, dass HpaC u. a. mit dem T3S-

Chaperon HpaB (siehe Kapitel 1.10.6), dem putativen „inner rod“-Protein HrpB2 sowie mit den C-terminalen zytoplasmatischen Domänen der IM-Komponenten HrcV und HrcU (HrcU<sub>C</sub>) interagiert (Lorenz *et al.*, 2008b, Schulz & Büttner, 2011, Hartmann & Büttner, 2013). Komplementationsstudien mit HpaC-Derivaten, die nicht mehr mit HrcU<sub>C</sub> interagierten, konnten den Phänotyp einer *hpaC*-Mutante nicht komplementieren, wodurch angenommen wurde, dass die Interaktion von HrcU<sub>C</sub> mit HpaC wichtig für den Substratspezifitätswechsel ist (Schulz & Büttner, 2011). Für die Interaktion zwischen HrcU<sub>C</sub> und HpaC war die C-terminale Domäne von HpaC essentiell (Lorenz *et al.*, 2008b, Schulz & Büttner, 2011). Der Phänotyp einer *hpaC*-Mutante konnte jedoch durch die C-terminale Region von HpaC alleine nicht komplementiert werden (Schulz & Büttner, 2011). Die Interaktion zwischen HrcU<sub>C</sub> und HpaC ist daher vermutlich für den Substratspezifitätswechsel essentiell, aber nicht hinreichend, um den Substratspezifitätswechsel zu induzieren (Schulz & Büttner, 2011).

#### **1.10.5.2 Die IM-Komponente HrcU ist am Substratspezifitätswechsel beteiligt**

Die IM-Komponente HrcU ist ein Vertreter der YscU-Proteinfamilie (siehe Kapitel 1.7.2). Topologiestudien zeigten, dass HrcU aus vier N-terminalen transmembranen Helices sowie einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne aufgebaut wird (Berger *et al.*, 2010). Die C-terminale Domäne wird wahrscheinlich an einem über die YscU-Familie konservierten NPTH-Motiv, das vermutlich für die Interaktion von HrcU<sub>C</sub> mit dem putativen „inner rod“-Protein HrpB2 von Bedeutung ist, gespalten (siehe Tabelle 1.3) (Lorenz & Büttner, 2011). Komplementationsstudien mit spaltungsdefizienten HrcU-Derivaten zeigten, dass die HrcU-Spaltung zur Pathogenität von *Xcv* und Sekretion von „späten“ Substraten beiträgt, während die Spaltung für die Sekretion von HrpB2 entbehrlich war (siehe Tabelle 1.3) (Lorenz & Büttner, 2011). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die HrpB2-Sekretion vor der HrcU-Spaltung stattfindet (Lorenz & Büttner, 2011). Nachdem das HrcU-Derivat HrcU<sub>P265G</sub> nicht mehr mit HrpB2 interagiert und das HrpB2-Sekretionsdefizit einer *hrcU*-Mutante nicht komplementierte (siehe Tabelle 1.3), wurde weiterhin angenommen, dass die effiziente HrpB2-Sekretion die Interaktion mit dem NPTH-Motiv erfordert (Lorenz & Büttner, 2011). Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten jedoch, dass Aminosäuresubstitutionen im NPTH-Motiv nicht nur die Interaktion zwischen HrcU mit HrpB2, sondern auch die Interaktion von HrcU<sub>C</sub> mit HpaC beeinträchtigt war (Lorenz & Büttner, 2011). Wahrscheinlich konkurrieren HrpB2 und HpaC, welche selbst miteinander interagieren (Lorenz *et al.*, 2008b), somit um dieselbe Bindestelle in HrcU. Da HrcU<sub>C</sub>, HpaC und HrpB2 Teil eines gemeinsamen

**Tabelle 1.3: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im NPTH-Motiv auf die HrcU-Proteinfunktion.<sup>1</sup>**

Derivat	Spaltung	Interaktion <sup>2</sup>		T3S-Sekretion <sup>3</sup>		Komplementation <sup>4</sup>
		HrpB2	HpaC	Substrate		
				„frühe“	„späte“	
HrcU	Ja	Ja	Ja	+	+	Ja
HrcU <sub>N264A</sub>	Nein	Ja	Nein	+/-	-	Nein
HrcU <sub>P265A</sub>	Reduziert	Reduziert	Reduziert	+	+/-	Partiell
HrcU <sub>P265G</sub>	Nein	Nein	Nein	-	-	Nein
HrcU <sub>T266A</sub>	Reduziert	NA	NA	+/-	+/-	Ja
HrcU <sub>H267A</sub>	Reduziert	NA	NA	+/-	+/-	Ja

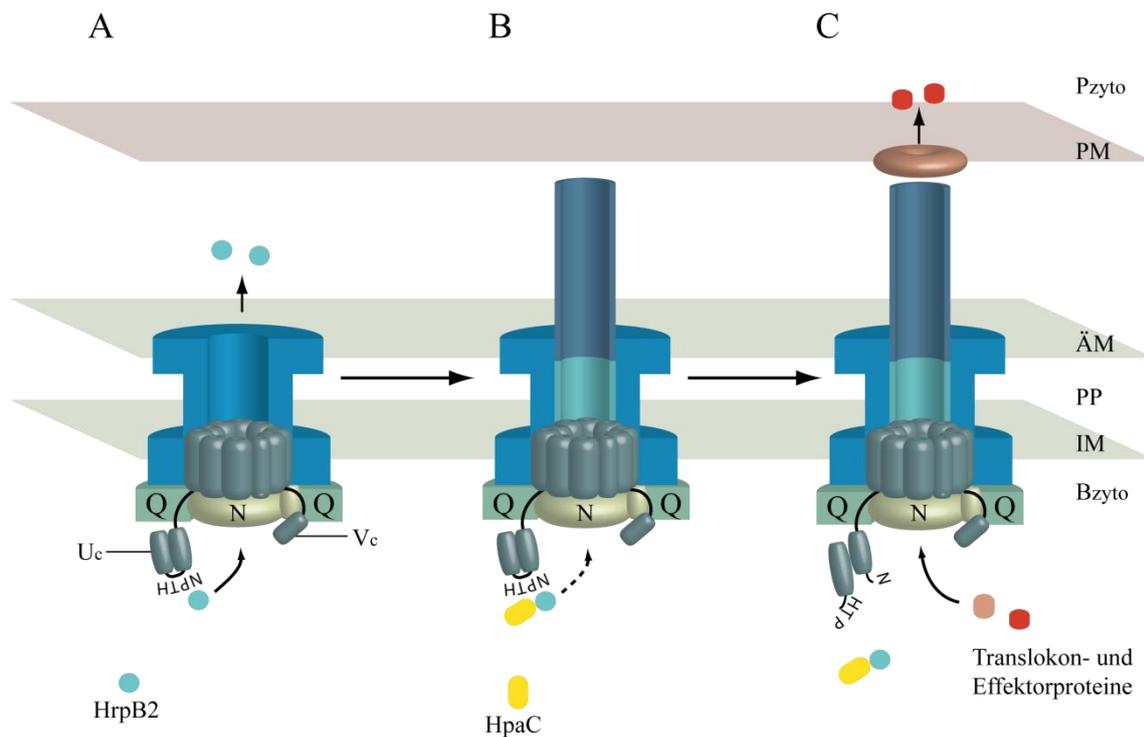
<sup>1</sup> Nach (Lorenz & Büttner, 2011)

<sup>2</sup> GST-Interaktionsstudien mit GST-HrcU-Derivaten und c-Myc-Epitop markierten HrpB2 bzw. HpaC. NA, Nicht analysiert.

<sup>3</sup> *In vitro*-Sekretion des „frühen“ Substrates HrpB2 und der „späten“ Substrate HrpF und AvrBs3; +, Sekretion die mit dem Wildtypprotein vergleichbar ist; +/-, Reduzierte Sekretion im Vergleich zum Wildtypprotein; -, keine Sekretion.

<sup>4</sup> Komplementation des Phänotyps eines 85-10hrpG\* $\Delta$ hrcU-Stammes.

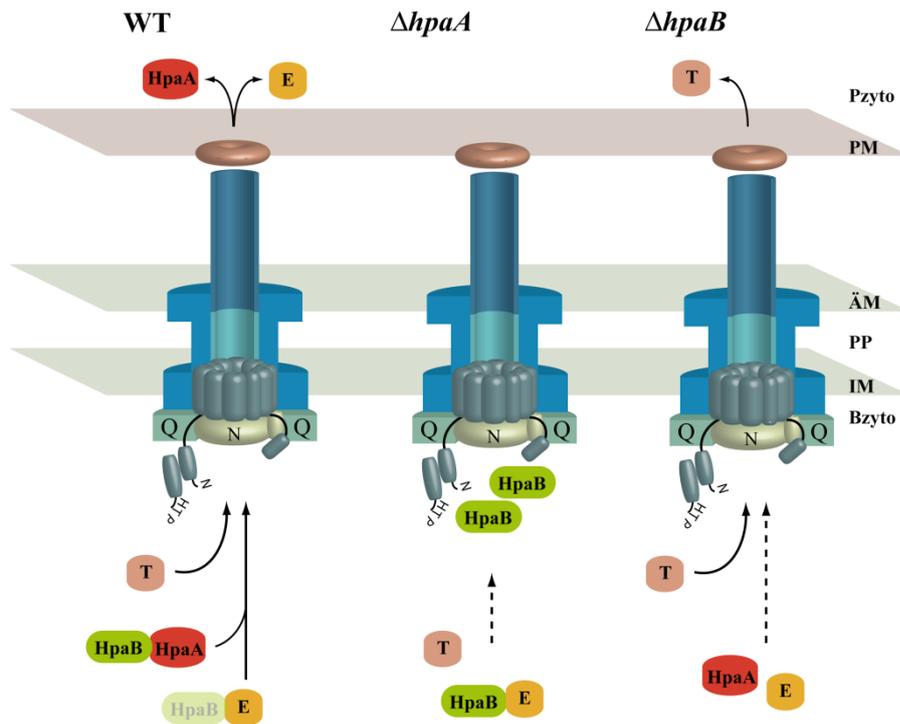
Proteinkomplexes sind, ist es möglich, dass die Interaktion zwischen HpaC und HrcU<sub>C</sub> die Bindung von HrpB2 mit HrcU<sub>C</sub> verhindert, wodurch die HrpB2-Sekretion kontrolliert werden könnte (siehe Abbildung 1.4) (Lorenz & Büttner, 2011, Schulz & Büttner, 2011). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine direkte Interaktion von HpaC mit HrpB2 zur Kontrolle der HrpB2-Sekretion führt. Der Phänotyp einer *hpaC*-Mutante konnte durch das HrcU-Derivat HrcU<sub>Y318D</sub> komplementiert werden, wodurch für HrcU<sub>Y318D</sub> spekuliert wurde, dass dieses Derivat möglicherweise eine veränderte Proteinkonformation aufweist, die der Konformation nach dem Substratspezifitätswechsel entspricht (siehe Kapitel 1.7.2) (Lorenz & Büttner, 2011). Das exakte Ereignis, welches zum Substratspezifitätswechsel führt, ist in *Xcv* noch nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass eine Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> sowie die Spaltung des NPTH-Motivs zur Entlassung der HrcU<sub>C</sub>-gebundenen Proteine HrpB2 und HpaC führt und die Sekretion von Translokatoren und Effektoren aktiviert wird (siehe Abbildung 1.4) (Lorenz & Büttner, 2011). Eine Interaktion von Translokator- oder Effektorproteinen mit HrcU<sub>C</sub> konnte experimentell nicht nachgewiesen werden (Lorenz *et al.*, 2008b, Lorenz & Büttner, 2011), weshalb HrcU<sub>C</sub> möglicherweise keine Substratbindestelle für „späte“ Substrate ist.



**Abbildung 1.4: Modell des Substratspezifitätswechsels in *Xcv*.** A) Nach dem Aufbau eines *prae*-T3S-Systems, welches wahrscheinlich aus dem Basalapparat (blau), Exportapparat (graublau), der T3S-assoziierten ATPase (N) sowie dem vorhergesagten C-Ring besteht (Q), wird möglicherweise das putative „inner rod“-Protein HrpB2 als eines der ersten Substrate über das T3S-System sekretiert. Für die Sekretion von HrpB2 ist vermutlich die Interaktion mit dem konservierten NPTH-Motiv von HrcU<sub>C</sub> essentiell. B) Die effiziente Sekretion von HrpB2 wird durch die Interaktion von HpaC mit HrpB2 und/oder mit HrcU<sub>C</sub> inhibiert. C) Eine Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> und die Spaltung des konservierten NPTH-Motivs führen vermutlich zur Dissoziation HpaC und HrpB2 von HrcU<sub>C</sub> sowie zur Aktivierung der Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PP, Periplasma; PM, Plasmamembran der Wirtszelle; Bzyto, bakterielles Zytoplasma; Pzyto, pflanzliches Zytoplasma. Abbildung nach (Lorenz & Büttner, 2011).

### 1.10.6 Kontrolle der T3S von Translokon- und Effektorproteinen

Das T3S-Chaperon HpaB ist für die Pathogenität von *Xcv* und für die effiziente Sekretion von Effektorproteinen, nicht jedoch von Pilus- und Translokonproteinen essentiell (Büttner *et al.*, 2004, Lorenz *et al.*, 2008a). Translokationsstudien mit der N-terminalen Region von verschiedenen Effektorproteinen in translationaler Fusion mit einem Reporterprotein deuten darauf hin, dass in Abwesenheit von HpaB die Effektorproteine XopC und AvrBs3, aber nicht die Effektoren XopJ und XopF1 in das Zytoplasma von pflanzlichen Zellen transloziert werden (Büttner *et al.*, 2006). Dies führte zur Einteilung der Effektoren in zwei Klassen, wobei die Klasse A Effektoren beinhaltet, die HpaB-abhängig transloziert und die Klasse B Effektoren enthält, die HpaB-unabhängig transloziert werden (Büttner *et al.*, 2006). Die



**Abbildung 1.5: Modell zur Kontrolle der T3S von Translokon- und Effektorproteinen.** (WT) Die Sekretion von Effektorproteinen in einem *Xcv*-Wildtypstamm. HpaB interagiert und fördert die Sekretion des T3S-Kontrollproteins HpaA, nach der Sekretion der Translokonproteine (T). Die Translokation von HpaA führt vermutlich zur Dissoziation der HpaA/HpaB-Interaktion, wodurch HpaB die Sekretion von Effektorproteinen (E) fördern kann. HpaA ist somit möglicherweise das Erste Effektorprotein, welches in die Wirtszelle transloziert wird. ( $\Delta hpaA$ ) Kontrolle der Sekretion von Effektorproteinen in einer  $\Delta hpaA$ -Mutante. In Abwesenheit von HpaA wird die effiziente Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen unterdrückt. Eventuell blockiert HpaB das T3S-System, indem es mit Komponenten des T3S-Systems interagiert. ( $\Delta hpaB$ ) Kontrolle der Sekretion von Effektorproteinen in einer  $\Delta hpaB$ -Mutante. Während die effiziente Sekretion und die Translokation von Klasse A Effektorproteinen in einer  $\Delta hpaB$ -Mutante eingeschränkt ist, werden Translokonproteine sekretiert und sogar transloziert. Die Translokation von Translokonproteinen lässt darauf schließen, dass diese Proteine ein funktionales Translokationssignal besitzen, welches durch HpaB supprimiert wird (Büttner *et al.*, 2004). ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PP, Periplasma; PM, Plasmamembran der Wirtszelle; Bzyto, bakterielles Zytoplasma; Pzyto, pflanzliches Zytoplasma. Abbildung verändert nach (Büttner, 2012).

HpaB-abhängige Translokation von Effektoren ist jedoch nicht von der Interaktion zu HpaB abhängig, da sowohl Klasse A- als auch Klasse B-Effektoren mit HpaB interagierten (Büttner *et al.*, 2004, Büttner *et al.*, 2006). Obwohl durch eine *hpaB*-Mutante die Sekretion und Translokation von Klasse A-Effektoren eingeschränkt war, wurden die Translokonproteine HrpF und XopA transloziert (Büttner *et al.*, 2004). Das T3S-Chaperon HpaB fördert somit nicht nur die Sekretion und Translokation von Effektorproteinen, sondern inhibiert wahrscheinlich auch die Translokation von Translokonproteinen (siehe Abbildung 1.5). Neben HpaB ist die Sekretion von Effektorproteinen ebenfalls von dem T3S-Kontrollprotein HpaA abhängig, welches mit HpaB interagiert und selbst sekretiert sowie transloziert wird (Lorenz *et al.*, 2008a). HpaA stellt somit nicht nur ein T3S-Kontrollprotein dar, sondern auch

ein T3S-Effektorprotein. Die Sekretion bzw. Translokation von HpaA ist vermutlich notwendig, um die Interaktion zwischen HpaA und HpaB aufzuheben, wodurch HpaB die Sekretion von Effektorproteinen fördern kann (siehe Abbildung 1.5). *In vitro*-Sekretionsstudien zeigten, dass durch eine *hpaA*-Mutante, im Vergleich zu einem Wildtypstamm, sowohl Effektorproteine als auch Pilus- und Translokationproteine reduziert sekretiert werden (Lorenz *et al.*, 2008a). In Abwesenheit von HpaA verhindert möglicherweise das nicht mit HpaA gebundene T3S-Chaperon HpaB die effiziente T3S von Pilus-, Translokation- und Effektorproteinen, indem HpaB vermutlich mit Komponenten des T3S-Systems interagiert und somit den Transport von T3S-Substraten einschränkt (siehe Abbildung 1.5) (Lorenz *et al.*, 2008a). Unterstützt wird diese Theorie durch Überexpressionsexperimente mit *hpaB*, die zeigten, dass erhöhte Mengen an HpaB in *Xcv* zu einer Inhibierung der T3S des Effektorproteins AvrBs3 führten (Büttner *et al.*, 2004). *Xcv* transloziert vermutlich mindestens 30 Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle, wo sie mit Wirtszellprozessen interferieren (Büttner & Bonas, 2010). Die Funktion der Effektoren kann sehr unterschiedlich sein. Während AvrBs3 als Transkriptionsfaktor im Zellkern der Wirtszelle an die Promotoren der sogenannten „up-regulated by AvrBs3“-Gene (*upa*-Gene) bindet, was zur Expression dieser *upa*-Gene führt (Kay *et al.*, 2007, Kay *et al.*, 2009), wurde für das Effektorprotein XopB eine Involvierung in den eukaryotischen Vesikeltransport beschrieben (Schulze *et al.*, 2012). Für das Effektorprotein XopL konnte hingegen eine E3-Ligaseaktivität nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass Effektorproteine zur Ubiquitinierung von eukaryotischen Proteinen beitragen können (Singer *et al.*, 2013). Effektorproteine aus *Xcv* können jedoch auch mit Signalkaskaden oder dem Proteasom-abhängigen Proteinabbau interferieren, um die pflanzliche Abwehr zu supprimieren (Taylor *et al.*, 2012, Teper *et al.*, 2013, Ustun *et al.*, 2013).

### 1.11 Zielstellung dieser Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit standen die Proteine HrcQ, HrcU und HrpB1. Die vorhergesagte C-Ringkomponente HrcQ ist ein Vertreter der YscQ-Proteinfamilie, die vermutlich an der Rekrutierung von T3S-Substraten beteiligt sind. In Vorarbeiten wurden alle für diese Arbeit benötigten HrcQ-Konstrukte erstellt und gezeigt, dass HrcQ eine essentielle Komponente des T3S-Systems ist, die mit weiteren Komponenten des T3S-Systems und T3S-Substraten interagiert (Christian Lorenz, veröffentlicht in Publikation I). Durch *in vitro*-Sekretions- und *in vitro*-Interaktionsstudien sollten weitere Interaktionspartner identifiziert und die Interaktion mit bekannten Interaktionspartnern verifiziert sowie analysiert werden, ob HrcQ über das T3S-System sekretiert wird. Fraktionierungsstudien sollten ferner bestätigen, dass HrcQ unter Sekretions-induzierenden Bedingungen mit Membranen assoziieren kann, wie es für die T3S-assoziierte ATPase und ihrem putativen Regulator aus *Xcv* gezeigt wurde. Neben HrcQ sollte in dieser Arbeit auch die zytoplasmatische Domäne der IM-Komponente HrcU (HrcU<sub>C</sub>), welche am Wechsel der Substratspezifität des T3S-Systems beteiligt ist, näher charakterisiert werden. Bisher wurde der Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in dem konservierten NPTH-Motiv sowie an der Aminosäureposition 318 in HrcU<sub>C</sub> auf die Proteinfunktion ausführlicher untersucht (Lorenz & Büttner, 2011). Durch die Analyse von HrcU-Derivaten, die Deletionen, Insertionen oder Aminosäuresubstitutionen enthielten, sollten mittels Infektions-, *in vitro*-Sekretions- und *in vitro*-Interaktionsstudien weitere Bereiche in HrcU<sub>C</sub> identifiziert werden, welche für die Funktion von HrcU von Bedeutung sind. Während HrcU am Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt ist, konnte bis heute für HrpB1 noch keine nähere Funktion ermittelt werden. In vorangegangenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass HrpB1 nicht sekretiert und essentiell für die Ausbildung der extrazellulären Pilusstruktur ist. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit, durch Subfraktionierungsstudien und *in vitro*-Interaktionsstudien die Lokalisierung von HrpB1 untersucht sowie T3S-Komponenten identifiziert werden die mit HrpB1 interagieren. Die Analyse von HrpB1-Derivaten sollte weiterhin Aufschluss geben, welche Bereiche in HrpB1 für die Proteinfunktion von Bedeutung sind. Die strukturelle Ähnlichkeit von HrpB1 zu einem Bereich der lytischen Transglykosylase Slt70 aus *E. coli*, welcher vermutlich für die Interaktion mit Peptidoglykan wichtig ist, lässt vermuten, dass HrpB1 mit Peptidoglykan interagieren kann. Deshalb sollte HrpB1 auf die Fähigkeit untersucht werden mit Peptidoglykan zu interagieren. Um die weitere Charakterisierung von Genen des *hrp*-Genclusters zu erleichtern, sollte ein modulares System entwickelt werden, welches es erlaubt das *hrp*-Gencluster aus den einzelnen *hrp*-Genen zu assemblieren. Durch dieses System können effizient und gleichzeitig vielfältige Mutationen in das *hrp*-Gencluster eingebracht werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 HrcQ ist eine Substratbindestelle für T3S-Substrate

#### 2.1.1 Publikation I: „HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*“

OPEN ACCESS Freely available online



## HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*

Christian Lorenz<sup>‡</sup>, Jens Hausner, Daniela Büttner\*

Institute of Biology, Genetics Department, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

### Abstract

Pathogenicity of many Gram-negative bacteria depends on a type III secretion (T3S) system which translocates bacterial effector proteins into eukaryotic cells. The membrane-spanning secretion apparatus is associated with a cytoplasmic ATPase complex and a predicted cytoplasmic (C) ring structure which is proposed to provide a substrate docking platform for secreted proteins. In this study, we show that the putative C ring component HrcQ from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is essential for bacterial pathogenicity and T3S. Fractionation studies revealed that HrcQ localizes to the cytoplasm and associates with the bacterial membranes under T3S-permissive conditions. HrcQ binds to the cytoplasmic T3S-ATPase HrcN, its predicted regulator HrcL and the cytoplasmic domains of the inner membrane proteins HrcV and HrcU. Furthermore, we observed an interaction between HrcQ and secreted proteins including early and late T3S substrates. HrcQ might therefore act as a general substrate acceptor site of the T3S system and is presumably part of a larger protein complex. Interestingly, the N-terminal export signal of the T3S substrate AvrBs3 is dispensable for the interaction with HrcQ, suggesting that binding of AvrBs3 to HrcQ occurs after its initial targeting to the T3S system.

**Citation:** Lorenz C, Hausner J, Büttner D (2012) HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. PLoS ONE 7(11): e51063. doi:10.1371/journal.pone.0051063

**Editor:** Eric Cascales, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, France

**Received:** July 26, 2012; **Accepted:** October 29, 2012; **Published:** November 30, 2012

**Copyright:** © 2012 Lorenz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU 2145/5-1; Sonderforschungsbereich SFB 648) to D.B. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: daniela.buettner@genetik.uni-halle.de

‡ Current address: Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

### Introduction

Many Gram-negative pathogenic bacteria employ a type III secretion (T3S) system to translocate effector proteins into eukaryotic cells. T3S systems are conserved among plant and animal pathogenic bacteria and are evolutionarily related to the bacterial flagellum, which is the key bacterial motility organelle and hereafter is referred to as flagellar T3S system [1,2,3]. Electron microscopy studies of isolated flagellar and translocation-associated T3S systems from *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri*, respectively, revealed that the membrane-spanning portions of both T3S systems share a similar architecture consisting of ring structures in the inner membrane (IM) and outer membrane (OM) [4-9]. These architectural similarities are reflected by homologies in the amino acid sequences of at least eight components of the secretion machinery that presumably constitute the core structural elements of the T3S system. In translocation-associated T3S systems the nomenclature of these proteins refers to the Ysc proteins from the animal pathogenic bacterium *Yersinia* [10]. They include three cytoplasmic proteins (YscL, N and Q), five IM proteins (YscR, S, T, U and V) and the OM secretin (YscC), which is absent from flagellar T3S systems.

The membrane-spanning portions of flagellar and translocation-associated T3S systems are associated with extracellular appendages including the flagellar hook and filament as well as the pilus (in plant pathogenic bacteria; up to 2 µm long) or needle (in animal pathogenic bacteria; 40-80 nm long) of translocation-associated T3S systems [11]. The pilus and needle are essential for

T3S and presumably provide protein transport channels to the host-pathogen interface. They are directly or indirectly connected to the T3S translocon, which is a predicted oligomeric protein channel in the host plasma membrane and mediates effector protein translocation into the host cell [12-14].

One of the model systems to study T3S is the Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, which causes bacterial spot disease of pepper and tomato plants. The T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria* translocates approximately 30 to 40 effector proteins into the plant cell where they interfere with host cellular processes such as gene expression, signal transduction cascades and the suppression of host defense responses to the benefit of the pathogen [15]. Effector protein translocation is activated *in planta* by a yet unknown signal and depends on the chromosomal *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster, which encodes the components of the T3S system [15,16]. Mutant studies with individual *hrp* genes revealed that efficient T3S does not only depend on predicted components of the T3S system but also on control proteins – designated Hpa (Hrp associated) – that presumably regulate T3S substrate specificity and recognition. Among the control proteins is the general T3S chaperone HpaB which binds to and promotes the efficient secretion and translocation of multiple effector proteins [17-19]. HpaB presumably targets effector proteins to the ATPase HrcN of the T3S system which can dissociate HpaB-effector protein complexes and thus might facilitate the entry of effector proteins into the inner channel of the T3S system [20].

In addition to HpaB, the efficient translocation of effector proteins depends on HpaC, which is a T3S substrate specificity switch (T3S4) protein. HpaC promotes the secretion of translocon and effector proteins but suppresses the efficient secretion of HrpB2, which is required for T3S pilus formation [21-23]. Given the architecture of the T3S system, pilus assembly likely occurs prior to the secretion of translocon and effector proteins, suggesting that the substrate specificity of the T3S system switches from “early” to “late” substrates [14,24,25]. The switch is mediated by T3S4 proteins that interact with the cytoplasmic domains of members of the YscU family of IM proteins. It was proposed that T3S4 proteins induce a conformational change in the cytoplasmic domains of YscU family members that leads to an alteration in substrate recognition [3,14,24]. In agreement with this model, HpaC interacts with the C-terminal domain of the YscU homolog HrcU (HrcU<sub>C</sub>). Furthermore, the *hpaC* mutant phenotype can be suppressed by a point mutation in HrcU<sub>C</sub> that likely mimicks the predicted conformational change [21,26]. HrcU<sub>C</sub> interacts with HrpB2, suggesting that it provides a docking site for early T3S substrates. However, an interaction between HrcU<sub>C</sub> and late T3S substrates has not yet been observed [21]. It is therefore still unclear how late substrates are recognized by the T3S system.

In the present study, we analyzed a possible contribution of the YscQ homolog HrcQ to T3S and substrate docking. HrcQ belongs to the family of putative cytoplasmic (C) ring components of the T3S system that are proposed to form a cup-like structure with a diameter of approximately 40 nm. The predicted C ring of translocation-associated T3S systems has not yet been visualized because it presumably easily disconnects from the membrane-spanning secretion apparatus during the purification procedure. However, the C ring was visualized by electron microscopy of isolated flagellar T3S systems [27,28]. Flagellar C rings consist of three proteins (FliG, M and N) that connect the C ring to the IM components of the T3S system such as the ATPase complex or the ring components in the IM [4,27-31]. FliM and FliN share amino acid sequence similarities with predicted C ring components of translocation-associated T3S systems. Given the finding that YscQ and homologous proteins from animal pathogenic bacteria interact with effector proteins or effector-chaperone complexes, the predicted C ring of translocation-associated T3S systems was proposed to act as a recruitment platform for secreted proteins [32,33]. We therefore investigated the contribution of HrcQ from *X. campestris* pv. *vesicatoria* to T3S and substrate binding. Mutant and protein studies revealed that HrcQ is an essential component of the T3S system and associates with the bacterial membranes under T3S-permissive conditions. *In vitro* pull-down assays showed that HrcQ interacts with conserved components of the T3S system at the IM including the IM proteins HrcV and HrcU, the ATPase HrcN and its predicted regulator HrcL. Furthermore, HrcQ binds to early and late T3S substrates and therefore is likely involved in T3S substrate recognition. Interestingly, the analysis of derivatives of the effector protein AvrBs3 suggests that the N-terminal T3S and translocation signal is dispensable for the interaction of AvrBs3 with HrcQ.

## Materials and Methods

### Bacterial Strains and Growth Conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* cells were grown at 37°C in lysogeny broth (LB) or Super medium (Qiagen, Hilden, Germany). *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were cultivated at 30°C in nutrient-yeast-germol (NYG) medium [47] or in minimal medium A [48]

supplemented with sucrose (10 mM) and casamino acids (0.3%). Plasmids were introduced into *E. coli* by transformation and into *X. campestris* pv. *vesicatoria* by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings [49]. Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampicin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml; gentamycin, 7.5 µg/ml.

### Plant Material and Plant Inoculations

The near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW) and ECW-10R [50,51] were grown as described previously [52]. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were inoculated with a needle-less syringe into the intercellular spaces of leaves at concentrations of  $2 \times 10^8$  colony-forming units (CFU) ml<sup>-1</sup> in 1 mM MgCl<sub>2</sub> if not stated otherwise. The appearance of disease symptoms and the HR were scored over a period of one to nine days post inoculation (dpi). For the better visualization of the HR, leaves were bleached in 70% ethanol. Experiments were repeated at least two times. For *in planta* growth curves, bacteria were inoculated at a density of  $10^4$  CFU/ml into leaves of susceptible ECW plants. Bacterial counts were determined over a period of 11 dpi as described [52].

### Generation of Expression Plasmids

For the generation of *hrcQ* expression constructs, *hrcQ* with or without stop codon was amplified by PCR from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 and cloned into the Golden Gate-compatible expression vector pBRM using the type II restriction enzyme *BsaI* in a single restriction/ligation reaction [53]. The broad host-range vector pBRM is a derivative of plasmid pBBR-MCS5 and allows the expression of genes under control of the *lac* promoter in frame with a 3 × c-Myc epitope-encoding sequence. Alternatively, we cloned *hrcQ* including its native promoter (299 bp upstream of the translation initiation codon GTG) into plasmid pBRM-P, which is a derivative of pBRM that lacks the *lac* promoter (Table 1). To obtain GST fusion constructs, *hrcQ* and *xopJ* were amplified by PCR from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 and cloned into the *EcoRI/XhoI* sites of vector pGEX, in frame with a GST-encoding sequence. Primer sequences are available upon request.

### Construction of *X. campestris* pv. *vesicatoria* Deletion Mutants

For the generation of a genomic *hrcQ* deletion mutant, 700-bp and 750-bp regions flanking *hrcQ* and spanning part of the 5'- and 3'- region of *hrcQ* were amplified by PCR and cloned into the *BamHI* and *ApaI* sites of plasmid pOK1. The resulting construct pOKΔ*hrcQ* was conjugated into strains 85-10 and 85\*. Double cross-overs resulted in strains 85-10Δ*hrcQ* and 85\*Δ*hrcQ* that were selected as described previously [44] and contain a deletion of codons 11 to 243 of *hrcQ* followed by a nonsense mutation.

### Construction of the Suicide Vector pLAND-P

To generate plasmid pLAND-P, we amplified 850- and 770-bp fragments spanning *hpaF* and the 5'-region of *hpaG* as well as the 3'-region of *hpaG*, respectively, by primers *hpaF*-for (5'-TTTGGTCTCTCATGCATGCGGCGATGGCAGTC-3', *hpaF*-rev (5'-TTTGGTCTCTAGACCCCATGGCAGCGA-GAGGTTGCCAAG), *hpaG*-for (5'-TTTGGTCTCTGTCCTAATTATCGTTGAGCTGAGCAG-3') and *hpaG*-rev (5'-TTTGGTCTCTGATCCTCCTGCGTGTGCATG-3'). PCR amplicons were digested with *BsaI* (restriction sites are underlined in primer sequences, overhangs are written in italics) and ligated into the *BamHI* and *NcoI* sites of the suicide vector pOK1, thus generating pOKh-

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
<b><i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i></b>		
85-10	Pepper-race 2; wild type; Rif <sup>r</sup>	[51,73]
85-10Δ <i>hrcQ</i>	<i>hrcQ</i> deletion mutant of strain 85-10	This study
85-10Δ <i>hrcQ</i> :: <i>hrcQ</i>	Derivative of strain 85-10Δ <i>hrcQ</i> carrying <i>hrcQ-c-myc</i> under control of the native promoter inserted into the <i>hpaFG</i> region	This study
85*	85-10 derivative containing the <i>hrpG</i> * mutation	[34]
85*Δ <i>hrcQ</i>	<i>hrcQ</i> deletion mutant of strain 85*	This study
85*Δ <i>hrcQ</i> :: <i>hrcQ</i>	Derivative of strain 85*Δ <i>hrcQ</i> carrying <i>hrcQ-c-myc</i> under control of the native promoter inserted into the <i>hpaFG</i> region	This study
<b><i>E. coli</i></b>		
BL21 (DE3)	F <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, Germany
Top10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araU) 7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DH5α	F <i>recA hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) Φ80dlacZ ΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.
DH5α λpir	F <i>recA hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) Φ80dlacZ ΔM15 [λpir]α</i>	[74]
<b>Plasmids</b>		
pBlueskript(II) KS	Phagemid, pUC derivative; Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pBRM	Golden Gate-compatible derivative of pBBR1MCS-5 for <i>lac</i> promoter-driven gene expression; contains a 3 × c-Myc epitope-encoding sequence	[75]
pBRM-P	Derivative of pBRM without <i>lac</i> promoter	This study
pBRMhrcN	pBRM derivative encoding HrcN-c-Myc	[75]
pBRMhrcQ	pBRM derivative encoding HrcQ-c-Myc	This study
pBRMhrcQ <sub>Stop</sub>	pBRM derivative encoding HrcQ	This study
pBRM-PhrcQ	pBRM-P derivative containing <i>hrcQ-c-myc</i> and 299 bp upstream region	This study
pBRM-PhrcQ <sub>Stop</sub>	pBRM-P derivative containing <i>hrcQ</i> and 299 bp upstream region	This study
pBRMhrcV	pBRM derivative encoding HrcV-c-Myc	N. Hartmann and D. Büttner, unpublished
pBRMhrcV <sub>324-645</sub>	pBRM derivative encoding HrcV <sub>324-645</sub> -c-Myc	N. Hartmann and D. Büttner, unpublished
pBRMxopJ	pBRM derivative encoding XopJ-c-Myc	[26]
pDGW4MhpaA	Derivative of pDGW4M encoding HpaA-c-Myc	[80]
pDMhrcL	Derivative of pDSK602 encoding HrcL-c-Myc	[20]
pGEX-2TKM	GST expression vector; p <sub>tac</sub> GST <i>lacI<sup>d</sup></i> pBR322 <i>ori</i> ; Ap <sup>r</sup> , derivative of pGEX-2TK with polylinker of pDSK604	Stratagene [38]
pGhpaA	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HpaA	[76]
pGhpaB	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HpaB	[18]
pGhpaC	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HpaC	[18]
pGhrpB2	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrpB2	[62]
pGhrpE	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrpE	[55]
pGhrcL	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcL	[20]
pGhrcN	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcN	[76]
pGhrcQ	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcQ	This study
pGhrcU	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU	[21]
pGhrcU <sub>255-357</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357</sub>	[21]
pGxopA	pGEX-2TKM derivative encoding GST-XopA	[17]
pGxopJ	pGEX-2TKM derivative encoding GST-XopJ	This study
pGxopF1	pGEX-2TKM derivative encoding GST-XopF1	[18]
pG300	pGEX-2TKM derivative encoding GST-AvrBs3	[77]
pG356F	pGEX-2TKM derivative encoding GST-AvrBs3Δ2 which lacks the N-terminal 152 amino acids	[17]
pGavrBs350	pGEX-2TKM derivative encoding GST-AvrBs3 <sub>1-50</sub>	[17]
pLAND-P	Derivative of pOK1 carrying fragments of the <i>hpaFG</i> region flanking <i>lacZ</i> , This study the <i>lac</i> promoter and a triple c-Myc epitope-encoding sequence	This study

paFG. The ligation reaction led to a mutation in the internal *NcoI* site of pOK1 and to the generation of a *BsaI* and *NcoI* site between both ligated amplicons. Next, we amplified the *lacZ* gene including the *lac* promoter and the 3× c-Myc epitope-encoding sequence from plasmid pBRM-P using primers lacZ-P-for (5'-TTTCGTCTCTAATTTCAGAGACCGCAGCTGGCACGACAG-3') and Myc-rev (5'-TTTCGTCTCTCATGGTCAGTTCAGTCTTCTTC-3'). The amplicon was digested with *Esp3I* and ligated into the *BsaI/NcoI*-digested pOKhpaFG, resulting in pLAND-P. The introduction of a *BsaI* site by primer lacZ-P-for and the presence of a *BsaI* site upstream of the 3× c-Myc epitope-encoding sequence allows the targeted ligation of genes of interest in the opposite orientation of the *hpaFG* transcription. To generate pLAND-PhrcQ, *hrcQ* including its native promoter was amplified and cloned into pLAND-P in a single restriction/ligation reaction using *BsaI* and ligase.

### Glutathione S-transferase (GST) Pull-down Assays

For GST pull-down assays, GST and GST fusion proteins were synthesized in *E. coli* BL21(DE3). Bacterial cells from 50 ml cultures were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and broken with a French press. Insoluble cell debris were removed by centrifugation, and soluble GST and GST fusion proteins were immobilized on a glutathione sepharose matrix according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Munich, Germany). Unbound proteins were removed by washing twice with PBS, and the glutathione sepharose matrix was incubated with 600 µl *E. coli* cell lysates containing the putative interaction partners for 1 to 2 h at 4°C. Unbound proteins were removed by washing four times with PBS and bound proteins were eluted with 10 mM reduced glutathione at room temperature for 2 h. 10 µl total protein lysates and 20 µl eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies specific for the c-Myc epitope and GST, respectively (Roche Applied Science, Mannheim, Germany; GE Healthcare) [22]. Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse and anti-goat antibodies (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Antibody reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

### Generation of Polyclonal HrcQ Antibodies

For the generation of HrcQ antibodies, rabbits were immunized with a HrcQ-specific peptide (AEVIAFERDAEPDD, amino acids 82 to 95) (Biogenes, Berlin, Germany). The serum after the second booster injection was used for immunoblot analysis.

### Protein Secretion Studies and Immunoblot Analysis

T3S assays were performed as described previously [54]. Briefly, bacteria were incubated in secretion medium and equal amounts of bacterial total cell extracts and culture supernatants were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. We used polyclonal antibodies specific for HrpF [55], HrpB2 [22] and HrcQ (this study), and monoclonal anti-c-Myc (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and anti-GST antibodies (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibodies (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Experiments were repeated at least two times. Blots were routinely reacted with an antibody specific for the intracellular proteins HrcN or HrcJ to ensure that no bacterial lysis had occurred [22] (data not shown).

### Subcellular Localisation Studies

For subcellular localization of proteins, bacteria were grown overnight in minimal medium A supplemented with sucrose and

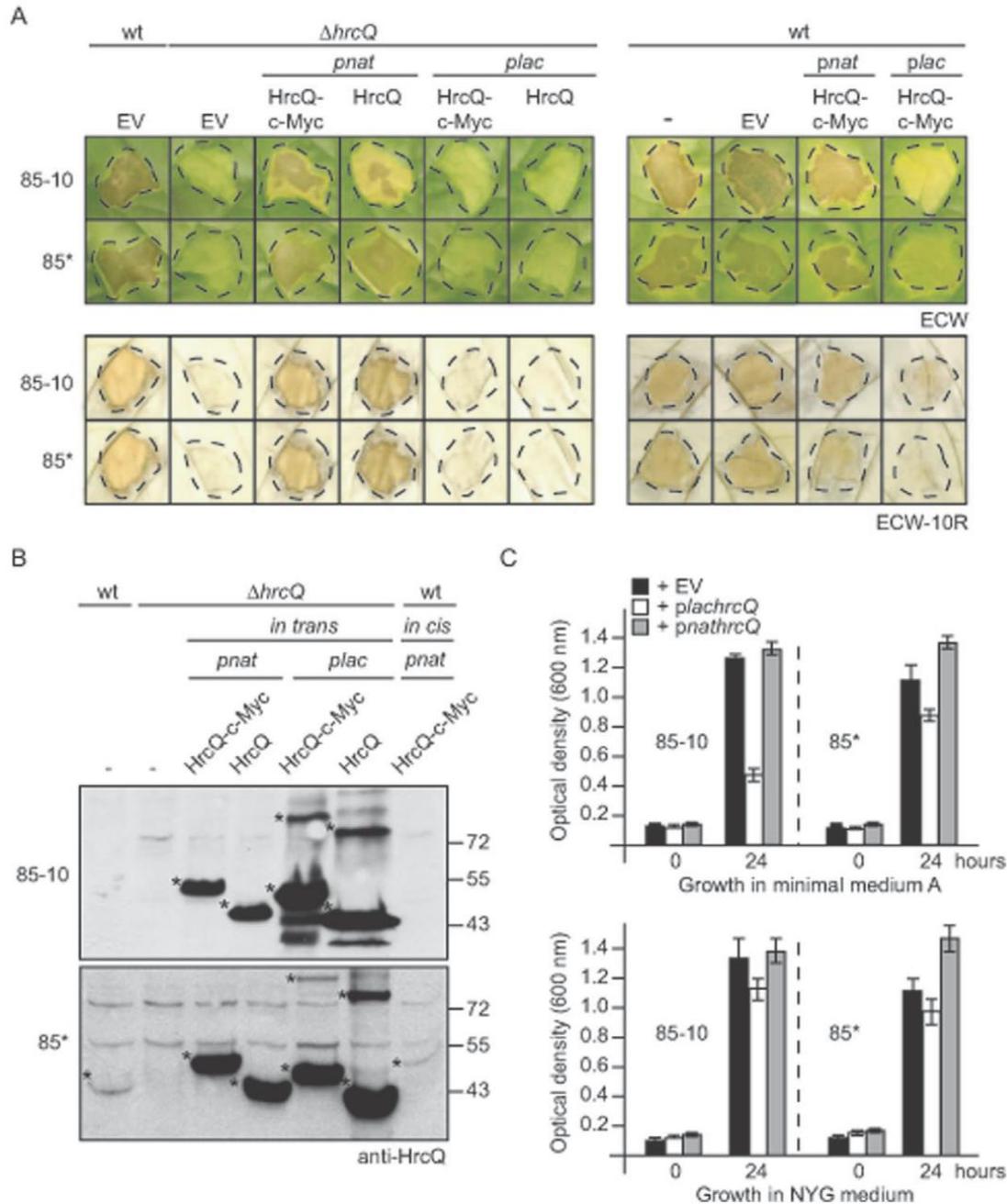
casamino acids. Bacterial cells from 50 ml cultures were resuspended in 3 ml 100 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) and lysed with a French press. Cell debris were removed by centrifugation and 1 ml of each lysate was centrifuged at 200,000 g for 90 minutes at 4°C. Similar protein levels were adjusted according to OD<sub>600</sub>. The pellet, which corresponds to the membrane fraction, was resuspended in 1 ml 100 mM HEPES. Membrane and soluble fractions were mixed with Laemmli buffer and 20 µl total bacterial lysate, membrane and soluble fractions were analyzed by SDS-PAGE, Coomassie staining (data not shown) and immunoblotting.

## Results

### HrcQ from *X. campestris* pv. *vesicatoria* is Essential for Pathogenicity and T3S

*hrcQ* from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 is the first gene of the *hrpD* operon of the *hrp* gene cluster and encodes a predicted protein of 304 amino acids that is conserved in *Xanthomonas* spp. (91 to 93% amino acid identity with HrcQ proteins from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *X. axonopodis* pv. *glycines*; 76% amino acid identity with HrcQ from *X. campestris* pv. *campestris*). The C-terminal portion of HrcQ shares weak sequence similarity (27 to 33% amino acid sequence identity) with members of the YscQ protein family from animal pathogenic bacteria. To study the contribution of HrcQ to pathogenicity of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, we generated a *hrcQ* deletion mutant carrying an in-frame deletion of codons 11 to 243 followed by a nonsense mutation. The *hrcQ* deletion was introduced into the genome of the wild-type strain 85-10 and its derivative 85-10/*hrpG*\* (85\*), which contains HrpG\*, a constitutively active version of the key regulatory protein HrpG. HrpG\* activates – in most cases via the transcriptional regulator HrpX – the expression of a genome-wide regulon including *hrp*, putative virulence and effector genes [19,34–36].

For infection studies, *hrcQ* wild-type and deletion mutant strains were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. ECW-10R plants carry the *BsI* resistance gene and induce the hypersensitive response (HR) upon recognition of the type III effector AvrBs1, which is delivered by strain 85-10 [37,38]. The HR is a rapid local cell death at the infection site that restricts bacterial ingress and is activated upon detection of individual bacterial effector proteins (also designated Avr [avirulence] proteins) by the plant surveillance system [39]. As expected, strains 85-10 and 85\* induced disease symptoms in ECW and the HR in ECW-10R pepper plants whereas no reactions were observed for the respective *hrcQ* deletion mutants (Fig. 1A). Ectopic expression of HrcQ-c-Myc or untagged HrcQ derivatives under control of the native promoter (see Materials and Methods) complemented the mutant phenotype of strain 85\* $\Delta$ *hrcQ* with respect to HR induction and disease symptoms when the bacteria were inoculated at densities of 10<sup>8</sup> CFU/ml. At lower inoculation densities, however, expression of *hrcQ* from the native promoter only partially restored symptom formation (Fig. S1). This was also observed in strain 85-10/ $\Delta$ *hrcQ*, even with higher inoculation densities (Fig. 1A; data not shown). To confirm that HrcQ derivatives were stably synthesized, protein extracts of bacterial cells grown in minimal medium were analyzed by immunoblotting, using HrcQ-specific antibodies. As expected, *lac* promoter-driven expression of *hrcQ* and *hrcQ-c-myc* led to increased protein amounts when compared with *hrcQ* derivatives expressed under control of the native promoter in strain 85-10/ $\Delta$ *hrcQ*. The amounts of the native HrcQ protein were significantly lower and



**Figure 1. HrcQ contributes to bacterial pathogenicity and *in planta* growth.** (A) Ectopic expression of *hrcQ* under control of the native promoter partially restores pathogenicity of *hrcQ* deletion mutant strains. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 (wt), 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ), 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) without expression construct (-) or carrying plasmid pBRM (EV) or derivatives thereof expressing *hrcQ* or *hrcQ-c-myc* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Bacterial strains in the left panel (complementation studies) were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>, strains in the right panel (analysis of dominant-negative effects) at a density of  $2 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Disease symptoms were photographed 8 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. (B) Immunodetection of HrcQ and HrcQ-c-Myc. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 (wt), 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ), 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) without expression construct (-) or encoding HrcQ or HrcQ-c-Myc *in trans* or *in cis* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were grown in minimal medium A. Equal amounts of total cell extracts were analyzed by immunoblotting, using HrcQ-specific antibodies. HrcQ-specific signals are marked with asterisks, additional signals result from unspecific binding of the antibodies. The HrcQ-specific signals above 72 kDa presumably correspond to HrcQ protein complexes that were not dissociated by SDS-PAGE. (C) Overexpression of *hrcQ* leads to reduced bacterial *in vitro* growth. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 and 85\* carrying plasmid pBRM (EV) or expressing *hrcQ-c-myc* under control of the *lac* (*plachrcQ*) or the native (*pnathrcQ*) promoter were grown over night in

complex NYG medium and resuspended in minimal medium A or NYG medium at an optical density ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) of 0.2. The cultures were incubated at 30°C and the optical density was measured over a period of 24 h. Error bars represent standard deviations.  
doi:10.1371/journal.pone.0051063.g001

were only detectable in protein extracts of strain 85\* which constitutively expresses the *hrp* genes (Fig. 1B).

We also introduced an expression construct encoding a C-terminally c-Myc epitope-tagged derivative of the ATPase HrcN under control of the *lac* promoter into strains 85-10 $\Delta$ *hrcQ* and 85\* $\Delta$ *hrcQ*. It was previously shown that the phenotype of flagellar C ring mutants can be partially suppressed upon ectopic expression of the ATPase-encoding gene *flhI* or upon upregulation of the regulatory genes *flhDC* [40,41]. Notably, however, expression of *hrcN-c-myc* did not alter the *hrcQ* deletion mutant phenotype (Fig. S2). This was probably not caused by a potential negative effect of elevated HrcN levels because we have previously shown that overexpression of *hrcN* in strain 85-10 does not alter the wild-type *in planta* phenotype [20]. We therefore conclude that the loss of *hrcQ* cannot be counteracted by elevated levels of the T3S-ATPase.

### Overexpression of *hrcQ* Exerts a Dominant-negative Effect on Pathogenicity and *in vitro* Bacterial Growth

Given the lack of complementation of the *hrcQ* mutant phenotype by *lac* promoter-driven expression of *hrcQ*, we analyzed whether the overexpression of *hrcQ* is detrimental for pathogenicity. For this, the wild-type strain 85-10 carrying plasmid pBRM or *hrcQ* expression constructs was inoculated into susceptible and resistant pepper plants. Fig. 1A shows that the expression of *hrcQ-c-myc* under control of the native promoter did not significantly interfere with pathogenicity of strain 85-10. By contrast, the *lac* promoter-driven expression of *hrcQ-c-myc* led to severely reduced plant reactions (Fig. 1A). Similar phenotypes were observed with derivatives of strain 85\*, suggesting that the dominant-negative effect of *hrcQ* overexpression could not be counteracted by the constitutive expression of T3S genes (Fig. 1A).

To investigate whether the ectopic expression of *hrcQ* exerts a general negative effect on bacterial fitness, we also analyzed bacterial growth *in vitro*. When strains 85-10 and 85\* carrying plasmid pBRM or *hrcQ* expression constructs were grown in minimal medium, the overexpression of *hrcQ* from the *lac* promoter led to a significant reduction of bacterial growth (Fig. 1C). This was also observed when bacteria were grown in complex medium NYG. However, the negative effect of *hrcQ* overexpression was less pronounced in NYG than in minimal medium, suggesting that the interference of increased HrcQ levels with bacterial fitness also depends on the culture medium (Fig. 1C).

### HrcQ is Essential for T3S *in vitro*

To investigate a potential influence of HrcQ on T3S *in vitro*, strains 85\* and 85\* $\Delta$ *hrcQ* were incubated in secretion medium. Total cell extracts and culture supernatants were analyzed by immunoblotting, using specific polyclonal antisera against the translocon protein HrpF and the early T3S substrate HrpB2, respectively. As expected, HrpF and HrpB2 were secreted by strain 85\* but were not detectable in the supernatant of strain 85\* $\Delta$ *hrcQ*, suggesting that HrcQ is essential for T3S (Fig. 2A). The secretion deficiency was partially complemented by ectopic expression of *hrcQ-c-myc* under control of the native but not of the *lac* promoter (Fig. 2A).

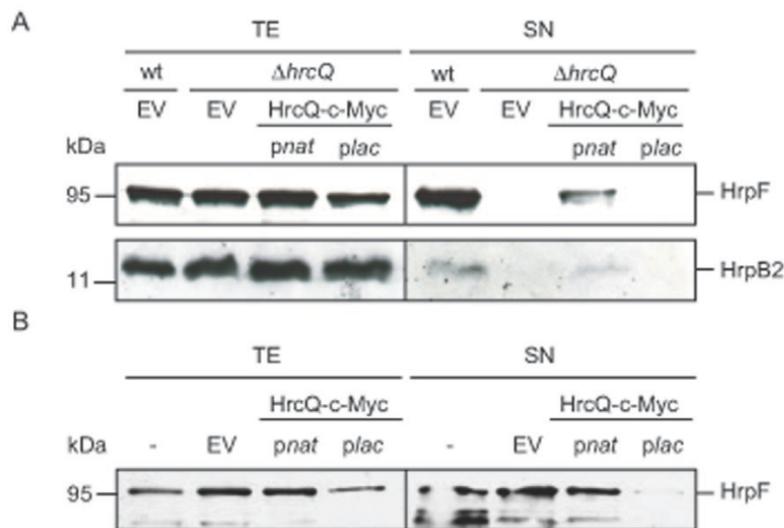
To test a possible negative effect of *hrcQ* overexpression on T3S, we performed additional secretion assays with strain 85\* carrying pBRM or *hrcQ* expression constructs. The analysis of culture

supernatants by immunoblotting revealed that the *lac* promoter-driven expression of *hrcQ-c-myc* in strain 85\* interfered with the efficient secretion of the translocon protein HrpF (Fig. 2B). By contrast, expression of *hrcQ-c-myc* under control of the native promoter did not significantly affect HrpF secretion (Fig. 2B). This is in agreement with the results of the infection experiments (see above) and suggests that the *lac* promoter-driven expression of *hrcQ* derivatives exerts a negative effect on T3S and pathogenicity.

### Insertion of *hrcQ* into a Genomic "Landing Platform" Fully Restores Pathogenicity of the *hrcQ* Deletion Mutant

The negative effect of increased HrcQ levels prompted us to perform additional complementation studies with *hrcQ* deletion strains in which *hrcQ* was expressed *in cis* under control of the native promoter. For this, *hrcQ* was inserted into the genomic *hpaF-hpaG* locus in the flanking region of the *hrp* gene cluster by homologous recombination. *hpaF* and *hpaG* encode proteins with homology to the N- and C-terminal regions, respectively, of the leucine-rich repeat-containing effector protein XopAE from *Xanthomonas* spp. It was previously shown that mutations in the *hpaFG* region do not significantly interfere with bacterial pathogenicity [42,43]. For the insertion of *hrcQ* into the *hpaFG* region of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, we generated a novel Golden Gate-compatible suicide vector (pLAND-P; see Materials and Methods) that contains fragments of *hpaF* and *hpaG* flanking the *lacZ* gene and a triple c-Myc epitope-encoding sequence. Two recognition sites for the type II restriction enzyme *BsaI* upstream and downstream of *lacZ* allowed the targeted insertion of genes by a Golden Gate reaction (see Materials and Methods) in the opposite orientation to the direction of the *hpaFG* transcription which excludes that their expression is controlled by the *hpaFG* promoter (Fig. S3). *hrcQ* including its native promoter was cloned into pLAND-P and inserted into the *hpaFG* region of strains 85-10 $\Delta$ *hrcQ* and 85\* $\Delta$ *hrcQ*, respectively, by homologous recombination as was described previously [44]. Immunoblot analysis of bacterial protein extracts showed that chromosomal *hrcQ-c-myc* was expressed in strain 85\* $\Delta$ *hrcQ*:*hrcQ-c-myc* and that the amounts of HrcQ-c-Myc were significantly reduced when compared with strain 85\* $\Delta$ *hrcQ* carrying *hrcQ-c-myc* expression plasmids (Fig. 1B and 3A). As expected, chromosomally encoded HrcQ-c-Myc was not detectable in protein extracts of strain 85-10 $\Delta$ *hrcQ*:*hrcQ-c-myc* which contains the wild-type *hrpG* gene and therefore does not efficiently express the *hrp* genes when bacteria are cultivated in non-inducing minimal medium (Fig. 1B and 3A).

Plant infection experiments revealed that the *in cis* expression of *hrcQ-c-myc* fully complemented the *hrcQ* mutant phenotype of both strains 85-10 $\Delta$ *hrcQ* and 85\* $\Delta$ *hrcQ*, even at low inoculation densities (Fig. 3B). We also studied *in planta* growth of strain 85-10 $\Delta$ *hrcQ* carrying different *hrcQ* expression constructs over a period of eleven days. Fig. 3C shows that the wild-type strain 85-10 grew to a density of more than  $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> of the infected plant tissue, whereas growth of the *hrcQ* deletion mutant was significantly reduced. Expression of *hrcQ* under control of the *lac* promoter led to a further reduction of *in planta* growth, suggesting that *hrcQ* overexpression has a dominant-negative effect on *in planta* growth (Fig. 3C). Bacterial growth of strain 85-10 $\Delta$ *hrcQ* was slightly increased upon ectopic expression of *hrcQ* under control of the native promoter. By contrast, a more significant increase of bacterial *in planta* multiplication was observed when *hrcQ-c-myc* was



**Figure 2. HrcQ is essential for T3S of the translocon protein HrpF and the early T3S substrate HrpB2.** (A) Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ *hrcQ* ( $\Delta$ *hrcQ*) carrying plasmid pBRM (EV) or expression constructs encoding HrcQ-c-Myc under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter were incubated in secretion medium. Total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for HrpF and HrpB2, respectively. (B) *lac* promoter-driven expression of *hrcQ-c-myc* exerts a negative effect on T3S of HrpF. Strain 85\* without expression construct (-), with plasmid pBRM (EV) or derivatives thereof encoding HrcQ-c-Myc as described in panel A were incubated in secretion medium. TE and SN were analyzed by immunoblotting using HrpF-specific antibodies. doi:10.1371/journal.pone.0051063.g002

introduced into the genome of strain 85-10 $\Delta$ *hrcQ* however, wild-type bacterial growth levels were not restored (Fig. 3C). We conclude that the *in cis* expression of *hrcQ* under control of the native promoter complements the phenotype of the *hrcQ* deletion mutant with respect to plant reactions and partially complements the defect in *in planta* multiplication. A partial complementation was also observed for the *in vitro* T3S of the translocon protein HrpF (Fig. 3D).

#### HrcQ Localizes to the Bacterial Membranes upon Activation of the T3S System

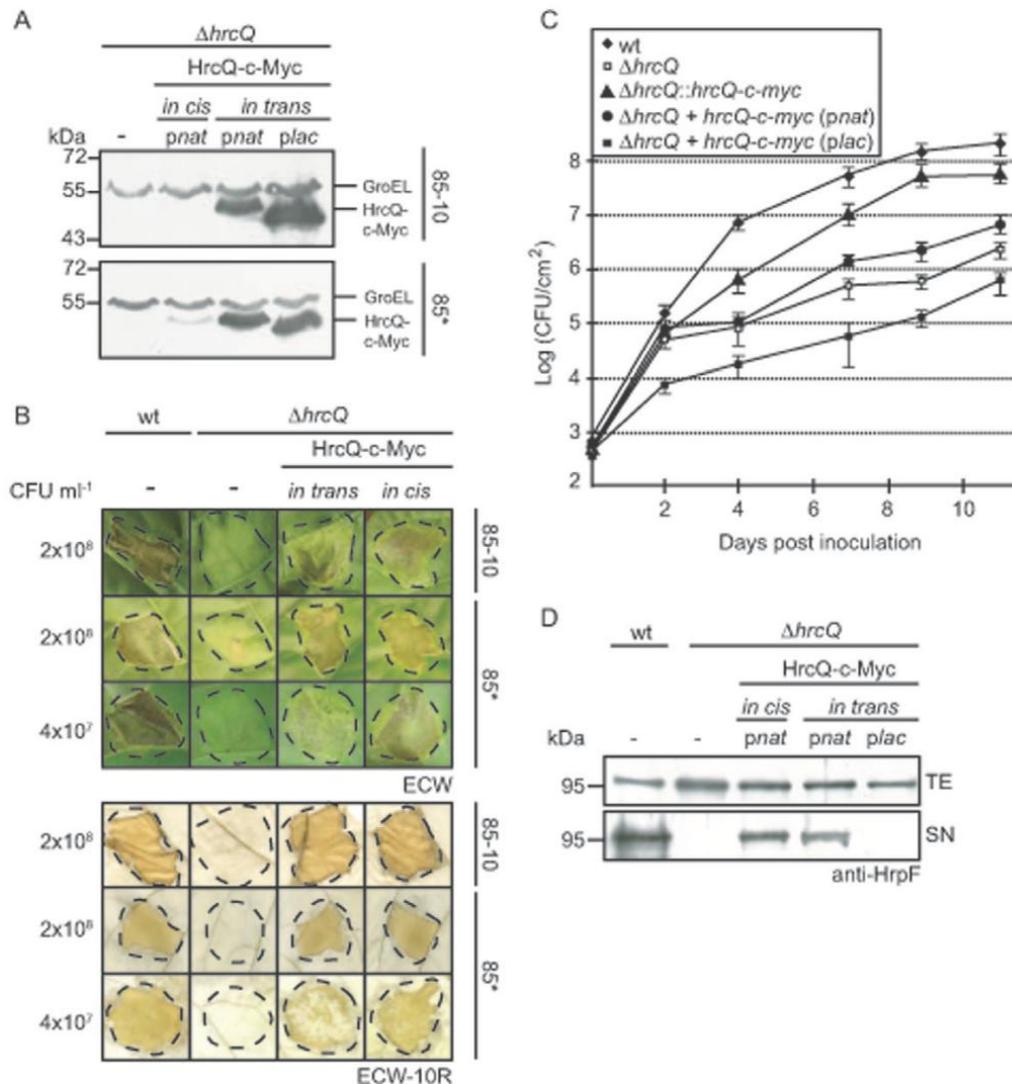
Given the homology of HrcQ to predicted C ring components, we investigated the localization of HrcQ in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. For this, we first performed secretion studies with strains 85\* and 85\* $\Delta$ *hrcQ* carrying *hrcQ* or *hrcQ-c-myc* expression constructs. Fig. 4A shows that HrcQ and derivatives were present in the total cell extracts but not detectable in the culture supernatants when bacteria were incubated in secretion medium, suggesting that HrcQ is not secreted by the T3S system. Next, we separated membrane fractions and soluble proteins of strain 85\* by ultracentrifugation after cultivation of the bacteria in minimal medium A at pH 7.0 (nonpermissive conditions for T3S) or pH 5.3 (T3S-permissive conditions). At pH 7.0, HrcQ was predominantly present in the soluble fraction. By contrast, at pH 5.3 the amounts of HrcQ in the membrane fraction were significantly increased, suggesting a membrane association of HrcQ upon activation of the T3S system (Fig. 4B). When the blots were reprobated with antibodies specific for the ATPase HrcN and the OM secretin HrcC, HrcC was mainly present in the membrane fraction under both secretion-permissive and nonpermissive conditions. By contrast, the ATPase HrcN was detected in the soluble fraction at pH 7.0 whereas the amounts of HrcN in the

membrane fraction were significantly increased under T3S-permissive conditions as was reported previously [20] (Fig. 4B).

#### HrcQ Interacts with itself and with IM-associated Components of the T3S System

Given the predicted role of HrcQ as a C ring component, HrcQ is likely to interact with other cytoplasmic or IM-associated proteins of the T3S system. To test this possibility, GST fusions of the cytoplasmic T3S ATPase HrcN and its predicted regulator HrcL were immobilized on glutathione sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrcQ-c-Myc. Bound proteins were eluted from the matrix and analyzed by immunoblotting using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies. HrcQ-c-Myc specifically coeluted with GST-HrcN and GST-HrcL but not with GST alone, suggesting that it interacts with the ATPase HrcN and its predicted regulator HrcL (Fig. 5A and B). Both interaction were also shown in the opposite direction with GST-HrcQ and C-terminally c-Myc epitope-tagged derivatives of HrcL and HrcN (Fig. 5C).

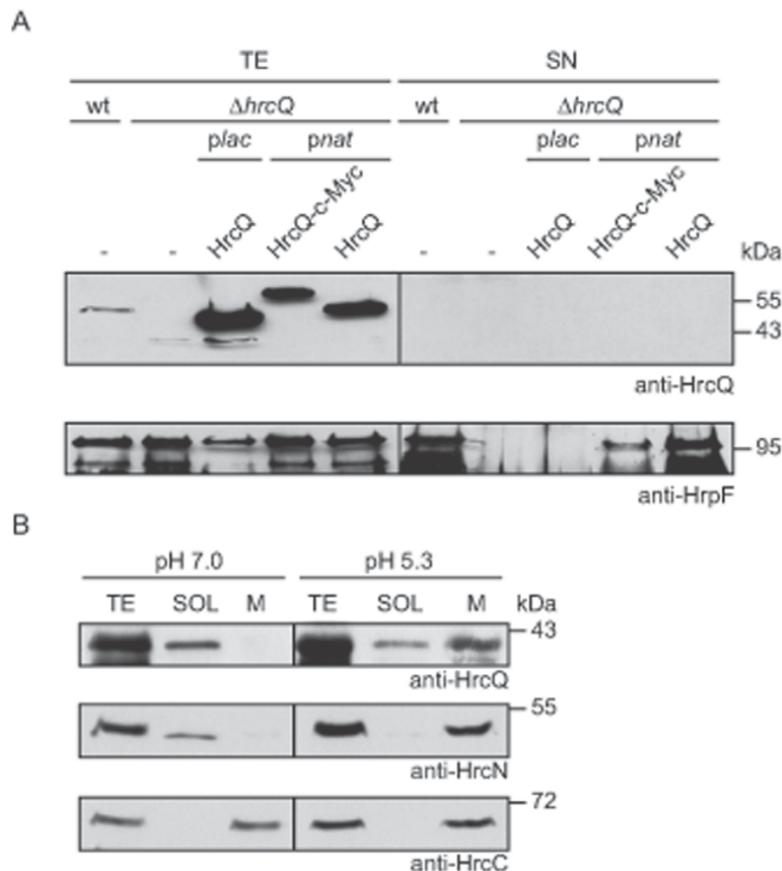
We also analyzed a possible interaction of HrcQ with the IM proteins HrcV and HrcU. These proteins consist of eight and four transmembrane domains, respectively, and cytoplasmic domains that might be involved in T3S substrate docking [45]. GST pull-down assays revealed that HrcQ-c-Myc coelutes with GST fusions of HrcU and the C-terminal cytoplasmic domain of HrcU, respectively, spanning amino acids 255 to 357 (Fig. 5D). This region of HrcU was previously shown to interact with the early T3S substrate HrpB2, the T3S4 protein HpaC and the ATPase HrcN [20,21]. We also observed interactions between GST-HrcQ and C-terminally c-Myc epitope-tagged derivatives of HrcV and the HrcV deletion derivative HrcV<sub>324-645</sub>-c-Myc, which corresponds to the cytoplasmic domain of HrcV [45], suggesting that HrcQ interacts with the cytoplasmic domains of both HrcU and HrcV (Fig. 5E).



**Figure 3. Complementation studies with chromosomally encoded *hrcQ-c-myc*.** (A) Immunodetection of *in cis*-encoded HrcQ-c-Myc. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcQ-c-Myc in the chromosome (*in cis*) or on an expression plasmid (*in trans*) under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were grown in minimal medium. Equal amounts of total cell extracts were analyzed by immunoblotting, using c-Myc epitope- and GroEL-specific antibodies, respectively. GroEL was analyzed as a loading control. (B) Insertion of *hrcQ-c-myc* into the *hpaFG* region restores wild-type symptom formation in *hrcQ* deletion mutants. Strains 85-10 (wt), 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ), 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcQ-c-Myc under control of the native promoter from plasmid pBRM-P (*in trans*) or in the chromosome (*in cis*) were inoculated at bacterial cell densities of  $2 \times 10^8$  or  $4 \times 10^7$  CFU/ml as indicated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. (C) *In planta* growth of a *hrcQ* deletion mutant strain can be partially restored upon expression of *hrcQ* *in cis* or *in trans*. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 (wt), 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ), 85-10 $\Delta hrcQ::hrcQ-c-myc$  ( $\Delta hrcQ::hrcQ-c-myc$ ) and 85-10 $\Delta hrcQ$  expressing *hrcQ-c-myc* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were inoculated into leaves of susceptible ECW pepper plants. Bacterial growth was analyzed over a period of 11 days. Values are the mean of three samples from three plants. Error bars represent standard deviations. The experiment was repeated two times. One representative experiment is shown. (D) *In vitro* T3S assays with *hrcQ* deletion mutants encoding HrcQ-c-Myc on the chromosome or on expression plasmids. Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcQ-c-Myc in the chromosome (*in cis*) or on an expression plasmid (*in trans*) under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were incubated in secretion medium. Total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by immunoblotting using HrpF-specific antibodies. doi:10.1371/journal.pone.0051063.g003

As HrcQ is homologous to predicted C ring components that likely form a ring complex, we also investigated a possible self-interaction of HrcQ. When analyzed by GST pull-down assays,

HrcQ-c-Myc was detected in the eluate of GST-HrcQ but not of GST, suggesting that HrcQ can interact with itself (Fig. 5E). Notably, no interaction was detected between GST-HrcQ and a C-



**Figure 4. Secretion and subcellular fractionation studies with HrcQ.** (A) HrcQ is not detectable in the culture supernatant under T3S-inducing conditions. Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or expressing *hrcQ* or *hrcQ-c-myc* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were incubated in secretion medium. Total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by immunoblotting, using HrcQ- and HrpF-specific antibodies. HrpF was analyzed as a positive control for T3S. (B) HrcQ preferentially associates with the bacterial membranes under T3S-permissive conditions. Strain 85\* was grown in minimal medium A supplemented with sucrose and casamino acids under secretion-permissive (pH 5.3) and non-permissive (pH 7.0) conditions. Membrane (M) and soluble (SOL) fractions were separated by ultracentrifugation and analyzed by immunoblotting, using antibodies directed against HrcQ, HrcN and HrcC, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0051063.g004

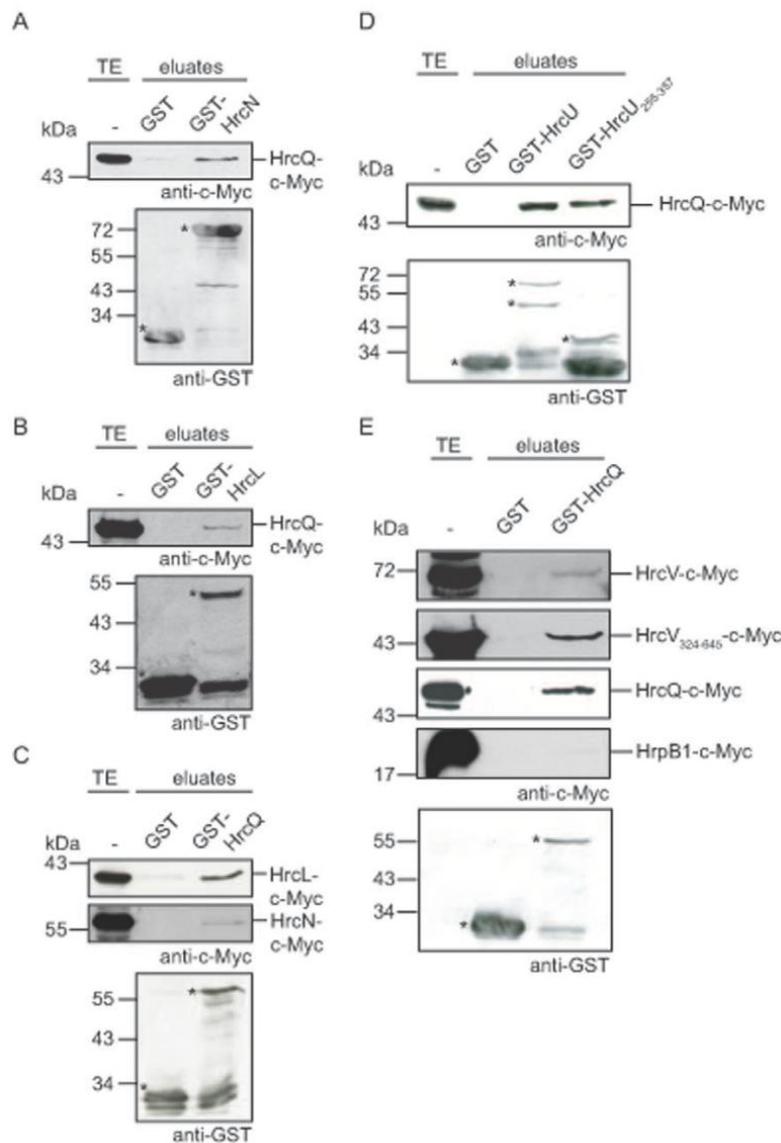
terminally c-Myc epitope-tagged derivative of HrpB1, which is a yet uncharacterized predicted component of the T3S system [22] (Fig. 5E). This suggests that the observed protein-protein interactions were not caused by unspecific protein binding to GST-HrcQ.

#### HrcQ Interacts with the T3S4 Protein HpaC and T3S Substrates

It was previously reported that predicted C ring components from animal pathogenic bacteria interact with effector proteins or effector-chaperone complexes [32,33,46]. We therefore tested a possible interaction of HrcQ with secretion substrates as well as with the general T3S chaperone HpaB and the T3S4 protein HpaC, which are probably both involved in the targeting of secreted proteins to the T3S system [17,18,21]. All candidate interaction partners were immobilized as GST fusion proteins and incubated with bacterial lysates containing HrcQ-c-Myc. Eluted proteins were analyzed by immunoblotting as described above. Fig. 6A shows that HrcQ-c-Myc coeluted with GST-HpaC and GST fusions of the early T3S substrate HrpB2, the pilus protein

HrpE and the effector protein XopF1. By contrast, only small amounts of HrcQ-c-Myc were detected in the eluates of GST fusions of the predicted translocon protein XopA and the T3S chaperone HpaB (Fig. 6A).

The interaction between HrcQ and the effector protein XopF1 prompted us to investigate whether HrcQ can also bind to additional effector proteins. We therefore performed pull-down assays with GST fusions of the effector proteins AvrBs3, XopJ and HpaA. Notably, HrcQ-c-Myc was detected in the eluates of all GST-effector fusions but not of GST alone, suggesting that it provides a binding site for several effector proteins (Fig. 6A). We also performed the interaction studies in the opposite direction with GST-HrcQ and C-terminally c-Myc epitope-tagged derivatives of putative HrcQ interaction partners. Fig. 6B shows that the effector proteins XopJ-c-Myc and HpaA-c-Myc were detected in the eluate of GST-HrcQ but not of GST alone. By contrast, XopF1-c-Myc and HrpB2-c-Myc were not detected in the eluate of GST-HrcQ, suggesting that they did not interact with the GST-HrcQ fusion protein (data not shown). However, it cannot be excluded that the C-terminal c-Myc epitope of XopF1 and HrpB2

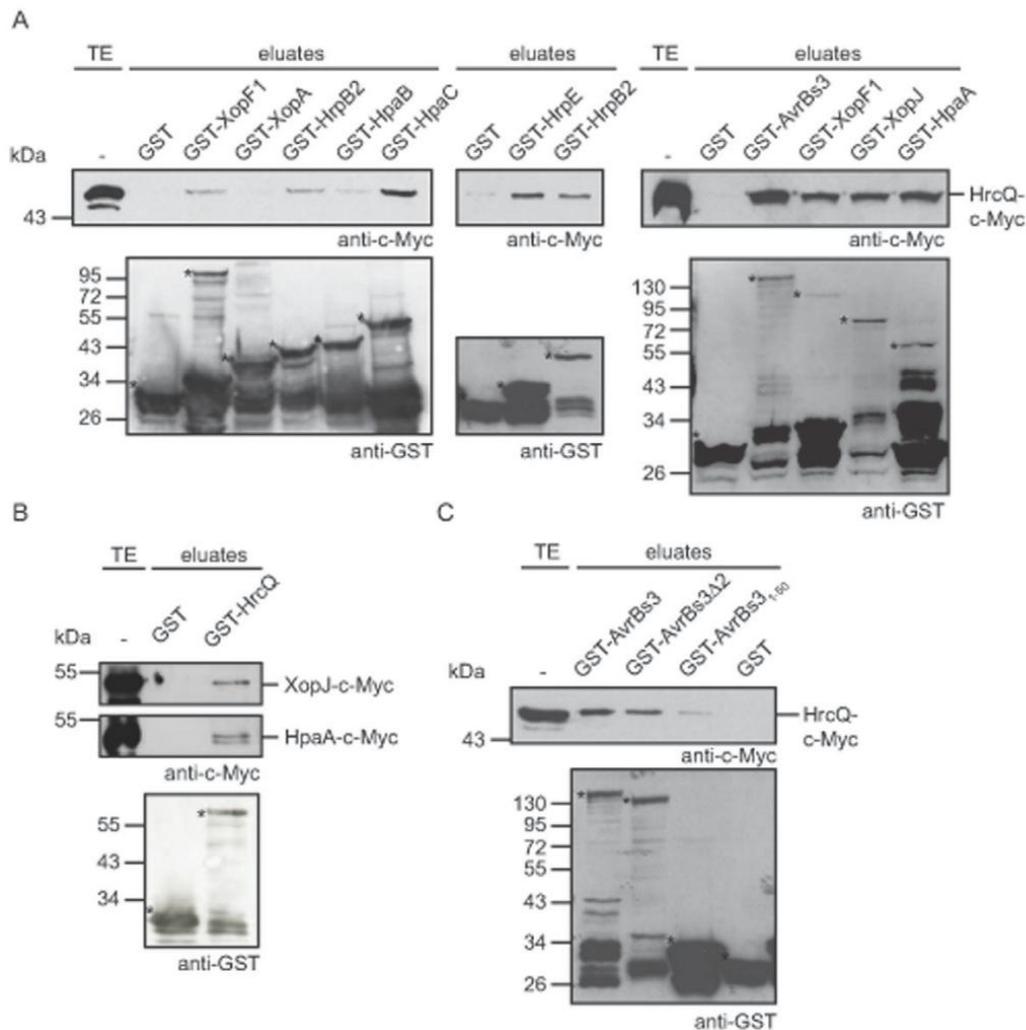


**Figure 5. HrcQ interacts with itself, HrcN, HrcL and the cytoplasmic domains of HrcU and HrcV.** (A) GST pull-down assays with HrcN. GST and GST-HrcN were immobilized on glutathione sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrcQ-c-Myc. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies. GST and GST fusion proteins are marked with asterisks, additional bands correspond to degradation products. (B) GST pull-down assays with HrcL. GST and GST-HrcL were immobilized on glutathione sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrcQ-c-Myc. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. (C) GST-HrcQ interacts with HrcL and HrcN. GST and GST-HrcQ were immobilized on glutathione sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrcL-c-Myc and HrcN-c-Myc, respectively. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. One representative blot incubated with GST-specific antibodies is shown. (D) HrcQ interacts with the cytoplasmic domain of HrcU. GST, GST-HrcU and GST-HrcU<sub>255-357</sub> were immobilized on glutathione sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrcQ-c-Myc. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. GST-HrcU is cleaved at the conserved NPTH motif. The signals detected by the GST-specific antibody therefore correspond to GST-HrcU and the N-terminal cleavage product [26]. (E) HrcQ interacts with the cytoplasmic domain of HrcV and with itself. GST and GST-HrcQ were immobilized on glutathione sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrcV-c-Myc, HrcV<sub>324-645</sub>-c-Myc, HrcQ-c-Myc or HrpB1-c-Myc. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. One representative blot incubated with GST-specific antibodies is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0051063.g005

masks a protein region and/or affects the folding of both proteins and thus the interaction with HrcQ. Notably, we have previously observed that a C-terminally c-Myc epitope-tagged derivative of HrpB2 does not complement the *hrpB2* mutant phenotype,

suggesting that the c-Myc epitope interferes with protein function [21].



**Figure 6. HrcQ provides a docking site for early and late T3S substrates.** (A) HrcQ interacts with T3S substrates and the T3S4 protein HpaC. GST, GST-XopF1, GST-XopA, GST-HrpB2, GST-HpaB, GST-HpaC, GST-HrpE, GST-AvrBs3, GST-XopJ and GST-HpaA were immobilized on glutathione sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrcQ-c-Myc. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies. GST and GST fusion proteins are marked with asterisks, additional bands correspond to degradation products. (B) HrcQ interacts with XopJ and HpaA. GST and GST-HrcQ were immobilized on glutathione sepharose and incubated with bacterial lysates containing XopJ-c-Myc and HpaA-c-Myc, respectively. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. One representative blot incubated with GST-specific antibodies is shown. (C) The N-terminal region of AvrBs3 is dispensable for the interaction with HrcQ. GST, GST-AvrBs3, GST-AvrBs3 $\Delta$ 2 and GST-AvrBs3<sub>1-50</sub> were immobilized on glutathione sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrcQ-c-Myc. TE and eluates were analyzed as is described in panel A. doi:10.1371/journal.pone.0051063.g006

### The N-terminal Region of AvrBs3 is Dispensable for the Interaction with HrcQ

As it is assumed that the targeting of T3S substrates and/or their recognition by components of the secretion apparatus often depends on a secretion signal in the N-terminal regions of secreted proteins, we wondered whether this signal is required for the binding of effector proteins to HrcQ. T3S signals of effector proteins from *X. campestris* pv. *vesicatoria* have not yet been studied in detail, but a T3S signal and HpaB-binding site were previously localized in the N-terminal 50 amino acids of the TAL effector AvrBs3 [17]. To investigate the contribution of this protein region to the interaction of AvrBs3 with HrcQ, we performed additional

pull-down assays with HrcQ-c-Myc and GST fusion proteins containing the full-length AvrBs3 protein, the N-terminal 50 amino acids or an N-terminally truncated derivative of AvrBs3, designated AvrBs3 $\Delta$ 2, which lacks the first 152 amino acids. HrcQ-c-Myc coeluted with GST-AvrBs3 and GST-AvrBs3 $\Delta$ 2, suggesting that the N-terminal region of AvrBs3 is dispensable for the interaction with HrcQ. By contrast, the amounts of HrcQ-c-Myc that were detected in the eluate of GST-AvrBs3<sub>1-50</sub> were significantly reduced (Fig. 6C). Thus, the N-terminal 50 amino acids of AvrBs3 are probably not sufficient for the efficient binding of HrcQ. Taken together, we conclude from our findings that HrcQ interacts with components and substrates of the T3S system

and that the T3S signal of AvrBs3 is not required for the interaction with HrcQ.

## Discussion

In this study we identified HrcQ as an essential component and a potential substrate docking site of the T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. HrcQ is homologous to predicted C ring components of T3S systems (YscQ protein family) that are assumed to form a cytoplasmic cup-like structure and might provide a binding site for chaperone-effector complexes [14]. Given that putative C ring components have mainly been studied in animal pathogenic bacteria, our data present the first detailed functional characterization of an YscQ family member from a plant pathogen. Genetic approaches revealed that HrcQ from *X. campestris* pv. *vesicatoria* is essential for T3S of early and late substrates as well as for pathogenicity and bacterial *in planta* growth. Loss of pathogenicity was also observed for *hrcQ* mutants that express *hpg\** and thus encode a constitutively active version of the key regulator HrpG (Fig. 1). Furthermore, the *hrcQ* mutant phenotype could not be complemented by overexpression of the ATPase-encoding *hrcN* gene, suggesting that enhanced expression levels of T3S genes and/or overexpression of *hrcN* cannot compensate for the loss of HrcQ. This is in contrast to the finding that the phenotype of flagellar C ring mutants can be partially complemented by overexpression of the ATPase-encoding gene *flhDC* or by upregulation of the regulatory genes *flhDC* [40,41]. The C ring of flagellar T3S systems is therefore probably not essential for secretion, which is different from the crucial role of HrcQ from *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Loss of pathogenicity of the *hrcQ* deletion mutant was specifically caused by the absence of HrcQ because the mutant phenotype was partially complemented by ectopic expression of *hrcQ* *in trans*. Overexpression of *hrcQ* under control of the *lac* promoter did not complement the *hrcQ* mutant phenotype and significantly reduced T3S and pathogenicity of *hrcQ* wild-type strains. Surprisingly, *lac* promoter-driven expression of *hrcQ* also affected bacterial growth *in vitro*, suggesting that elevated HrcQ levels are detrimental for bacterial fitness (Fig. 1). The latter observation was unexpected because the *in vitro* growth of *X. campestris* pv. *vesicatoria* is assumed to be independent of the T3S system. The negative effect of *hrcQ* overexpression on bacterial growth was less pronounced in complex medium, suggesting that it can be partially compensated by favourable environmental conditions. To circumvent the dominant-negative effects caused by increased HrcQ amounts, we inserted *hrcQ* under control of the native promoter into the *hpaFG* region next to the *hpg* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrcQ* deletion mutants. Chromosomally encoded HrcQ-c-Myc fully complemented the phenotype of *hrcQ* deletion mutants with respect to plant reactions, which confirms the above hypothesis that increased copy numbers of *hrcQ* are not favourable for pathogenicity (Fig. 3).

Given the homology of HrcQ with predicted C ring components from animal pathogenic bacteria, we assumed that HrcQ is a cytoplasmic component of the T3S system. In line with this hypothesis, fractionation studies revealed that HrcQ is predominantly present in cytoplasmic fractions and specifically associates with the bacterial membranes under T3S-permissive conditions (Fig. 4). This is reminiscent of the membrane association of the HrcQ homologs HrcQ<sub>A</sub> and HrcQ<sub>B</sub> from *Pseudomonas syringae* that are translated as two separate proteins [56]. Notably, we have previously shown that also the cytoplasmic ATPase HrcN and its predicted regulator HrcL from *X. campestris* pv. *vesicatoria* specifically associate with the bacterial membranes

under T3S-activating conditions [20]. Our *in vitro* interaction studies showed that both HrcN and HrcL interact with HrcQ (Fig. 5), suggesting that all three proteins are present in a complex which associates with the membrane-spanning components of the T3S system under secretion-permissive conditions. This is in agreement with previously reported interactions between predicted C ring components and the ATPase complex of T3S systems from animal pathogenic bacteria [32,57-60]. Our interaction studies also revealed a self-interaction of HrcQ, suggesting that HrcQ can form homo-oligomers as is expected for a predicted C ring component. Complex formation was also described for HrcQ<sub>A</sub> and HrcQ<sub>B</sub> from *P. syringae* and the two translation products of *yscQ* from *Yersinia* [56,61].

In addition to HrcN and HrcL, HrcQ interacts with the IM proteins HrcU and HrcV that are essential components of the membrane-spanning export apparatus (Fig. 5) [14]. HrcU contains four transmembrane helices and a cytoplasmic domain (HrcU<sub>C</sub>) that is proteolytically cleaved and interacts with the T3S4 protein HpaC [26,45,62]. HrcU<sub>C</sub> is presumably involved in the T3S substrate specificity switch and in substrate binding because it interacts with the early T3S substrate HrpB2 [21,26]. As HrcU also interacts with HrcQ (Fig. 5) and the ATPase HrcN (via the cytoplasmic domain) as well as with the predicted regulator of the ATPase, HrcL (via the transmembrane region) [20], it is presumably not only required for the control of substrate specificity but additionally contributes to the docking of the predicted HrcQ-HrcL-HrcN complex to the secretion apparatus at the IM.

In contrast to HrcU, the IM protein HrcV has not yet been intensively characterized in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. While previous studies revealed an interaction of HrcV with the general T3S chaperone HpaB and the T3S4 protein HpaC, it is yet unknown whether HrcV can directly bind to secreted proteins as was shown for HrcV homologs from flagellar T3S systems (FlhA protein family) [18,63-66]. The new finding of an interaction between the cytoplasmic domain of HrcV and HrcQ suggests that HrcV is involved in the recruitment of cytoplasmic components of the T3S system as is postulated for HrcU. An interaction between HrcV and the ATPase complex still needs to be investigated.

Notably, HrcQ also interacts with the T3S4 protein HpaC, which might be involved in the targeting of T3S substrates to the secretion system (Fig. 6). As HpaC additionally binds to the ATPase HrcN as well as to the IM proteins HrcV and HrcU [18,20], it is possible that the T3S apparatus contains multiple binding sites for HpaC. In agreement with this hypothesis, T3S substrates or chaperone-substrate complexes from animal pathogenic bacteria interact with the predicted C ring as well as with the ATPase and/or the cytoplasmic domains of members of the YscV family of IM proteins [27,32,33,46,63,65,67-70]. In future studies, it has to be investigated whether the interaction of HpaC with HrcQ is essential for the T3S substrate specificity switch. Notably, additional interaction studies showed that HrcQ also interacts with different T3S substrates including the early substrate HrpB2 and effector proteins (Fig. 6). This was not caused by unspecific binding because HrcQ did not significantly interact with GST, GST-HpaB and GST-XopA. Given the interaction of HrcQ with secretion substrates, HrcQ is (besides HrcU<sub>C</sub>) the second known potential substrate binding site of the T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. As the early T3S substrate HrpB2 interacts with both HrcQ and HrcU<sub>C</sub>, it is possible that the T3S apparatus provides several binding sites for a given secretion substrate. In future studies we will investigate whether the binding of HrpB2 and other T3S substrates to HrcQ is required for their efficient secretion.

The recruitment and/or secretion of T3S substrates by the T3S system is assumed to depend on an N-terminal secretion signal that is not conserved on the amino acid level [71,72]. T3S signals have been localized in several T3S substrates from plant and animal pathogenic bacteria and presumably are required for the targeting and docking of these protein to the secretion apparatus. Notably, however, in most cases the contribution of the T3S signal to substrate docking has not yet been analyzed. We have previously shown that the T3S signal of the TAL effector AvrBs3 is located within the N-terminal 50 amino acids that also provide a binding site for HpaB [17]. Surprisingly, however, pull-down assays with HrcQ and AvrBs3 derivatives revealed that the N-terminal region of AvrBs3 is dispensable for the efficient interaction with HrcQ (Fig. 6), suggesting that the T3S signal from AvrBs3 is not required for the binding to HrcQ. This indicates that the interaction of AvrBs3 with HrcQ occurs after the T3S signal-mediated targeting of AvrBs3 to the T3S system. It remains to be investigated how the T3S signal is recognized and whether it is required for substrate binding.

In summary, we conclude from our findings that HrcQ is likely an important substrate docking site of the T3S system but is presumably not the primary binding site for secreted proteins.

### Supporting Information

**Figure S1** Complementation studies with strain 85\* $\Delta$ *hrcQ*. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ *hrcQ* ( $\Delta$ *hrcQ*) carrying plasmid pBRM (-) or derivatives thereof expressing *hrcQ* or *hrcQ-c-myc* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were inoculated at a density of  $4 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. (TIF)

**Figure S2** Ectopic expression of *hrcN-c-myc* does not complement the *hrcQ* mutant phenotype. (A) Infection studies with derivatives of

strain 85\* $\Delta$ *hrcQ*. Strains 85-10 (wt), 85\* (wt), 85-10 $\Delta$ *hrcQ* ( $\Delta$ *hrcQ*) and 85\* $\Delta$ *hrcQ* ( $\Delta$ *hrcQ*) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcN-c-Myc as indicated were inoculated at a density of  $4 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. Expression of *hrcN-c-myc* under control of the *lac* promoter was previously shown to complement the *hrcN* mutant phenotype [20]. (B) HrcN-c-Myc is stably synthesized in strain 85\* $\Delta$ *hrcQ*. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ *hrcQ* ( $\Delta$ *hrcQ*) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcN-c-Myc as indicated were grown in NYG medium and total cell extracts were analyzed by immunoblotting, using a c-Myc epitope-specific antibody. (TIF)

**Figure S3** Generation of the suicide vector pLAND-P. DNA fragments of the *hpaFG* region flanking the *lacZ* gene, the *lac* promoter (*lacP*) and the 3 $\times$  c-Myc epitope-encoding sequence were cloned into the suicide vector pOK1 (see Materials and Methods). *BsaI* sites upstream of *lacP* and downstream of *lacZ* allow the directional cloning of genes of interest in frame with the 3 $\times$  c-Myc epitope-encoding sequence. Genes are represented by arrows. The DNA sequences given in the boxes refer to the overhangs that are generated after restriction of the DNA with *BsaI*. (TIF)

### Acknowledgments

We are grateful to M. Jordan for technical assistance, to N. Hartmann for generating constructs pBRMhrcV and pBRMhrcV<sub>324-645</sub> and to U. Bonas for helpful comments on the manuscript.

### Author Contributions

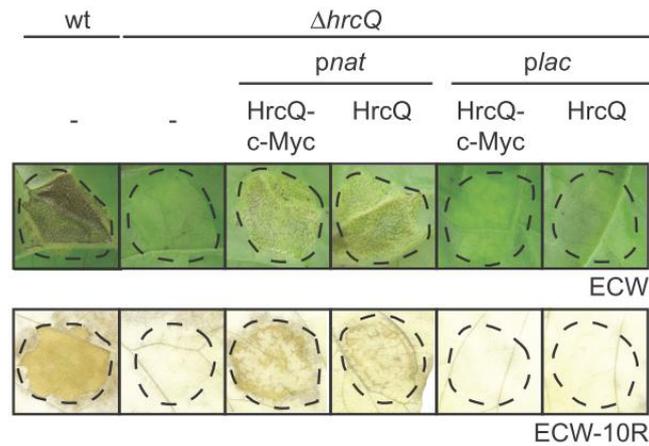
Conceived and designed the experiments: CL JH DB. Performed the experiments: CL JH DB. Analyzed the data: CL JH DB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CL JH DB. Wrote the paper: DB.

### References

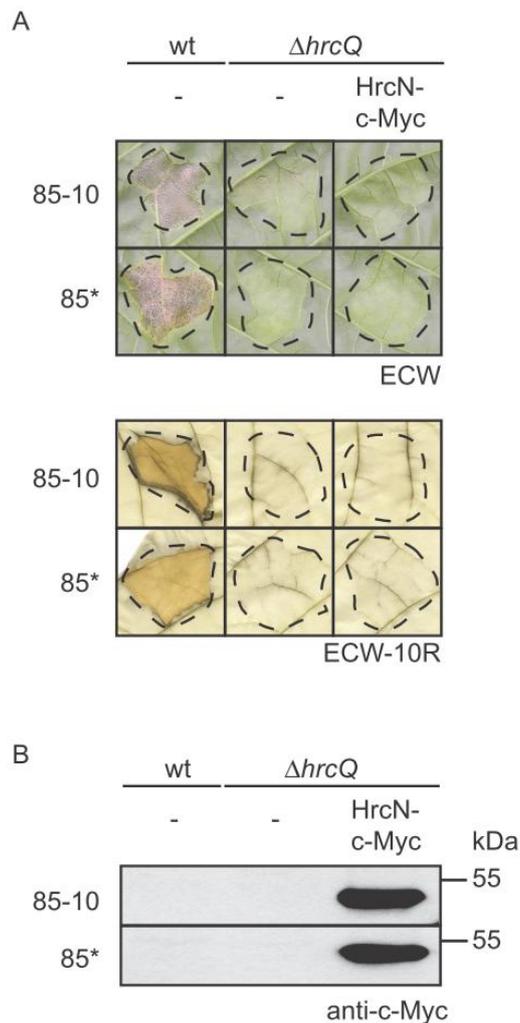
- Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR (2005) Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol* 13: 143–149.
- Desvaux M, Hebraud M, Henderson IR, Pallen MJ (2006) Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol* 14: 157–160.
- Chevance FFV, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature* 6: 455–465.
- Francis MR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* 235: 1261–1270.
- DePamphilis ML, Adler J (1971) Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 105: 384–395.
- Blocher A, Jouihi N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, et al. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* 39: 652–663.
- Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galan JE, et al. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306: 1040–1042.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, et al. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602–605.
- Sani M, Allaoui A, Fusetti F, Oostergetel GT, Keegstra W, et al. (2007) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron* 38: 291–301.
- He SY, Nomura K, Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694: 181–206.
- Erhardt M, Namba K, Hughes KT (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000299.
- Mueller CA, Broz P, Cornelis GR (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68: 1085–1095.
- Matte PJ, Faudry E, Job V, Izore T, Attree I, et al. (2010) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* 278: 414–426.
- Büttner D (2012) Protein export according to schedule – architecture, assembly and regulation of type III secretion systems from plant and animal pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 262–310.
- Büttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34: 107–133.
- Büttner D, Bonas U (2002) Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* 21: 5313–5322.
- Büttner D, Gürebeck D, Noel LD, Bonas U (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* 54: 755–768.
- Büttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 59: 513–527.
- Schulze S, Kay S, Büttner D, Egler M, Eschen-Lippold L, et al. (2012) Analyses of new type III effectors from *Xanthomonas* uncover XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytol* 195: 894–911.
- Lorenz C, Büttner D (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 191: 1414–1428.
- Lorenz C, Schulz S, Wolsch T, Rossier O, Bonas U, et al. (2008) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* 4: e1000094.
- Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* 38: 828–838.
- Hartmann N, Schulz S, Lorenz C, Fraas S, Hause G, et al. (2012) Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies

- protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiol* 158: 1334–1349.
24. Deane JE, Abruzzi P, Johnson S, Lea SM (2010) Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* 67: 1065–1075.
  25. Cornelis GR, Agrain C, Sorg I (2006) Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* 9: 201–206.
  26. Lorenz C, Büttner D (2011) Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol Microbiol* 79: 447–467.
  27. Gonzalez-Pedrajo B, Minamino T, Kihara M, Namba K (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol* 60: 984–998.
  28. McMurry JL, Murphy JW, Gonzalez-Pedrajo B (2006) The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* 45: 11790–11798.
  29. Oosawa K, Ueno T, Aizawa S (1994) Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J Bacteriol* 176: 3683–3691.
  30. Brown PN, Mathews MA, Joss LA, Hill CP, Blair DF (2005) Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* 187: 2890–2902.
  31. Zhao R, Pathak N, Jaffe H, Reese TS, Khan S (1996) FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* 261: 195–208.
  32. Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, Yoshida M, Katayama E, et al. (2006) *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* 281: 599–607.
  33. Spaeth KE, Chen YS, Valdivia RH (2009) The *Chlamydia* type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex. *PLoS Pathog* 5: e1000579.
  34. Wengelnik K, Rossier O, Bonas U (1999) Mutations in the regulatory gene *hnpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hnp* genes. *J Bacteriol* 181: 6828–6831.
  35. Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas U (1996) HrpG, a key *hnp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant-Microbe Interact* 9: 704–712.
  36. Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hnpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 41: 1271–1281.
  37. Ronald PC, Staskawicz BJ (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol Plant-Microbe Interact* 1: 191–198.
  38. Escolar L, Van den Ackerveken G, Pieplow S, Rossier O, Bonas U (2001) Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol* 2: 287–296.
  39. Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
  40. Erhardt M, Hughes KT (2010) C-ring requirement in flagellar type III secretion is bypassed by FliDC upregulation. *Mol Microbiol* 75: 376–393.
  41. Konishi M, Kanbe M, McMurry JL, Aizawa S (2009) Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J Bacteriol* 191: 6186–6191.
  42. Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U (2002) Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hnp* pathogenicity island. *J Bacteriol* 184: 1340–1348.
  43. Tamir-Ariel D, Navon N, Burdman S (2007) Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *J Bacteriol* 189: 6359–6371.
  44. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137–141.
  45. Berger C, Robin GP, Bonas U, Koebnik R (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiol* 156: 1963–1974.
  46. Lara-Tejero M, Kato J, Wagner S, Liu X, Galan JE (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* 331: 1188–1191.
  47. Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyc MK, Byrde RJW, et al. (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFRI. *EMBO J* 3: 3323–3328.
  48. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al (1996) Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
  49. Figurski D, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1648–1652.
  50. Minsavage GV, Dahlbeck D, Whalen MC, Kearny B, Bonas U, et al. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* 3: 41–47.
  51. Kousik CS, Ritchie DF (1998) Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant Disease* 82: 181–186.
  52. Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, et al. (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.
  53. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE* 3: e3647.
  54. Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9368–9373.
  55. Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocator protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 184: 2389–2398.
  56. Fadoulglou VE, Tampakaki AP, Glykos NM, Bastaki MN, Hadden JM, et al. (2004) Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 70–75.
  57. Biemans-Oldehinkel E, Sal-Man N, Deng W, Foster IJ, Finlay BB (2011) Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193: 5514–5519.
  58. Jackson MW, Plano GV (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* 186: 85–90.
  59. Johnson DL, Stone CB, Mahony JB (2008) Interactions between CdsD, CdsQ, and CdsL, three putative *Chlamydia pneumoniae* type III secretion proteins. *J Bacteriol* 190: 2972–2980.
  60. Johnson S, Blocker A (2008) Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase. *FEMS Microbiol Lett* 286: 274–278.
  61. Bzymek KP, Hamaoka BY, Ghosh P (2012) Two translation products of *Yersinia* yscQ assemble to form a complex essential to type III secretion. *Biochemistry* 51: 1669–1677.
  62. Schulz S, Büttner D (2011) Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*. *Infect Immun* 79: 2998–3011.
  63. Bange G, Kummerer N, Engel C, Bozkurt G, Wild K, et al. (2010) FliA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11295–11300.
  64. Minamino T, Kinoshita M, Hara N, Takeuchi S, Hida A, et al. (2012) Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FliA is required for efficient export of its cognate substrates. *Molecular Microbiology* 83: 775–788.
  65. Minamino T, MacNab RM (2000) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* 35: 1052–1064.
  66. Creasey EA, Delahay RM, Daniell SJ, Frankel G (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol* 149: 2093–2106.
  67. Akeda Y, Galan JE (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437: 911–915.
  68. Boonyom R, Karavolos MH, Bulmer DM, Khan CM (2010) *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) type III secretion of SopD involves N- and C-terminal signals and direct binding to the InvC ATPase. *Microbiol* 156: 1805–1814.
  69. Gauthier A, Finlay BB (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 6747–6755.
  70. Thomas J, Stafford GP, Hughes C (2004) Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3945–3950.
  71. Arnold R, Jehl A, Rattei T (2010) Targeting effectors: the molecular recognition of type III secreted proteins. *Microbes Infect* 12: 346–358.
  72. McDermott JE, Corrigan A, Peterson E, Oehmen C, Niemann G, et al. (2011) Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infect Immun* 79: 23–32.
  73. Canteros BI (1990) Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. PhD thesis, University of Florida.
  74. Ménard R, Sansonetti PJ, Parsot C (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* 175: 5899–5906.
  75. Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Gogez V, et al. (2010) Functional characterization of the Xps and Xcs type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* 187: 983–1002.
  76. Lorenz C (2009) Functional characterization of the conserved components HrcN und HrcU of the type III secretion system from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. PhD thesis, Martin Luther University Halle-Wittenberg.
  77. Szurek B, Marois E, Bonas U, Van den Ackerveken G (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* 26: 523–534.
  78. Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, Bonas U (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol Microbiol* 29: 1379–1390.
  79. Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153: 3–11.
  80. Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttmann J, Bonas U, et al. (2008) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol Microbiol* 69: 344–360.

## 2.1.2 Anhang der Publikation I

**Supplementary figure 1** Complementation studies with strain 85\* $\Delta hrcQ$ .

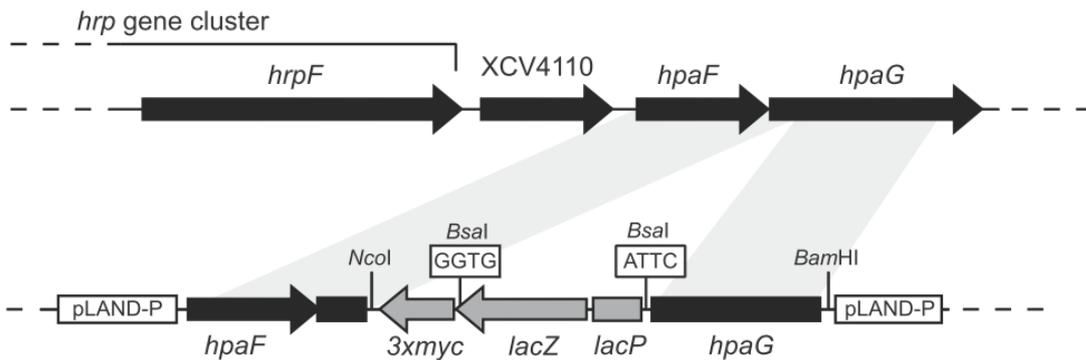
*X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or derivatives thereof expressing *hrcQ* or *hrcQ-c-myc* under control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter as indicated were inoculated at a density of  $4 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas.



**Supplementary figure 2** Ectopic expression of *hrcN-c-myc* does not complement the *hrcQ* mutant phenotype.

(A) Infection studies with derivatives of strain 85\* $\Delta hrcQ$ . Strains 85-10 (wt), 85\* (wt), 85-10 $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcN-c-Myc as indicated were inoculated at a density of  $4 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. Expression of *hrcN-c-myc* under control of the *lac* promoter was previously shown to complement the *hrcN* mutant phenotype [20].

(B) HrcN-c-Myc is stably synthesized in strain 85\* $\Delta hrcQ$ . *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcQ$  ( $\Delta hrcQ$ ) carrying plasmid pBRM (-) or encoding HrcN-c-Myc as indicated were grown in NYG medium and total cell extracts were analyzed by immunoblotting, using a c-Myc epitope-specific antibody.



### Supplementary figure 3 Generation of the suicide vector pLAND-P.

DNA fragments of the *hpaFG* region flanking the *lacZ* gene, the *lac* promoter (*lacP*) and the 3 × c-Myc epitope-encoding sequence were cloned into the suicide vector pOK1 (see Materials and Methods). *BsaI* sites upstream of *lacP* and downstream of *lacZ* allow the directional cloning of genes of interest in frame with the 3 × c-Myc epitope-encoding sequence. Genes are represented by arrows. The DNA sequences given in the boxes refer to the overhangs that are generated after restriction of the DNA with *BsaI*.

### 2.1.3 Zusammenfassung der Publikation I

In der Publikation „HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*“ wurde das zur YscQ-Familie gehörende Protein HrcQ analysiert. Von Vertretern dieser Proteinfamilie wird angenommen, dass sie eine vorhergesagte zytoplasmatische Ringstruktur des T3S-Systems ausbilden. In dieser Studie konnte durch *in vitro*-Interaktionsstudien gezeigt werden, dass HrcQ mit sich selbst, IM-Komponenten des T3S-Systems, T3S-Chaperonen und der T3S-assoziierten ATPase sowie mit ihrem putativen Regulator interagiert. Weiterhin zeigten Fraktionierungsstudien, dass HrcQ unter Sekretionsbedingungen mit der bakteriellen Membran assoziiert. Die Ergebnisse lassen demnach vermuten, dass HrcQ möglicherweise im Komplex mit der T3S-assoziierten ATPase und ihrem putativen Regulator unter Sekretionsbedingungen mit IM-Komponenten des T3S-Systems assoziiert. Ferner konnte auch eine Bindung von HrcQ zu den sekretierten T3S-Komponenten HrpB2 und HrpE sowie zu den Effektorproteinen XopF1, XopJ und AvrBs3 nachgewiesen werden, was darauf hin deutet, dass HrcQ als Substratbindestelle dient. Für die Interaktion zwischen HrcQ und AvrBs3 war das T3S-Signal sowie die Chaperonbindestelle von AvrBs3 jedoch nicht essentiell. Die Erkennung von T3S-Substraten erfolgt wahrscheinlich über ihr T3S-Signal und/oder die Chaperonbindestelle, was vermuten lässt, dass die Interaktion von HrcQ mit AvrBs3 erst nach dem T3S-Signal-vermittelten Transport und der Erkennung von AvrBs3 stattfindet. Durch *in vitro*-Sekretions- und Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass HrcQ essentiell für die T3S und die Pathogenität von *Xcv* ist, aber selbst nicht sekretiert wird. Die Überexpression von HrcQ in einen Wildtypstamm führte zu einer reduzierten Symptomausbildung auf Paprikapflanzen. In Übereinstimmung mit diesen Experimenten konnte der Phänotyp einer *hrcQ*-Mutante durch die Integration von *hrcQ-c-myc* in das Genom einer *hrcQ*-Mutante (*in cis*) unter der Kontrolle des nativen *hrcQ*-Promotors, nicht jedoch durch die ektopische Expression von *hrcQ-c-myc*, vollständig komplementiert werden. Zusammenfassend lassen die erhaltenen Daten somit vermuten, dass die Überexpression von HrcQ zu einem dominant negativen Effekt führt.

## 2.2 Das periplasmatische Protein HrpB1 von *Xcv*

### 2.2.1 Publikation II: „The periplasmic HrpB1 protein from *Xanthomonas* spp. binds to peptidoglycan and to components of the type III secretion system”



## The Periplasmic HrpB1 Protein from *Xanthomonas* spp. Binds to Peptidoglycan and to Components of the Type III Secretion System

Jens Hausner, Nadine Hartmann, Christian Lorenz,\* Daniela Büttner

Institute of Biology, Department of Genetics, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* employs a type III secretion (T3S) system to translocate bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. The membrane-spanning secretion apparatus consists of 11 core components and several associated proteins with yet unknown functions. In this study, we analyzed the role of HrpB1, which was previously shown to be essential for T3S and the formation of the extracellular T3S pilus. We provide experimental evidence that HrpB1 localizes to the bacterial periplasm and binds to peptidoglycan, which is in agreement with its predicted structural similarity to the putative peptidoglycan-binding domain of the lytic transglycosylase Slt70 from *Escherichia coli*. Interaction studies revealed that HrpB1 forms protein complexes and binds to T3S system components, including the inner membrane protein HrcD, the secretin HrcC, the pilus protein HrpE, and the putative inner rod protein HrpB2. The analysis of deletion and point mutant derivatives of HrpB1 led to the identification of amino acid residues that contribute to the interaction of HrpB1 with itself and HrcD and/or to protein function. The finding that HrpB1 and HrpB2 colocalize to the periplasm and both interact with HrcD suggests that they are part of a periplasmic substructure of the T3S system.

Bacteria of the genus *Xanthomonas* cause devastating diseases of a variety of mono- and dicotyledonous plants worldwide, including important crop plants (1, 2). The successful interaction with the host often depends on protein secretion systems which transport bacterial virulence factors into the extracellular milieu or directly into the host cell. The type III secretion (T3S) system, which is often essential for pathogenicity, is a complex molecular nanomachine dedicated to the transkingdom delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic cells (3). T3S systems are conserved in many Gram-negative plant- and animal-pathogenic bacteria and presumably share a similar architecture consisting of membrane-associated ring structures that enclose an inner transport channel (4–9). The inner membrane (IM) and outer membrane (OM) rings are connected via a predicted periplasmic inner rod structure (7, 10, 11). The IM ring is presumably associated with members of the conserved YscR, -S, -T, -U, and -V families of IM proteins that form the export apparatus. The nomenclature of these proteins refers to the Ysc proteins from the animal-pathogenic bacterium *Yersinia* (12). Members of the export apparatus are linked to the predicted cytoplasmic (C) ring of the T3S system, which presumably harbors docking sites for T3S substrates and interacts with the cytoplasmic ATPase (YscN family members) and its predicted regulator (YscL family members) (13–16). The ATPase provides the energy for T3S and/or mediates the unfolding of T3S substrates (17). As the inner diameter of the secretion channel is too narrow to allow the transport of fully folded proteins, T3S substrates presumably travel the secretion apparatus in a partially unfolded conformation (6, 7). The subsequent delivery of effector proteins to the host-pathogen interface and into the host cell cytosol depends on an extracellular pilus (up to 2  $\mu\text{m}$  long in plant-pathogenic bacteria) or needle (40 to 80 nm long in animal-pathogenic bacteria) and the bacterial T3S translocon, which is a predicted oligomeric protein channel that inserts into the eukaryotic plasma membrane (18–20).

One of the model systems for the analysis of T3S is the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (also reclassified as *Xanthomonas euvesicatoria* [21]), which causes

bacterial spot disease in pepper and tomato plants. The T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria* is encoded by the chromosomal *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster, which contains more than 25 genes that are organized in eight operons (22, 23). Eleven genes are conserved in plant- and/or animal-pathogenic bacteria and were therefore designated *hrc* (*hrp* conserved). They presumably encode the structural core subunits of the T3S system (12). Mutant studies revealed that all 11 *hrc* genes as well as the 9 nonconserved *hrp* genes are essential for pathogenicity and T3S (24–28). In most cases, however, the precise molecular roles of Hrp proteins during T3S remain unknown. Biochemical functions have so far been assigned only to the pilus protein HrpE, the putative translocon protein HrpF, and the early substrate HrpB2 (24, 29–31). Previous studies revealed that HrpB2 is essential for pathogenicity, T3S, and pilus formation and is presumably one of the first substrates that is secreted by the T3S system (24, 30, 31). The efficient secretion of HrpB2 is suppressed by the T3S substrate specificity switch (T3S4) protein HpaC, which promotes the secretion of translocon and effector proteins (30). Given that HrpB2 was not detected in association with the extracellular pilus structure but localizes to periplasm- and OM-enriched fractions, HrpB2 was proposed to participate in the assembly of the membrane-spanning secretion apparatus, possibly as part of the predicted inner rod structure (32).

Received 12 April 2013 Accepted 31 July 2013

Published ahead of print 9 August 2013

Address correspondence to Daniela Büttner, daniela.buettner@genetik.uni-halle.de.

\* Present address: Christian Lorenz, Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01226-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01226-13

HrpB2 is encoded in the *hrpB* operon of the *hrp* gene cluster, downstream of *hrpB1*, which is an essential pathogenicity gene with unknown function. Previously, it was shown that HrpB1 is essential for T3S and pilus formation but is likely not secreted by the T3S system (24, 31). In the present study, we aimed at the functional characterization of HrpB1 and the analysis of a possible interaction of HrpB1 with HrpB2. Mutant studies and localization and interaction experiments revealed that HrpB1 binds to peptidoglycan and interacts with IM and OM components of the T3S system as well as with HrpB2. The analysis of HrpB1 deletion and point mutant derivatives led to the identification of amino acid residues that are required for HrpB1 function and protein-protein interactions. Our findings suggest that HrpB1 and HrpB2 are part of a periplasmic protein complex that associates with IM and OM components of the T3S system from *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were grown at 30°C in nutrient-yeast-glycerol (NYG) medium (33) or in minimal medium A (pH 5.3) (34) supplemented with sucrose (10 mM) and Casamino Acids (0.3%), and *Escherichia coli* cells were grown at 37°C in lysogeny broth (LB) medium. Plasmids were introduced into *E. coli* by chemical transformation and into *X. campestris* pv. *vesicatoria* by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (35). Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml; and gentamicin, 15 µg/ml.

**Plant material and plant inoculations.** *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were inoculated with a needleless syringe into the intercellular spaces of leaves of the nearly isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW) and ECW-10R at concentrations of  $1 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> in 1 mM MgCl<sub>2</sub>, if not stated otherwise (36–38). The appearance of disease symptoms and the hypersensitive response (HR) were scored over a period of 1 to 10 days postinoculation (dpi). For the better visualization of the HR, leaves were bleached in 70% ethanol. Experiments were repeated at least two times.

**Generation of expression plasmids.** To generate *hrpB1* expression constructs, the annotated *hrpB1* gene (*hrpB1<sub>CTG</sub>*) and a derivative thereof with eight additional codons in the 5' region (*hrpB1*) with or without a stop codon were amplified by PCR from strain 85-10 and cloned into the Golden Gate-compatible vector pBRM downstream of a single *lac* promoter using the type II restriction enzyme BsaI (39, 40). Similarly, *hrpB1* with a stop codon, including 119 bp of the upstream region, was amplified and cloned into pBRM-P, which is a derivative of pBRM lacking the *lac* promoter, or into the Golden Gate-compatible suicide vector pLAND-P (Table 1). For the generation of expression constructs encoding HrpB1 deletion or point mutant derivatives, corresponding *hrpB1* fragments without stop codons were synthesized (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and cloned into pBRM and pBRM-P<sub>STOP</sub>, respectively. pBRM-P<sub>STOP</sub> contains a stop codon upstream of the c-Myc epitope-encoding sequence.

To generate expression constructs containing *hrpB1*-His<sub>6</sub> and point mutant derivatives thereof, *hrpB1* and derivatives were amplified by PCR from the corresponding pBRM expression constructs with primers that introduce the C-terminal His<sub>6</sub> epitope-encoding sequence upstream of a stop codon. The amplicons were subsequently cloned into pBRM. For the generation of a *hrcD* expression construct, *hrcD* was amplified by PCR and cloned into pBRM as described above. To obtain glutathione S-transferase (GST) expression constructs of *hrpB1*, *hrcC*, and *hrcD*, the corresponding genes were amplified by PCR and cloned into the EcoRI and XhoI sites of plasmid pGEX-2TKM. Primer sequences are available upon request.

**Generation of deletion mutants and genomic insertion of *hrpB1*.** To construct strain 85-10Δ*hrpB1*, the suicide vector construct pOB1D, which harbors the flanking regions of *hrpB1*, was conjugated into *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10. Homologous recombinations led to the deletion of codons 8 to 144 of the genomic *hrpB1* gene, and deletion mutants were selected as described previously (41). For the insertion of *hrpB1* into the genome of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, construct pLAND-PhrpB1 was conjugated into strains 85-10Δ*hrpB1* and 85\*Δ*hrpB1*. Strains with double recombination events that led to the insertion of *hrpB1* into the *hpaFG* region were selected as described previously (41).

**Protein purification.** *E. coli* BL21(DE3) cells, freshly transformed with plasmid DNA, were inoculated in LB medium supplemented with antibiotics and incubated at 37°C until the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) reached a value of 0.6. Expression was induced by adding isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 2 mM to the culture, followed by 3 h of incubation at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at  $3,220 \times g$  and stored at -20°C. The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.05% Tween, pH 7.2) and disrupted with a French press. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at  $40,000 \times g$  for 30 min at 4°C. The soluble cell fraction was mixed with Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose (2 ml agarose/100 ml original culture volume), loaded on a polypropylene column (Qiagen, Hilden, Germany), and incubated on a culture tube rotator for 1 h at 4°C. The Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose was washed four times with 1 column volume of wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, 0.05% Tween, pH 7.2, for HrpB1-His<sub>6</sub> or derivatives and 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.05% Tween, pH 7.2, for AvrBs3Δ2-His<sub>6</sub> [a C-terminally His<sub>6</sub> epitope-tagged derivative of the transcription activator-like effector protein AvrBs3 which lacks the N-terminal 152 amino acids]). Purified HrpB1-His<sub>6</sub> derivatives thereof, or AvrBs3Δ2-His<sub>6</sub> was eluted with 1 to 4 ml elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0.05% Tween, pH 7.2). Flowthrough fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using a His<sub>6</sub>-specific antibody (Qiagen).

**Protein secretion studies and immunoblot analysis.** T3S assays were performed as described previously (42). Briefly, bacteria were incubated in minimal medium A (pH 5.3), and equal amounts of bacterial total cell extracts and culture supernatants were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. We used polyclonal antibodies specific for HrpF (29), HrpB1 (42), HrpB2 (42), and HrcC (26), monoclonal anti-c-Myc antibody (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), anti-His<sub>6</sub> antibody (Qiagen), or anti-GST antibody (GE Healthcare, Munich, Germany). Horseradish peroxidase-labeled antirabbit, antimouse, or antigoat antibodies (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Experiments were repeated at least two times. Blots were routinely reacted with an antibody specific for HrcJ to ensure that no bacterial lysis had occurred (42) (data not shown).

**Cross-linking experiments.** Bacteria were grown overnight in NYG medium and were adjusted to a similar optical density at 600 nm. One milliliter of culture was centrifuged for 5 min at 4°C, and the pellet was resuspended in 1× phosphate-buffered saline (PBS) to a final volume of 200 µl at an OD<sub>600</sub> of 1.0. Disuccinimidyl suberate (DSS) dissolved in water-free dimethyl sulfoxide was added at final concentrations of 0.05 to 5 mM, and the reaction mixture was incubated for 60 min on ice. The reaction was stopped with 2 µl 1 M Tris-HCl (pH 8.0) and incubated for an additional 15 min on ice. After centrifugation at  $21,130 \times g$  for 5 min at 4°C, the pellet was resuspended in Laemmli buffer and 15 µl was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using HrpB1-specific antibodies. For cross-linking experiments with purified protein, HrpB1-His<sub>6</sub> was incubated with DSS and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting as described above.

**Coimmunoprecipitation.** For coimmunoprecipitation studies, 50-ml bacterial cultures were grown in secretion medium. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 1 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Pepper race 2, wild type, Rif <sup>r</sup>	37, 64
85*	85-10 derivative containing the <i>hrpG</i> * mutation	50
85-10Δ <i>hrpB1</i>	<i>hrpB1</i> deletion mutant of strain 85-10	This study
85-10Δ <i>hrpB1</i> :: <i>hrpB1</i>	Derivative of strain 85-10Δ <i>hrpB1</i> containing <i>hrpB1</i> expressed under the control of the native promoter in the <i>hpaFG</i> region	This study
85*Δ <i>hrpB1</i>	<i>hrpB1</i> deletion mutant of strain 85*	24
85*Δ <i>hrpB1</i> :: <i>hrpB1</i>	Derivative of strain 85*Δ <i>hrpB1</i> containing <i>hrpB1</i> expressed under the control of the native promoter in the <i>hpaFG</i> region	This study
85*Δ <i>hrpB2</i>	<i>hrpB2</i> deletion mutant of strain 85*	24
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, Germany
Top10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139, Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DH5α (λpir)	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) φ80lacZΔM15 [λpir]</i>	65
<b>Plasmids</b>		
pBRM	Golden Gate-compatible derivative of pBBR1MCS-5, Gm <sup>r</sup>	40, 66
pBRM-P	Golden Gate-compatible derivative of pBBR1MCS-5 without the <i>lac</i> promoter	40
pBRM-P <sub>STOP</sub>	Derivative of pBRM-P containing a stop codon upstream of the c-Myc epitope-encoding sequence	This study
pBRMhrcD	Derivative of pBRM encoding HrcD-c-Myc	This study
pBRMhrpB1	Derivative of pBRM encoding HrpB1-c-Myc	This study
pBRMhrpB1 <sub>His</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1-His <sub>6</sub>	This study
pBRM-PhrpB1	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1-c-Myc under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>Stop</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>GTTGStop</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>GTTG</sub>	This study
pBRMhrpB1 <sub>11-159</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>11-159</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>11-159Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>11-159</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>21-159</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>21-159</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>21-159Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>21-159</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>1-139</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>1-139</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>1-139Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>1-139</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>1-149</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>1-149</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>1-149Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>1-149</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>Δ69-79</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>Δ69-79</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>Δ69-79Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>Δ69-79</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>Δ91-97</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>Δ91-97</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>Δ91-97Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>Δ91-97</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>Δ102-109</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>Δ102-109</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>Δ102-109Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>Δ102-109</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>Δ116-128</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>Δ116-128</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>Δ116-128Stop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>Δ116-128</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>C14A</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>C14A</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>C14AStop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>C14A</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>L22A</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>L22A</sub> -c-Myc	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>L22AStop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>L22A</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>C96A</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>C96A</sub> -c-Myc	This study
pBRMhrpB1 <sub>C96AHis</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>C96A</sub> -His <sub>6</sub>	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>C96AStop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>C96A</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>L97A</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>L97A</sub> -c-Myc	This study
pBRMhrpB1 <sub>L97AHis</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>L97A</sub> -His <sub>6</sub>	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>L97AStop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>L97A</sub> under the control of the native promoter	This study
pBRMhrpB1 <sub>L128A</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>L128A</sub> -c-Myc	This study
pBRMhrpB1 <sub>L128AHis</sub>	Derivative of pBRM encoding HrpB1 <sub>L128A</sub> -His <sub>6</sub>	This study
pBRM-PhrpB1 <sub>L128AStop</sub>	Derivative of pBRM-P encoding HrpB1 <sub>L128A</sub> under the control of the native promoter	This study
pDEST17:356	Derivative of pDEST17 encoding AvrBs3Δ2	67; T. Schreiber and U. Bonas, unpublished data
pDMhrpB2	Derivative of pDSK602 encoding HrpB2-c-Myc	30
pGEX-2TKM	GST expression vector; p <sub>lac</sub> GST <i>lacI<sup>q</sup></i> pBR322 <i>ori Ap<sup>r</sup></i> , derivative of pGEX-2TK with polylinker of pDSK604	Stratagene; 48
pGhrcC	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcC	This study
pGhrcD	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcD	This study
pGhrcQ	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcQ	28
pGhrcU	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU	30
pGhrpB1	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrpB1	This study
pGhrpB2	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrpB2	68
pGhrpE	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrpE	29
pGxopA	pGEX-2TKM derivative encoding GST-XopA	51
pLAND-P	Derivative of suicide vector pOK1 carrying fragments of the <i>hpaFG</i> region, the <i>lac</i> promoter, and a triple c-Myc epitope-encoding sequence, Spec <sup>r</sup>	28
pLAND-PhrpB1	Derivative of pLAND-P containing <i>hrpB1</i> downstream of the native <i>hrpB1</i> promoter	This study
pRK2013	ColE1 replicon, TraRK <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	35
pUC57ΔBsaI	Derivative of pUC57 with mutated BsaI site	69
pOBID	Derivative of suicide plasmid pOK1 containing the flanking regions of <i>hrpB1</i>	24

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Km, kanamycin; Rif, rifampin; Gm, gentamicin; Spec, spectinomycin; r, resistant.

7.5, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5% glycerol, 0.1% Nonidet P-40), and broken with a French press. After 15 min incubation on ice, cell debris was removed by centrifugation and 450 µl lysates were incubated with 20 µl protein G agarose beads (Roche Applied Science) for 1 h at 4°C. The mixture was centrifuged for 90 s at 500 × g, and the supernatants were incubated with 45 µl protein G agarose in the presence or absence of 4 ng anti-c-Myc antibody overnight at 4°C. The protein G agarose was washed three times with lysis buffer and resuspended in 50 µl Laemmli buffer. Cell lysates and unbound and immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting.

**Peptidoglycan-binding assays.** The peptidoglycan-binding assay was performed as described in recent publications (43, 44). Briefly, lysozyme (AppliChem, Darmstadt, Germany), purified AvrBs3Δ2-His<sub>6</sub>, HrpB1-His<sub>6</sub>, or derivatives thereof dissolved in incubation buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0.05% Tween, pH 7.2) were centrifuged at 21,130 × g for 30 min at 4°C to precipitate insoluble proteins. The supernatants were incubated for 1 h at 4°C with 100 to 150 µg peptidoglycan from *E. coli* strain K-12 (InvivoGen, Toulouse, France). Insoluble peptidoglycan was collected by centrifugation at 21,130 × g for 20 min at 4°C and washed three times with incubation buffer to remove unbound proteins. Bound proteins were recovered by boiling the peptidoglycan pellet in 100 µl Laemmli buffer for 5 min. The bound and unbound proteins were analyzed by SDS-PAGE, Coomassie staining, and immunoblotting using anti-His<sub>6</sub> antibodies.

**GST pulldown assays.** For GST pulldown assays, *E. coli* cells from 50-ml cultures containing GST and GST fusion proteins were resuspended in 1 × PBS and broken with a French press. After centrifugation, comparable amounts of soluble GST and GST fusion proteins were immobilized on a glutathione-Sepharose matrix according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Unbound proteins were removed by washing twice with 1 × PBS, and the matrix was incubated with 600 µl *E. coli* cell lysates containing the putative interaction partners for 1 to 2 h at 4°C. After washing four times with 1 × PBS, bound proteins were eluted with 10 mM reduced glutathione at room temperature for 2 h. Four to 10 µl total protein lysates and 20 µl eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies specific for the c-Myc epitope and GST (Roche Applied Science).

**Subcellular fractionation studies.** Bacterial cytoplasm-, periplasm-, IM-, and OM-enriched fractions were separated as described previously (32, 45). Briefly, bacteria were grown in minimal medium A at pH 5.3 and resuspended in lysis buffer. Deionized water was added to generate spheroplasts. After ultracentrifugation, the supernatant, which contained the periplasm-enriched fraction, was removed. The pellet was dissolved in resuspension buffer, and spheroplasts were broken with an Ultra-Turrax disperser and a French press. Unbroken cells were removed by centrifugation, and the supernatant was separated into cytoplasm- and membrane-enriched fractions by ultracentrifugation. Subsequent ultracentrifugation steps led to the separation of IM- and OM-enriched fractions. Proteins in the cytoplasm-, periplasm-, and IM-enriched fractions were precipitated using trichloroacetic acid and sodium deoxycholate. Fifteen microliters of each fraction was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies specific for HrpB1, HrpB2, HrcJ, and HrcC.

## RESULTS

**Complementation studies with HrpB1 derivatives.** HrpB1 is conserved in *Xanthomonas* spp. (80 to 100% identity at the amino acid level), *Ralstonia solanacearum*, and species of *Burkholderia* and *Acidovorax* (approximately 30 to 40% amino acid sequence identity). Notably, the respective DNA region in *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 contains an ATG codon 24 bp upstream of the annotated GTG translation start codon and 13 bp downstream of the transcription start site of *hrpB1* (46, 70) (see Fig. S1 in the supplemental material). We therefore generated *hrpB1* expression constructs encoding the annotated HrpB1 protein (here referred to as HrpB1<sub>GTG</sub>) or a longer version with eight additional N-terminal

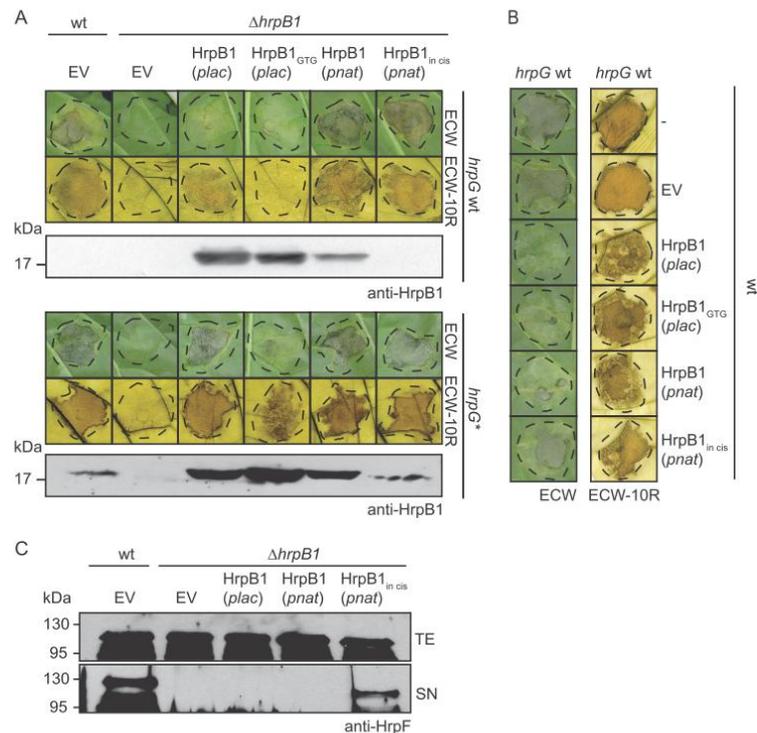
amino acids (referred to as HrpB1) under the control of the native *hrpB1* or the *lac* promoter. Immunoblot analysis of bacterial protein extracts showed that all HrpB1 derivatives were stably synthesized when analyzed in *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10Δ*hrpB1* (Fig. 1A).

For complementation studies, bacteria were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants, in which the hypersensitive response (HR) is induced upon recognition of the type III effector AvrBs1 (47, 48). The HR is rapid local plant cell death at the infection site and is activated upon recognition of individual effector proteins (also designated avirulence [Avr] proteins) (49). As expected, strain 85-10 induced water-soaked lesions in the ECW pepper plants and the HR in ECW-10R pepper plants, whereas no plant reactions were visible after inoculation of strain 85-10Δ*hrpB1* (Fig. 1A) (24). Wild-type symptom formation was restored upon ectopic expression of *hrpB1* under the control of the native promoter in strain 85-10Δ*hrpB1*. In contrast, *lac* promoter-driven expression of *hrpB1* only partially complemented the *hrpB1* mutant phenotype. No complementation was observed for the *lac* promoter-driven expression of *hrpB1*<sub>GTG</sub>, suggesting that the eight N-terminal amino acids of HrpB1 are required for protein function (Fig. 1A). As ectopic expression of *hrpB1* derivatives in the wild-type strain led to reduced disease symptom formation and HR induction, elevated HrpB1 levels presumably interfere with T3S and pathogenicity (Fig. 1B).

We also performed *in vitro* T3S assays with derivatives of strain 85-10*hrpG*\* (85\*), which contains *hrpG*\*, a mutated version of the key regulatory gene *hrpG* which allows the constitutive expression of T3S genes and also leads to the elicitation of faster plant reactions (27, 50–53). When bacteria were incubated in secretion medium, the putative translocon protein HrpF was detected in total cell extracts and the culture supernatant of strain 85\* but not those of strain 85\*Δ*hrpB1*, irrespective of the presence of *hrpB1* expression constructs (Fig. 1C). However, ectopic expression of *hrpB1* under the control of the native or the *lac* promoter fully restored the wild-type phenotype in strain 85\*Δ*hrpB1*, suggesting that secretion of HrpF was not completely abolished (Fig. 1A).

Given that the ectopic expression of *hrpB1* derivatives exerted a dominant negative effect on bacterial pathogenicity, we also introduced *hrpB1* under the control of the native promoter into the genomes of strains 85-10Δ*hrpB1* and 85\*Δ*hrpB1*. For this, we used the suicide vector pLAND-P, which allows the integration of genes by homologous recombination into the *hpaFG* region next to the *hrp* gene cluster, which can be used as a neutral site for genomic insertions (28, 54, 55). Notably, genomic *hrpB1* fully restored *in planta* symptom formation and also partially complemented the deficiency in HrpF secretion (Fig. 1A and C).

**HrpB1 localizes to the bacterial periplasm.** Next, we analyzed the subcellular localization of HrpB1 in *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85\*. For this, bacteria were incubated in T3S-permissive medium and bacterial cell extracts were separated by ultracentrifugation into cytoplasm-, periplasm-, IM-, and OM-enriched fractions. Immunoblot analyses revealed that HrpB1 predominantly localized to the periplasm-enriched fraction of strain 85\*, whereas only small amounts of HrpB1 were detected in the cytoplasm- and OM-enriched fractions when the blot was overexposed (Fig. 2A). As controls, we analyzed the localization of the OM secretin HrcC and the predicted IM ring protein HrcJ. HrcC was detected in all fractions,



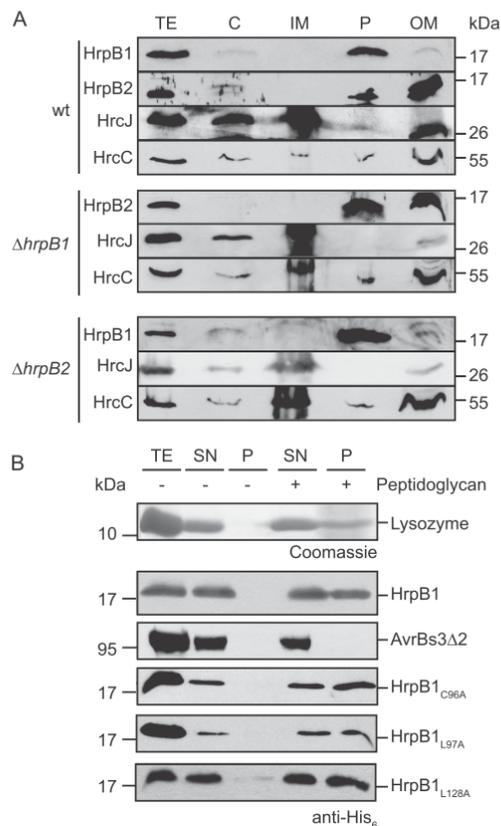
**FIG 1** Complementation studies with HrpB1 derivatives. (A) Genomic *hrpB1* expressed under the control of the native promoter restores the pathogenicity of *hrpB1* deletion mutant strains. *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85-10 (wild type [wt], *hrpG* wild type), 85-10 $\Delta hrpB1$  ( $\Delta hrpB1$ , *hrpG* wild type), 85\* (wild type, *hrpG*\*), and 85\* $\Delta hrpB1$  ( $\Delta hrpB1$ , *hrpG*\*) with plasmid pBRM (empty vector [EV]) or encoding HrpB1 or HrpB1<sub>GTG</sub> downstream of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter in *trans* or in *cis*, as indicated, were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed at 8 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol at 2 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas. For the immunodetection of HrpB1 and derivatives thereof, bacteria were grown in NYG medium and equal amounts of total cell extracts were analyzed by immunoblotting using a HrpB1-specific antibody. Note that *cis*-encoded HrpB1 is expressed only in the presence of *hrpG*\*, which activates *hrp* gene expression. (B) Ectopic expression of *hrpB1* exerts a negative effect on bacterial pathogenicity. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 (wild type) without an expression construct (-), carrying plasmid pBRM (EV) or encoding HrpB1 derivatives, as indicated, was inoculated into the leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms and the HR were documented as described for panel A. (C) In *cis*-encoded HrpB1 restores HrpF secretion in strain 85\* $\Delta hrpB1$ . Strains 85\* (wild type) and 85\* $\Delta hrpB1$  ( $\Delta hrpB1$ ) with plasmid pBRM (EV) or expressing *hrpB1* in *trans* or in *cis* (HrpB1<sub>*in cis*</sub>) under the control of the native (*pnat*) or the *lac* (*plac*) promoter, as indicated, were incubated in secretion medium. Total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by immunoblotting, using HrpF-specific antibodies. The upper band represents HrpF; the lower bands correspond to degradation products.

which was presumably caused by the presence of HrcC transport intermediates, as was reported previously (Fig. 2A) (26, 32). HrcJ was mainly present in the cytoplasm-, the IM-, and the OM-enriched fractions but was not detected or was detected only in small amounts in the periplasm-enriched fraction (Fig. 2A). The localization of HrcJ in the OM-enriched fraction might be caused by its predicted association with the OM secretin (18).

Interestingly, we also previously observed a periplasmic localization for the predicted inner rod protein HrpB2 (32). However, in contrast to HrpB1, similar amounts of HrpB2 were detected in the periplasm- and OM-enriched fractions. To investigate whether the periplasmic localization of HrpB1 depends on the presence of HrpB2 and vice versa, we performed additional fractionation studies with strains 85\* $\Delta hrpB1$  and 85\* $\Delta hrpB2$ . When bacteria were incubated in secretion medium, the localization of HrpB1 in strain 85\* $\Delta hrpB2$  was unaltered compared with that in the wild-type strain, 85\*. Similarly, HrpB2 was detected in the

periplasm- and the OM-enriched fractions of strain 85\* $\Delta hrpB1$ , as was observed for strain 85\*, suggesting that HrpB1 and HrpB2 localize to the periplasm independently of each other (Fig. 2A).

**HrpB1 associates with peptidoglycan *in vitro*.** The analysis of the predicted secondary structure of HrpB1 by PHYRE2 ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/)) revealed a potential structural similarity of the central region of HrpB1 (amino acids 18 to 91) with the C-terminal region of the U domain of the lytic transglycosylase Slt70 from *E. coli* (see Fig. S2 in the supplemental material). The U domain of Slt70 likely binds peptidoglycan, which is the major component of the bacterial cell wall (56, 57). To investigate a potential peptidoglycan-binding activity of HrpB1, a C-terminally His<sub>6</sub> epitope-tagged HrpB1 derivative was purified from *E. coli* and incubated with or without peptidoglycan. Lysozyme was used as a positive control. Protein-peptidoglycan complexes were collected by centrifugation, and proteins in the supernatant and the pellet were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining or immunoblotting. When incubated with peptidoglycan, lysozyme



**FIG 2** HrpB1 is a periplasmic protein and binds to peptidoglycan. (A) HrpB1 and HrpB2 colocalize to the bacterial periplasm. Strains 85\* (wild type), 85\* $\Delta$ hrpB2 ( $\Delta$ hrpB2), and 85\* $\Delta$ hrpB1 ( $\Delta$ hrpB1) were incubated in secretion medium, and fractions enriched in the cytoplasm (C), IM, periplasm (P), and OM were separated by ultracentrifugation. Bacterial total cell extracts and different fractions were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for HrpB1, HrpB2, HrcJ, and HrcC. (B) HrpB1 binds to peptidoglycan *in vitro*. Lysozyme, purified HrpB1-His<sub>6</sub>, derivatives thereof, and AvrBs3 $\Delta$ 2-His<sub>6</sub>, as indicated, were incubated in the absence (-) or presence (+) of peptidoglycan. Total protein extracts (TE) as well as proteins in the supernatant (SN) and the pellet (P) after centrifugation were analyzed by SDS-PAGE, Coomassie staining, or immunoblotting using His<sub>6</sub> epitope-specific antibodies.

was present in the supernatant and the pellet, as expected. In contrast, in the absence of peptidoglycan, lysozyme was detected only in the supernatant fraction, indicating that it did not precipitate during centrifugation (Fig. 2B). Similar results were observed for HrpB1-His<sub>6</sub> (Fig. 2B). To exclude the possibility that peptidoglycan binding was mediated by the His<sub>6</sub> epitope, we also purified a C-terminally His<sub>6</sub> epitope-tagged derivative of the transcription activator-like effector protein AvrBs3 (AvrBs3 $\Delta$ 2), which lacks the N-terminal 152 amino acids and has no predicted peptidoglycan-binding activity. AvrBs3 $\Delta$ 2-His<sub>6</sub> was mainly detected in the supernatant, suggesting that it did not associate with peptidoglycan (Fig. 2B). We conclude from these results that HrpB1-His<sub>6</sub> can bind peptidoglycan, which is in agreement with its predicted structural similarity with the U domain of Slt70. However, it should be noted that a possible interference of the C-terminal His<sub>6</sub> epitope with HrpB1 function has not yet been investigated. Pep-

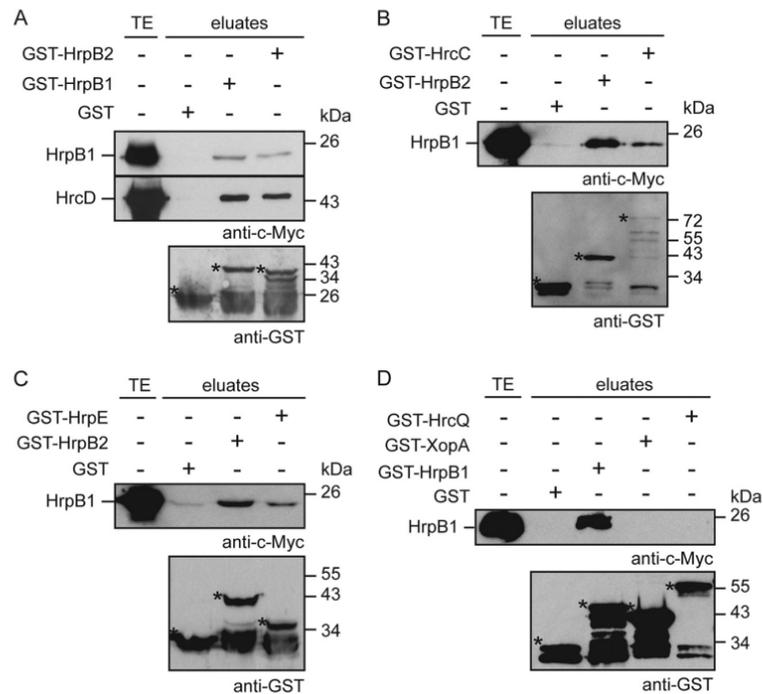
tidoglycan binding was also observed for HrpB1 derivatives carrying single amino acid exchanges at positions 96, 97, and 128 (Fig. 2B; see below).

**HrpB1 interacts with itself, the predicted inner rod protein HrpB2, and membrane-associated components of the T3S system.** To analyze a possible association of HrpB1 with components of the T3S system, we performed *in vitro* interaction studies. For this, GST and GST fusion proteins of HrpB1, the predicted inner rod protein HrpB2, the OM secretin HrcC, and the pilus protein HrpE were purified from *E. coli* using glutathione-Sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HrpB1-c-Myc. After elution of bound proteins, HrpB1-c-Myc was detected in the eluates of GST-HrpB1 and GST-HrpB2 but not of GST alone, suggesting that it interacts with itself and with HrpB2 (Fig. 3A). HrpB1-c-Myc also coeluted with GST-HrcC and GST-HrpE (Fig. 3B and C) but was not detected in the eluates of GST fusions of the putative translocon protein XopA and the predicted C-ring component HrcQ (Fig. 3D). We also investigated a possible interaction between HrpB1 and the IM-associated HrcD protein, which presumably forms a ring structure at the periplasmic site of the IM (18). A C-terminally c-Myc epitope-tagged derivative of HrcD was detected in the eluate of GST-HrpB1 but not in the eluate of GST alone, suggesting that it interacts with HrpB1 (Fig. 3A).

Given the interaction between HrpB1 and HrpB2 and their colocalization to the periplasm, we also investigated a possible interaction of HrpB2 with HrcC, HrpE, and HrcD (HrcU was analyzed as a positive control). HrpB2-c-Myc coeluted with GST-HrcU, as was observed previously (30), but was not detected in the eluates of GST-HrcC or GST-HrpE (see Fig. S3 in the supplemental material). Notably, however, we detected an interaction between GST-HrpB2 and HrcD-c-Myc, suggesting that HrcD is a common interaction partner of both HrpB1 and HrpB2 (Fig. 3A).

**HrpB1 forms protein complexes.** The finding that HrpB1 interacts with itself in *in vitro* pull-down assays prompted us to investigate whether HrpB1 is also present in protein complexes *in vivo*. For this, an *E. coli* isolate carrying a *hrpB1-c-myc* expression construct was incubated in the absence or presence of increasing concentrations of the membrane-permeant cross-linker DSS. The addition of 0.05 mM DSS led to the formation of protein complexes with a size of approximately 50 kDa (Fig. 4A; the expected size of monomeric HrpB1-c-Myc is approximately 20 kDa). Complex formation was also observed for a purified HrpB1-His<sub>6</sub> protein (Fig. 4B) as well as for untagged HrpB1 in *X. campestris* pv. vesicatoria (Fig. 4C) and even occurred in the absence of DSS, suggesting that the complexes were relatively stable. To confirm the observed HrpB1-HrpB1 interaction, we also performed coimmunoprecipitation studies with *X. campestris* pv. vesicatoria. For this, bacteria containing HrpB1-c-Myc or plasmid pBRM were grown under secretion-permissive conditions and bacterial lysates were incubated with or without protein G Sepharose-coupled anti-c-Myc antibodies. The native HrpB1 protein specifically coimmunoprecipitated with HrpB1-c-Myc but was not detected in the precipitate in the absence of HrpB1-c-Myc or the c-Myc epitope-specific antibody (Fig. 4D). We therefore conclude that HrpB1 and HrpB1-c-Myc are part of a common protein complex in *X. campestris* pv. vesicatoria.

**The N- and C-terminal regions of HrpB1 are dispensable for the interaction with the identified interaction partners.** To identify protein regions in HrpB1 that contribute to protein-protein interactions, we generated HrpB1 derivatives with deletions in the

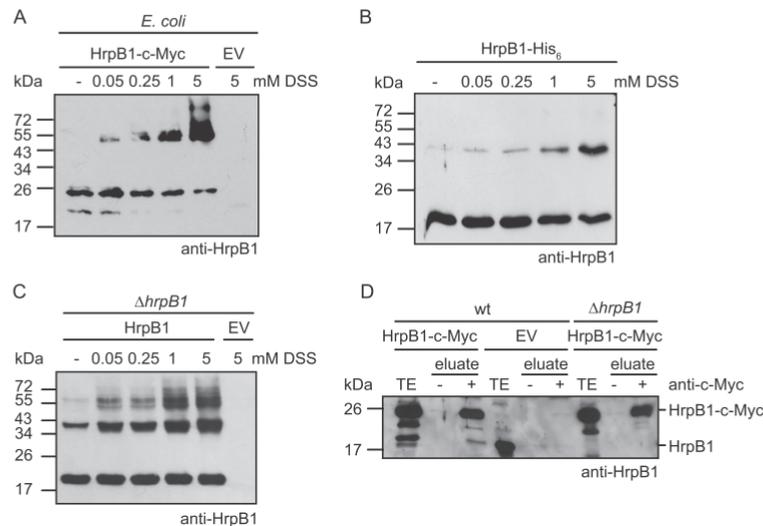


**FIG 3** Interaction studies with HrpB1 and HrpB2. (A) GST pull-down assays with HrpB1, HrpB2, and HrcD. GST, GST-HrpB1, and GST-HrpB2 were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrpB1-c-Myc or HrcD-c-Myc. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting, using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies, respectively. Asterisks mark GST and GST fusion proteins; additional signals presumably correspond to degradation products. (B) HrpB1 interacts with the OM secretin HrcC. GST, GST-HrpB2, and GST-HrcC were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrpB1-c-Myc. Total cell extracts and eluates were analyzed as described for panel A. (C) HrpB1 interacts with the pilus protein HrpE. GST, GST-HrpB2, and GST-HrpE were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrpB1-c-Myc. Total cell extracts and eluates were analyzed as described for panel A. (D) Interaction studies with HrpB1, XopA, and HrcQ. GST, GST-HrpB1, GST-XopA, and GST-HrcQ were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with a bacterial lysate containing HrpB1-c-Myc. Total cell extracts and eluates were analyzed as described for panel A.

N- or C-terminal protein regions (HrpB1 consisting of amino acids 11 to 159 [HrpB1<sub>11-159</sub>], HrpB1<sub>21-159</sub>, HrpB1<sub>1-139</sub>, and HrpB1<sub>1-149</sub>; amino acid position 1 refers to the methionine encoded by the predicted ATG translation initiation codon of *hrpB1* [see Fig. S1 in the supplemental material]). Furthermore, we introduced smaller internal deletions into the central protein region (see Fig. S4 in the supplemental material). All HrpB1 deletion derivatives were stably synthesized as C-terminally c-Myc epitope-tagged derivatives in *E. coli* and analyzed for their interactions with HrpB2, HrpE, and HrcD and a possible self-interaction. For this, GST-HrpB1, GST-HrpB2, GST-HrpE, and GST-HrcD were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HrpB1-c-Myc or deletion derivatives thereof. HrpB1<sub>11-159</sub>-c-Myc, HrpB1<sub>1-139</sub>-c-Myc, HrpB1<sub>1-149</sub>-c-Myc, HrpB1 with deletion of amino acids 69 to 79 (HrpB1<sub>Δ69-79</sub>)-c-Myc, and HrpB1<sub>Δ102-109</sub>-c-Myc coeluted with all GST fusion proteins but not with GST alone (Fig. 5A and B). In contrast, HrpB1<sub>21-159</sub>-c-Myc and HrpB1<sub>Δ91-97</sub>-c-Myc were not detected or only weakly detected in the eluates of GST fusion proteins, indicating that the deletions in these HrpB1 derivatives significantly interfered with the analyzed protein-protein interactions (Fig. 5A and B). HrpB1<sub>Δ116-128</sub>-c-Myc coeluted with GST fusions of HrpB1, HrpB2, and HrpE; however, reduced amounts of this derivative were detected in the eluate of GST-HrcD, suggesting that amino acids 116 to 128 spe-

cifically contribute to the interaction of HrpB1 with HrcD (Fig. 5B).

**Amino acid residues L22 and L97 of HrpB1 are required for its interaction with HrcD and/or with itself.** Given the possibility that deletions in HrpB1 interfere with protein folding, we also exchanged single amino acid residues that are conserved among HrpB1 and HrpK proteins for alanine (at positions 14, 22, 96, 97, and 128) (see Fig. S4 in the supplemental material). The corresponding HrpB1 point mutant derivatives were analyzed by *in vitro* interaction assays as described above. In addition to HrpB1, HrpB2, HrpE, and HrcD, we investigated the interactions of the HrpB1 point mutant derivatives with the OM secretin HrcC. Notably, however, none of the point mutations significantly interfered with the binding of HrpB1 to GST-HrcC (Fig. 6A). HrpB1 with the C14A mutation (HrpB1<sub>C14A</sub>)-c-Myc, HrpB1<sub>C96A</sub>-c-Myc, and HrpB1<sub>L128A</sub>-c-Myc coeluted with GST-HrpB1, GST-HrpB2, GST-HrpE, and GST-HrcD, suggesting that the C14A, C96A, and L128A mutations did not significantly interfere with the binding of HrpB1 to HrpB2, HrpE, HrcD, or itself (Fig. 6A). Reduced amounts of HrpB1<sub>L22A</sub>-c-Myc were detected in the eluate of GST-HrpB1. However, the binding of this derivative to GST-HrpB2, GST-HrpE, and GST-HrcD was not significantly affected (Fig. 6A). We also observed reduced levels of HrpB1<sub>L97A</sub>-c-Myc in the eluates of GST-HrpB1 and GST-HrcD, suggesting



**FIG 4** HrpB1 forms protein complexes. (A) HrpB1 complex formation in *E. coli*. *E. coli* carrying plasmid pBRM (empty vector [EV]) or encoding HrpB1-c-Myc was grown in LB medium and incubated without (–) or with increasing concentrations (final concentrations, 0.05 to 5 mM) of the cross-linking reagent DSS. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using HrpB1-specific antibodies. (B) Complex formation of purified HrpB1. Purified HrpB1-His<sub>6</sub> was incubated without (–) or with DSS as described for panel A. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using HrpB1-specific antibodies. (C) HrpB1 complex formation in *X. campestris* pv. vesicatoria. Strain 85-10ΔhrpB1 carrying plasmid pBRM (EV) or construct pBRMhrpB1<sub>Stop</sub> (HrpB1) was grown in NYG medium and incubated without (–) or with increasing concentrations of DSS, as indicated. Protein extracts were analyzed as described for panel A. (D) HrpB1 coimmunoprecipitates with HrpB1-c-Myc. *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85\* and 85\*ΔhrpB1 containing HrpB1-c-Myc or plasmid pBRM (EV), as indicated, were grown in secretion medium. Bacterial lysates were incubated in the presence (+) or absence (–) of c-Myc epitope-specific antibodies coupled to protein G Sepharose. Bacterial total cell extracts (TE) and precipitated proteins (eluate) were analyzed by immunoblotting using HrpB1-specific antibodies.

that the L97A mutation specifically affects the interaction of HrpB1 with itself and with HrcD (Fig. 6A). Notably, the L22A and L97A mutations in HrpB1 also led to reduced HrpB1 complex formation *in vivo*. Thus, when total cell extracts of strain 85\*ΔhrpB1 encoding HrpB1, HrpB1<sub>L22A</sub>, or HrpB1<sub>L97A</sub> under the control of the native promoter were analyzed by immunoblotting, we detected a HrpB1-specific protein complex in strains containing HrpB1 but did not detect the complex or detected only reduced amounts of the complex in the presence of HrpB1<sub>L22A</sub> or HrpB1<sub>L97A</sub> (Fig. 6B).

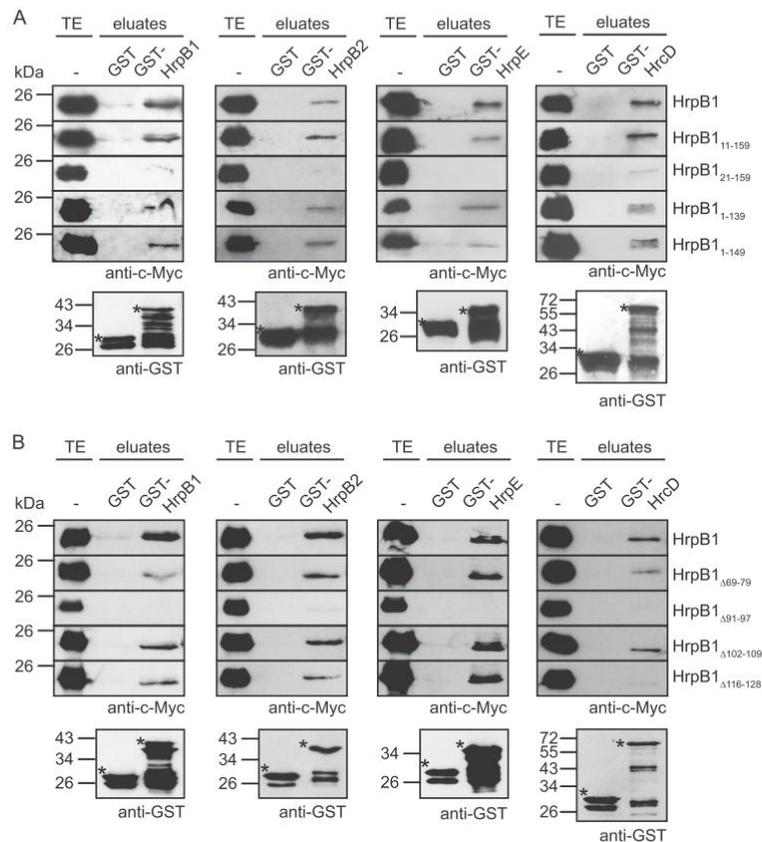
**Amino acid residues C96 and L128 are required for protein function.** To investigate whether deletions and point mutations in HrpB1 affect protein function, *hrpB1* derivatives without a C-terminal c-Myc epitope-encoding sequence were ectopically expressed under the control of the native promoter in *X. campestris* pv. vesicatoria *hrpB1* deletion mutant strains. HrpB1<sub>1-139</sub> and HrpB1<sub>1-149</sub> complemented the *in planta* mutant phenotype of strain 85\*ΔhrpB1 but not that of strain 85-10ΔhrpB1. No complementation was observed for HrpB1<sub>11-159</sub> or HrpB1<sub>21-159</sub> or for HrpB1 derivatives with internal deletions (Table 2; see Fig. S5 in the supplemental material). The analysis of HrpB1 point mutant derivatives revealed that only HrpB1<sub>C14A</sub> partially restored HR induction, but it did not restore disease symptom formation in strain 85-10ΔhrpB1 (Table 2; see Fig. S5 in the supplemental material). In strain 85\*ΔhrpB1, however, HrpB1<sub>C14A</sub> fully restored plant reactions, whereas HrpB1<sub>L22A</sub> and HrpB1<sub>L97A</sub> partially complemented the *hrpB1* mutant phenotype. No complementation was observed for HrpB1 derivatives with C96A and L128A mutations (Table 2; see Fig. S5 in the supplemental material).

Immunoblot analysis of bacterial cell extracts revealed that all

HrpB1 derivatives were stably synthesized (data not shown). Furthermore, when analyzed in strain 85-10, HrpB1 deletion derivatives did not significantly interfere with the wild-type *in planta* phenotype, suggesting that the lack of complementation was not caused by possible dominant negative effects (see Fig. S6 in the supplemental material). A slight dominant negative effect on disease symptom formation was observed for the loss-of-function HrpB1 derivatives with C96A and L128A mutations, possibly because they compete with the wild-type HrpB1 protein for the interaction with T3S system components (see Fig. S6 in the supplemental material). However, this was probably unrelated to the lack of complementation by these derivatives because we observed a similar dominant negative effect for the expression construct encoding the wild-type HrpB1 protein which complements the *hrpB1* mutant phenotype (see Fig. S6 in the supplemental material; see also above). Taken together, we conclude that internal and N-terminal deletions as well as the C96A and L128A exchanges abolish HrpB1 function. In contrast, the C-terminal 20 amino acids of HrpB1 as well as the conserved amino acid residues C14, L22, and L97 contribute to but are not essential for pathogenicity.

## DISCUSSION

The present study provides the first functional characterization of HrpB1, a member of the HrpB1/HrpK family of proteins with unknown functions from *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum*, and *Burkholderia* spp. We show that HrpB1 from *X. campestris* pv. vesicatoria localizes to the bacterial periplasm and interacts with IM- and OM-associated components of the T3S system. The periplasmic localization of HrpB1 and its association with T3S system components are in agreement with the previous

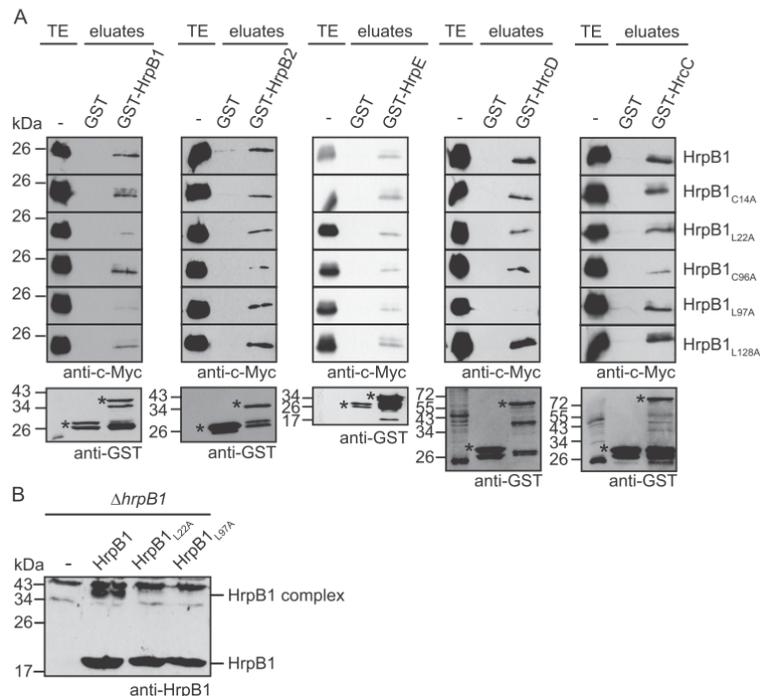


**FIG 5** Interaction studies with HrpB1 deletion derivatives. (A) Amino acids 11 to 20 of HrpB1 contribute to the interaction of HrpB1 with itself, HrpB2, HrpE, and HrcD. GST, GST-HrpB1, GST-HrpB2, GST-HrpE, and GST-HrcD were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrpB1-c-Myc, HrpB1<sub>11-159</sub>-c-Myc, HrpB1<sub>21-159</sub>-c-Myc, HrpB1<sub>1-139</sub>-c-Myc, and HrpB1<sub>1-149</sub>-c-Myc, as indicated. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting, using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies. Asterisks mark GST and GST fusion proteins; additional signals presumably correspond to degradation products. (B) Protein-protein interaction studies with HrpB1 derivatives containing internal deletions. GST, GST-HrpB1, GST-HrpB2, GST-HrpE, and GST-HrcD were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrpB1-c-Myc and deletion derivatives thereof, as indicated. Total cell extracts and eluates were analyzed as described for panel A.

finding that HrpB1 is not secreted by the T3S system (24). HrpB1 interacts with itself and forms protein complexes, which is a predicted feature of inner rod proteins. This was shown, e.g., for the putative inner rod protein EscI from enteropathogenic *E. coli* (58). It is therefore conceivable that HrpB1 participates in the assembly of a periplasmic polymeric substructure of the T3S system that is associated with the IM and OM rings and might correspond to the predicted inner rod.

One of the putative ring components of the T3S system at the periplasmic side of the IM is HrcD, which belongs to the conserved YscD family of T3S system proteins and was identified as a potential HrpB1 interactor. YscD family members contain an N-terminal cytoplasmic domain and a C-terminal periplasmic domain and were shown to interact with the OM secretin and needle subunits from animal-pathogenic bacteria, suggesting a connection of the IM ring to the secretin and the needle (18). In addition to HrcD, we identified the secretin HrcC, the pilus protein HrpE, and the predicted inner rod protein HrpB2 from *X. campestris* pv. vesicatoria as putative interaction partners of HrpB1. For the anal-

ysis of protein-protein interactions, *in vitro* pulldown assays were performed with C-terminally c-Myc epitope-tagged HrpB1 derivatives or GST-HrpB1 fusions. The influence of the N-terminal GST fusion on HrpB1 function has not yet been tested; however, complementation studies revealed that the C-terminal c-Myc epitope interferes with HrpB1 function (data not shown). Therefore, it remains to be investigated in future studies whether HrcD, HrcC, HrpE, and HrpB2 also interact with the native HrpB1 protein. Given that HrpB1 is presumably a periplasmic component of the T3S system, the results of our interaction studies suggest that the pilus protrudes into the periplasm. A similar scenario was predicted for T3S needles from *Salmonella* spp. that presumably sit atop the inner rod structure (7, 9, 11, 59). Notably, we did not detect an interaction of the predicted inner rod protein HrpB2 from *X. campestris* pv. vesicatoria with HrcC and HrpE. Thus, it is possible that HrpB1 acts as a linker between HrpB2 and OM components of the T3S system. However, given that HrpB1 was predominantly detected in the periplasm-enriched fraction, we assume that the interactions of HrpB1 with the IM and OM



**FIG 6** Interaction studies with HrpB1 point mutant derivatives. (A) GST, GST-HrpB1, GST-HrpB2, GST-HrpE, GST-HrcD, and GST-HrcC were immobilized on glutathione-Sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrpB1–c-Myc or point mutant derivatives thereof, as indicated. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting, using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies. Asterisks mark GST and GST fusion proteins; additional signals presumably correspond to degradation products. (B) L22A and L97A mutations in HrpB1 interfere with complex formation. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85\* $\Delta hrpB1$  containing plasmid pBRM (–) or expression constructs encoding HrpB1, HrpB1<sub>L22A</sub>, or HrpB1<sub>L97A</sub> under the control of the native promoter were incubated in secretion medium. Equal amounts of total cell extracts were analyzed by immunoblotting using HrpB1-specific antibodies. The lower band corresponds to HrpB1; the upper band that is detected in all lanes results from unspecific binding of the antibody.

components of the T3S system are too transient to stably anchor HrpB1 to the bacterial membranes.

In contrast to HrpB1, comparable amounts of HrpB2 localize to the periplasm and the OM, suggesting that HrpB2 associates with OM components. It remains to be investigated whether HrpB2 can interact with HrcC and/or HrpE in the context of the assembled T3S system. HrpB2 was previously shown to be secreted by the T3S system and to be required for pilus formation (24, 31). However, HrpB2 is presumably not associated with the extracellular pilus structure, suggesting that it is part of the predicted periplasmic inner rod of the T3S system which might contribute to the stable anchoring of the T3S pilus (7, 10, 11, 32). The putative function of HrpB2 as an inner rod protein was supported by the identification of a functionally important C-terminal VX TLXK amino acid motif in HrpB2 that is also present in predicted inner rod proteins from animal-pathogenic bacteria (32). The putative interaction of HrpB2 with HrpB1 and the colocalization of both proteins to the bacterial periplasm suggest that they are part of a common protein complex. This model is supported by the identification of HrcD as a potential interaction partner of both HrpB1 and HrpB2. In future studies, we will investigate the stoichiometry of the predicted HrpB1-HrpB2 complex and also attempt to obtain a cocrystal. Notably, it is not yet shown whether the predicted inner rod of translocation-associated T3S systems

can consist of several proteins, as is presumably the case for the inner rod structure of the flagellar T3S system (60).

Interestingly, the analysis of the predicted secondary structure of HrpB1 by PHYRE ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/)) uncovered a structural similarity of HrpB1 with the putative peptidoglycan-binding domain of the lytic transglycosylase Slt70 from *E. coli*. In agreement with the predicted peptidoglycan-binding domain and periplasmic localization of HrpB1, purified HrpB1-His<sub>6</sub> binds to peptidoglycan. We therefore assume that HrpB1 is involved in the anchoring of the T3S system to the bacterial envelope. Lytic transglycosylases degrade peptidoglycan and often contribute to the assembly of protein secretion systems because the natural pores of peptidoglycan have a diameter of approximately 2 nm and are thus too narrow to allow the assembly of membrane-spanning macromolecular protein complexes (61–63). One predicted lytic transglycosylase of the T3S system from *X. campestris* pv. vesicatoria is HpaH, which is encoded in the flanking region of the *hrp* gene cluster but does not share sequence similarity with HrpB1 (52, 54). In contrast to HpaH, HrpB1 lacks homology to the catalytic region of lytic transglycosylases and is therefore presumably not involved in the degradation of peptidoglycan.

The analysis of HrpB1 mutant derivatives revealed that the C-terminal 20 amino acid residues contribute to but are not essential for the contribution of HrpB1 to pathogenicity. In con-

TABLE 2 Characteristics of HrpB1 mutant derivatives

HrpB1 derivative <sup>a</sup>	Complementation of <i>hrpB1</i> mutant phenotype <sup>b</sup>		Results of <i>in vitro</i> interaction studies <sup>c</sup>					
	85-10 $\Delta$ <i>hrpB1</i>	85* $\Delta$ <i>hrpB1</i>	HrpB1	HrpB2	HrpE	HrcD	HrcC	Peptidoglycan
HrpB1	+	+	+	+	+	+	+	+
HrpB1 <sub>11-159</sub>	–	–	+	+	+	+	NA	NA
HrpB1 <sub>21-159</sub>	–	–	+/-	–	–	+/-	NA	NA
HrpB1 <sub>1-139</sub>	+/-	+/-	+	+	+	+	NA	NA
HrpB1 <sub>1-149</sub>	–	+/-	+	+	+	+	NA	NA
HrpB1 $\Delta$ <sub>69-79</sub>	–	–	+	+	+	+	NA	NA
HrpB1 $\Delta$ <sub>91-97</sub>	–	–	–	–	–	–	NA	NA
HrpB1 $\Delta$ <sub>102-109</sub>	–	–	+	+	+	+	NA	NA
HrpB1 $\Delta$ <sub>116-128</sub>	–	–	+	+	+	–	NA	NA
HrpB1 <sub>C14A</sub>	+/-	+	+	+	+	+	+	NA
HrpB1 <sub>L22A</sub>	–	+/-	+/-	+	+	+	+	NA
HrpB1 <sub>C96A</sub>	–	–	+	+	+	+	+	+
HrpB1 <sub>L97A</sub>	–	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+
HrpB1 <sub>L128A</sub>	–	–	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> The corresponding genes were expressed in strains 85-10 $\Delta$ *hrpB1* and 85\* $\Delta$ *hrpB1* under the control of the native promoter.

<sup>b</sup> HrpB1 derivatives were analyzed for their ability to complement the mutant phenotypes of strains 85-10 $\Delta$ *hrpB1* and 85\* $\Delta$ *hrpB1* with respect to disease symptom formation in susceptible plants and HR induction in resistant pepper plants. +, wild-type symptom formation; +/-, partial complementation of the *hrpB1* mutant phenotype; –, no visible plant reactions.

<sup>c</sup> Protein-protein interactions were analyzed by GST pulldown assays. +, interaction or peptidoglycan binding; +/-, the amounts of the interaction partner in the eluates were reduced compared with those of the wild-type HrpB1 protein; –, no detectable interaction; NA, not analyzed. The interaction with peptidoglycan was analyzed by an *in vitro* binding assay using purified HrpB1-His<sub>6</sub> or derivatives thereof and peptidoglycan.

trast, the N-terminal 10 amino acids as well as internal regions in HrpB1 are crucial for protein function. When HrpB1 derivatives were analyzed for their interactions with known HrpB1 interaction partners, we observed a loss or significant reduction of detectable protein-protein interactions for HrpB1 $\Delta$ <sub>91-97</sub> and HrpB1<sub>21-159</sub>. Furthermore, a reduced interaction of HrpB1 $\Delta$ <sub>116-128</sub> and HrpB1<sub>L97A</sub> with HrcD was detected. As the deletion of amino acids 116 to 128 and the L97A exchange did not affect the binding of HrpB1 to other analyzed interaction partners, it is unlikely that these HrpB1 derivatives were completely misfolded. The L97A mutation led to a severe reduction of protein function and also impaired the self-interaction of HrpB1, suggesting that HrpB1 complex formation and the interaction with HrcD are required for the contribution of HrpB1 to bacterial pathogenicity. A negative effect on the HrpB1-HrpB1 interaction was also observed for HrpB2<sub>L22A</sub>, which still interacted with HrpB2, HrpE, and HrcD but was only partially functional. Notably, however, the observed *in vitro* interactions of HrpB1 with itself, HrpB2, HrpE, HrcD, HrcC, and peptidoglycan are presumably not sufficient for HrpB1 function, because HrpB1 derivatives with C96A or L128A exchanges, which still interacted with all tested HrpB1 interaction partners and peptidoglycan, did not complement the *hrpB1* mutant phenotype. It is also possible that C96A and L128A mutations interfere with the interaction of HrpB1 with T3S system components *in vivo*. As C96A and L128A mutations did not affect the efficient *in vitro* binding of HrpB1 to peptidoglycan, we assume that the role of HrpB1 likely depends on additional yet unknown features of the protein. Future studies will therefore focus on the identification of HrpB1 interaction partners in the context of the assembled T3S system and the functional characterization of the respective binding sites in HrpB1. The proof of specific and direct interactions among T3S system components *in vivo* is technically challenging and will deepen our understanding of the assembly and function of T3S systems from both plant- and animal-pathogenic bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to U. Bonas for critical comments on the manuscript and to T. Schreiber for providing construct pDEST17:356.

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU2145/1-2 and BU 2145/5-1) and the Collaborative Research Centre SFB 648 to D.B.

## REFERENCES

1. Leyns F, De Cleene M, Swings J, De Ley J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. Bot. Rev. 50:305–355.
2. Chan JWYF, Goodwin PH. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Adv. 17:489–508.
3. Ghosh P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:771–795.
4. Francis MR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ. 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. J. Mol. Biol. 235:1261–1270.
5. DePamphilis ML, Adler J. 1971. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 105:384–395.
6. Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretome. Mol. Microbiol. 39:652–663.
7. Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galan JE, Unger VM. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. Science 306:1040–1042.
8. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science 280:602–605.
9. Sani M, Allaoui A, Fusetti F, Oostergetel GT, Keegstra W, Boekema EJ. 2007. Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. Micron 38:291–301.
10. Wood S, Jin J, Lloyd SA. 2008. YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. J. Bacteriol. 190:4252–4262.
11. Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galan JE. 2006. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. Nature 441:637–640.
12. He SY, Nomura K, Whittam TS. 2004. Type III protein secretion mech-

- anism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694: 181–206.
13. Gonzalez-Pedrajo B, Minamino T, Kihara M, Namba K. 2006. Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol. Microbiol.* 60:984–998.
  14. McMurry JL, Murphy JW, Gonzalez-Pedrajo B. 2006. The FlhN-FlhH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FlhI to the C ring complex. *Biochemistry* 45:11790–11798.
  15. Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, Yoshida M, Katayama E, Sasakawa C. 2006. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J. Biol. Chem.* 281:599–607.
  16. Spaeth KE, Chen YS, Valdivia RH. 2009. The *Chlamydia* type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex. *PLoS Pathog.* 5:e1000579. doi:10.1371/journal.ppat.1000579.
  17. Akeda Y, Galan JE. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437:911–915.
  18. Büttner D. 2012. Protein export according to schedule—architecture, assembly and regulation of type III secretion systems from plant and animal pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:262–310.
  19. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR. 2008. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol. Microbiol.* 68:1085–1095.
  20. Mattei PJ, Faudry E, Job V, Izore T, Attree I, Dessen A. 2011. Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J.* 278:414–426.
  21. Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:755–762.
  22. Büttner D, Bonas U. 2002. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21:5313–5322.
  23. Büttner D, Bonas U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:107–133.
  24. Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U. 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* 38:828–838.
  25. Huguet E, Bonas U. 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:488–498.
  26. Wengelnik K, Marie C, Russel M, Bonas U. 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* 178:1061–1069.
  27. Lorenz C, Büttner D. 2009. Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 191:1414–1428.
  28. Lorenz C, Hausner J, Büttner D. 2012. HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. *PLoS One* 7:e51063. doi:10.1371/journal.pone.0051063.
  29. Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U. 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocator protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 184:2389–2398.
  30. Lorenz C, Schulz S, Wolsch T, Rossier O, Bonas U, Büttner D. 2008. HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog.* 4:e1000094. doi:10.1371/journal.ppat.1000094.
  31. Weber E, Ojanen-Reuhs T, Huguet E, Hause G, Romantschuk M, Korhonen TK, Bonas U, Koebnik R. 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* 187:2458–2468.
  32. Hartmann N, Schulz S, Lorenz C, Fraas S, Hause G, Büttner D. 2012. Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* 158:1334–1349.
  33. Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Cleary WG, Sawczyk MK. 1984. Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.* 130:2447–2455.
  34. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). 1996. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY.
  35. Figurski D, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:1648–1652.
  36. Minsavage GV, Dahlbeck D, Whalen MC, Kearny B, Bonas U, Staskawicz BJ, Stall RE. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3:41–47.
  37. Kousik CS, Ritchie DF. 1998. Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogens that individually overcome major resistance genes. *Plant Dis.* 82:181–186.
  38. Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, Stall RE. 1991. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:81–88.
  39. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3:e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647.
  40. Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Coge V, Bonas U, Büttner D. 2010. Functional characterization of the Xps and Xcs type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol.* 187:983–1002.
  41. Huguet E, Hahn K, Wengelnik K, Bonas U. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* 29:1379–1390.
  42. Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:9368–9373.
  43. Scheurwater EM, Clarke AJ. 2008. The C-terminal domain of *Escherichia coli* YfhD functions as a lytic transglycosylase. *J. Biol. Chem.* 283:8363–8373.
  44. Ursinus A, van den Ent F, Brechtel S, de Pedro M, Holtje JV, Lowe J, Vollmer W. 2004. Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:6728–6737.
  45. Thein M, Sauer G, Paramasivam N, Grin I, Linke D. 2010. Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. *J. Proteome Res.* 9:6135–6147.
  46. Schmidtke C, Findeiss S, Sharma CM, Kuhfuss J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U. 2012. Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Res.* 40:2020–2031.
  47. Ronald PC, Staskawicz BJ. 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1:191–198.
  48. Escolar L, Van den Ackerveken G, Pieplow S, Rossier O, Bonas U. 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* 2:287–296.
  49. Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
  50. Wengelnik K, Rossier O, Bonas U. 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* 181:6828–6831.
  51. Büttner D, Gürlebeck D, Noël LD, Bonas U. 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* 54:755–768.
  52. Büttner D, Noël L, Stuttmann J, Bonas U. 2007. Characterization of the non-conserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:1063–1074.
  53. Lorenz C, Büttner D. 2011. Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol. Microbiol.* 79:447–467.
  54. Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U. 2002. Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* 184:1340–1348.
  55. Tamir-Ariel D, Navon N, Burdman S. 2007. Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *J. Bacteriol.* 189:6359–6371.
  56. van Asselt EJ, Thunnissen AM, Dijkstra BW. 1999. High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J. Mol. Biol.* 291:877–898.
  57. Walderich B, Holtje JV. 1991. Subcellular distribution of the soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:5668–5676.
  58. Sal-Man N, Deng W, Finlay BB. 2012. EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 442:119–125.
  59. Schraidt O, Lefebvre MD, Brunner MJ, Schmed WH, Schmidt A,

- Radics J, Mechtler K, Galan JE, Marlovits TC. 2010. Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* 6:e1000824. doi:10.1371/journal.ppat.1000824.
60. Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM. 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 211:465–477.
61. Koraimann G. 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2371–2388.
62. Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ. 2008. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:586–591.
63. Scheurwater EM, Burrows LL. 2011. Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer. *FEMS Microbiol. Lett.* 318:1–9.
64. Canteros BI. 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL.
65. Ménard R, Sansonetti PJ, Parsot C. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175:5899–5906.
66. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson MA, Farris MA, Roop RM, II, Peterson KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175–176.
67. Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* 46:13–23.
68. Schulz S, Büttner D. 2011. Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*. *Infect. Immun.* 79:2998–3011.
69. Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, Lahaye T. 2011. Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res.* 39:5790–5799.
70. Fenselau S, Bonas U. 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:845–854.

## 2.2.2 Anhang der Publikation II

A

```

HrpB1Xcv      1 MCGWPGEAGMICSPANSDIRFRKDPAGVASVAFPTCTVRMPLKTRCSVEKIQCPGSVVSG
HrpB1Xac      1 -----VIKTRCSMEKIQCPGSVVSG
HrpB1Xag      1 -----VYGPHEMEKIQCPGSVVSG
HrpB1Xp       1 MCGWPGEAGMICSPANSDIRFRKDPAGVASVAFPTCTVRMPLKTRCSVEKIQCPGSVVSG
HrpB1Xoc      1 MCGWPGEAGMICSPATSDIRFRKDLTGVARVALPAGKVRMPLKARCSVEKIQCPGSVVSG
HrpB1Xoo      1 -----VEKIQCPGSVMSG
HrpB1Xcc      1 -----MKRCGMEKIECPGSVVSG

HrpB1Xcv     22 LIELITVGLTHEKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVEGARLLRE...
HrpB1Xac     14 LIELITVGLTHDKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVEGARLLRE...
HrpB1Xag     14 LIELITVGLTHDKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVEGARLLRE...
HrpB1Xp      22 LIELITVGLTHEKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVEGARLLRE...
HrpB1Xoc     61 LIELITVGLTHEKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVDGARLLRE...
HrpB1Xoo      4 LIELITVGLTHEKIQDAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWISIKRGNYVDGARLLRE...
HrpB1Xcc     14 LIELITVGLTHEKIEEAAAVLAAVRVLRPELKALDTFDAWIAIKRGSYVEGARLLRE...

```

B

```

atg att tgt tgc cca gcg aat tcc gat att cgc ttc cga aag gat ccg gcc ggc
 M   I   C   S   P   A   N   S   D   I   R   F   R   K   D   P   A   G

gtg gcg agc gta gcg ttc ccc acg gtg tgt acg gtc cgc atg cca tta aaa acg agg
 V   A   S   V   A   F   P   T   C   T   V   R   M   P   L   K   T   R

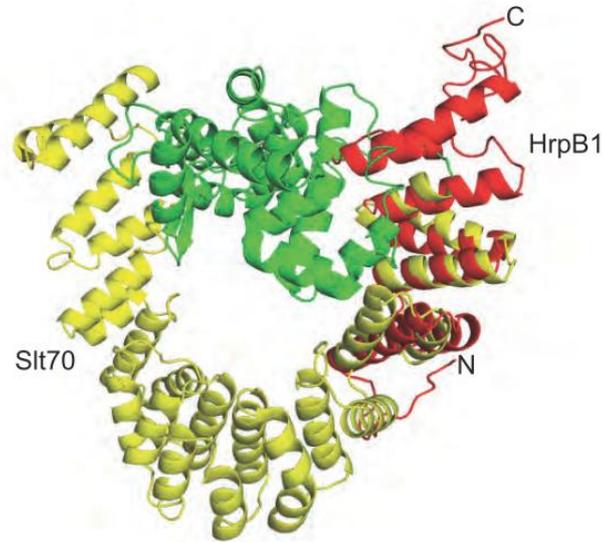
tgc agt gtg ...
 C   S   V   ...

```

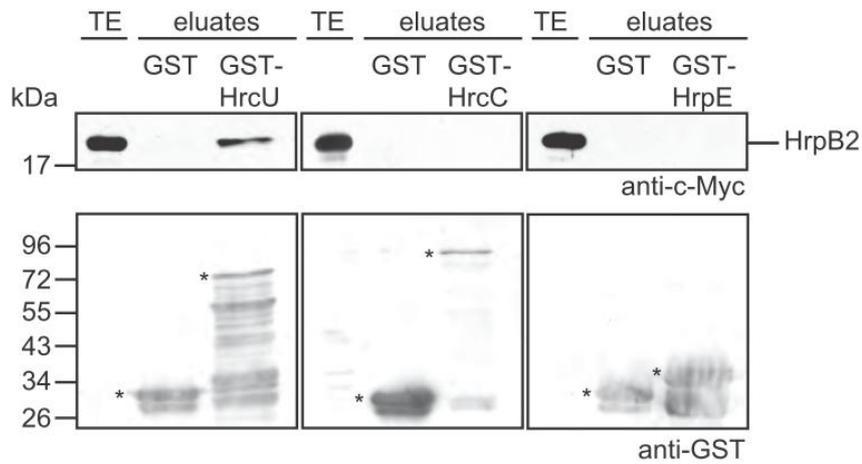
**Fig. S1** Sequence alignment of HrpB1 proteins from *Xanthomonas* spp.

(A) Comparative analysis of the N-terminal amino acid sequences of the annotated HrpB1 proteins from *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*, accession number CAJ22058.1), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*, accession number NP\_640762.1), *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*, accession number AAP34344.1), *Xanthomonas perforans* (*Xp*, accession number EGD13393.1), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99A (*Xoo*, accession number ACD56747.1), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*, accession number AAX40641.1) and *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*, accession number AAM40529.1). Sequences were aligned using ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)). Numbers refer to amino acids. Identical amino acids are shaded in black, amino acids with similar chemical properties in grey. Amino acid sequences refer to the annotated proteins. Amino acids that could be encoded by sequences upstream of the annotated translation initiation sites of HrpB1 proteins are shown in grey.

(B) Sequence of the 5'-upstream region of the annotated *hrpB1* gene from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The arrow indicates the transcription start site (46, 70), letters refer to amino acid residues. The annotated GTG and the alternative ATG translation initiation codons are underlined.



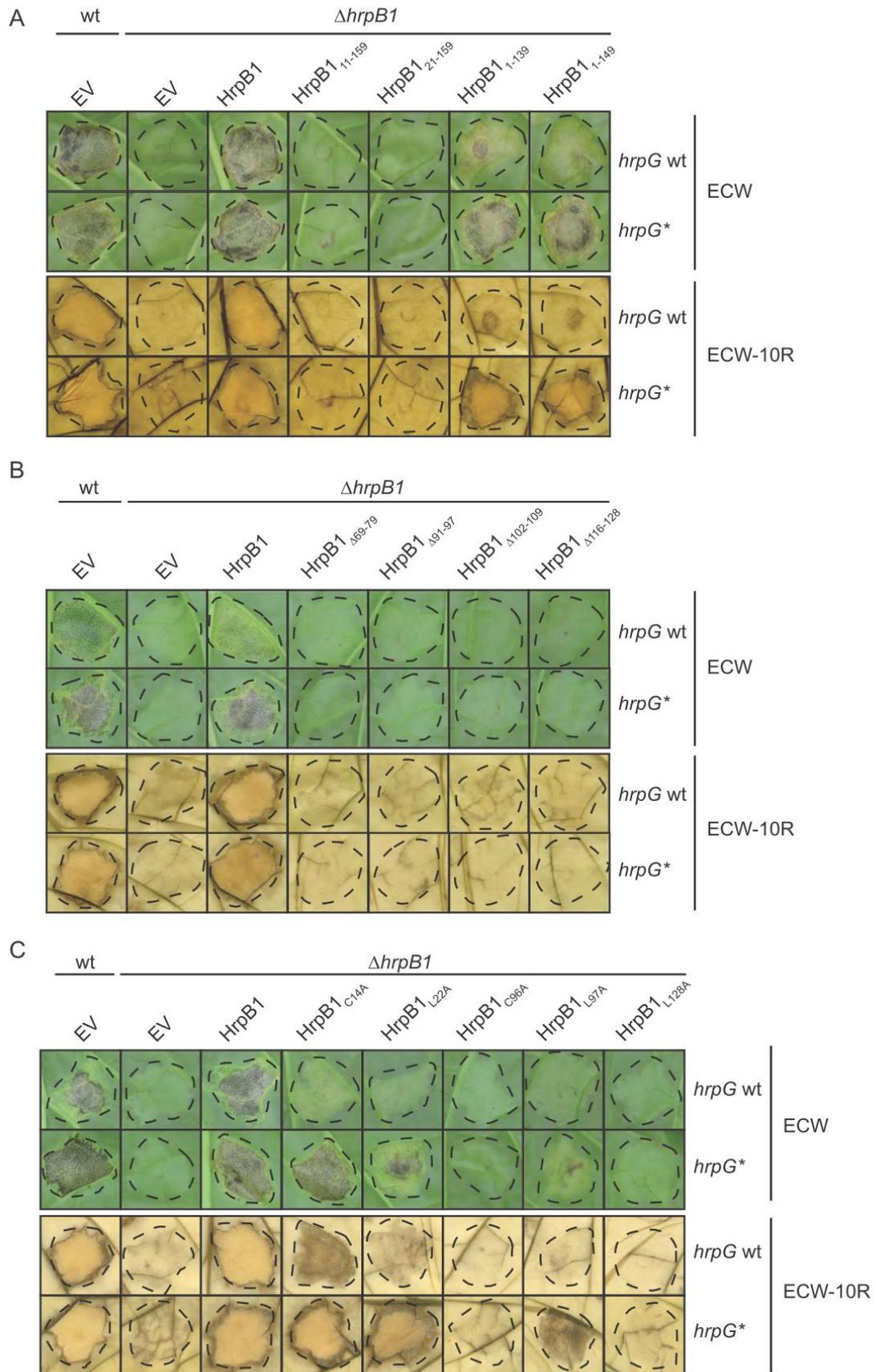
**Fig. S2** Overlay of the Slt70 structure and the predicted HrpB1 structure. The structure of HrpB1 was predicted by PHYRE (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>) and aligned with the structure of Slt70 (PDB ID: 1QSA) from *E. coli* using the PyMOL software (<http://www.pymol.org/>). HrpB1 is shown in red, the U domain of Slt70 in yellow and additional Slt70 protein regions in green. N (N) and C (C) terminus of HrpB1 are indicated.



**Fig. S3** HrpB2-c-Myc does not interact with GST-HrcC and GST-HrpE.

GST and GST fusions of HrcU (analyzed as a positive control), HrcC and HrpE were immobilized on glutathione sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HrpB2-c-Myc. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (eluates) were analyzed by immunoblotting, using c-Myc epitope- and GST-specific antibodies, respectively. Asterisks mark GST and GST fusion proteins, additional signals presumably correspond to degradation products.



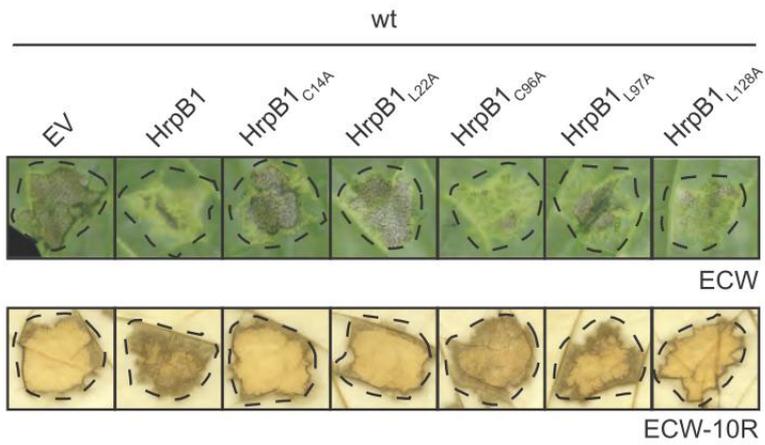
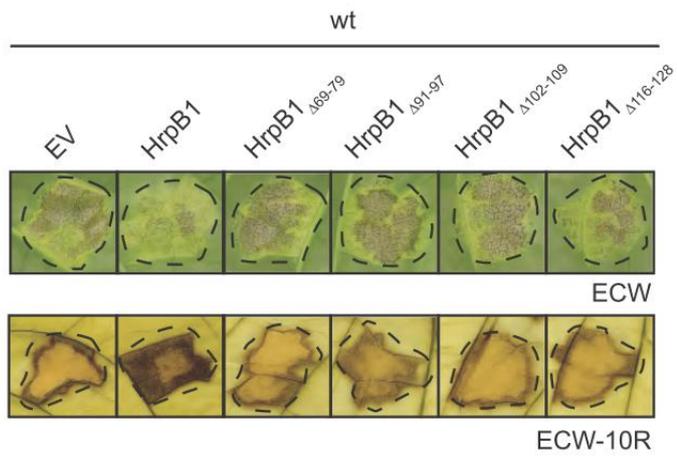
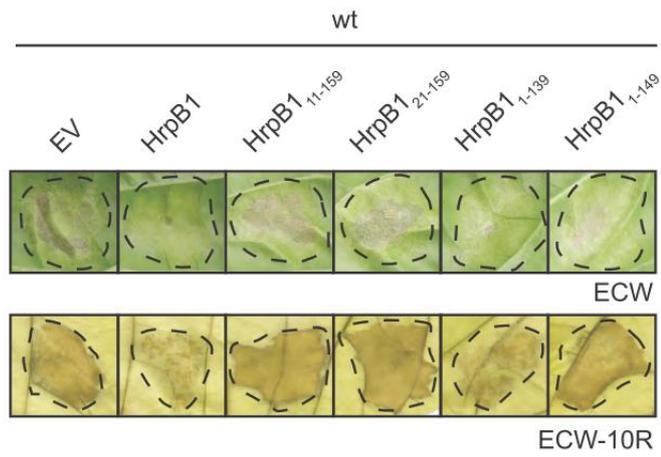


**Fig. S5** Complementation studies with HrpB1 mutant derivatives.

(A) Deletions in the N- and C-terminal regions of HrpB1 interfere with protein function. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 (wt, *hrpG* wt), 85-10 $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG* wt), 85\* (wt, *hrpG*\*) and 85\* $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG*\*) carrying plasmid pBRM (EV) or encoding HrpB1 or deletion derivatives thereof as indicated under control of the native promoter were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 8 dpi. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas.

(B) Internal deletions in HrpB1 lead to a loss of protein function. Strains 85-10 (wt, *hrpG* wt), 85-10 $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG* wt), 85\* (wt, *hrpG*\*) and 85\* $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG*\*) carrying plasmid pBRM (EV) or encoding HrpB1 or deletion derivatives thereof as indicated under control of the native promoter were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Plant reactions were monitored as is described in panel A.

(C) C96A and L128A mutations abolish HrpB1 function. Strains 85-10 (wt, *hrpG* wt), 85-10 $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG* wt), 85\* (wt, *hrpG*\*) and 85\* $\Delta$ *hrpB1* ( $\Delta$ *hrpB1*, *hrpG*\*) with plasmid pBRM (EV) or expression constructs encoding HrpB1 or point mutant derivatives thereof as indicated under control of the native promoter were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Plant reactions were monitored as is described in panel A.



**Fig. S6** Ectopic expression of HrpB1 derivatives in the wild-type strain 85-10.

*X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 carrying plasmid pBRM (EV) or expression constructs encoding HrpB1 and derivatives thereof under control of the native promoter as indicated were inoculated at a density of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 7 dpi (upper panel) and 8 dpi (lower panels). For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 dpi. Dashed lines mark the infiltrated areas.

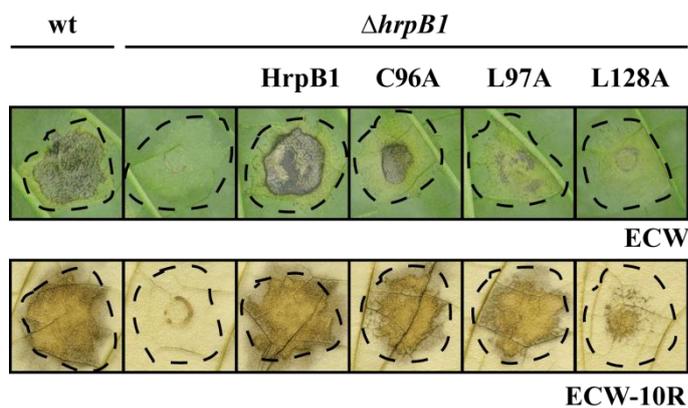
### 2.2.3 Zusammenfassung der Publikation II

Die Analyse des Proteins HrpB1 war Gegenstand der Publikation „The periplasmic HrpB1 protein from *Xanthomonas* spp. binds to peptidoglycan and to components of the type III secretion system“. Durch *in vitro*-Interaktionsstudien konnte eine Interaktion von HrpB1 mit dem Sekretin HrcC, dem Pilusprotein HrpE, der IM-Ringkomponente HrcD sowie eine Interaktion mit dem putativen „inner rod“-Protein HrpB2, welches selbst mit HrcD, jedoch nicht mit HrcC und HrpE interagiert, nachgewiesen werden. Die Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass HrpB1 das Sekretin und den Pilus mit dem potentiellen „inner rod“-Protein HrpB2 verbindet. Subfraktionierungs- und Quervernetzungsstudien sowie ein neu etabliertes Peptidoglykan-Interaktionsexperiment zeigten, dass HrpB1 in der angereicherten periplasmatischen Fraktion lokalisierte, Komplexe ausbildete und mit Peptidoglykan assoziierte. Die Lokalisation in der angereicherten periplasmatischen Fraktion, die Komplexbildung und die Assoziation von HrpB1 mit Peptidoglykan lassen vermuten, dass HrpB1 eine Struktur des T3S-Systems im bakteriellen Periplasma ausbilden könnte, die das T3S-System im Periplasma verankert. Die ektopische (*in trans*) Expression von *hrpB1*, welches eine 24 Basenpaar längere Variante der annotierten *hrpB1*-Nukleotidsequenz (*hrpB1<sub>GTG</sub>*) ist, unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, führte im Gegensatz zur *in trans*-Expression von *hrpB1<sub>GTG</sub>* zur partiellen Komplementation des Phänotyps einer *hrpB1*-Mutante bzgl. der Krankheitssymptome und HR, was vermuten lässt, dass die zusätzlichen acht Aminosäuren zur Funktion von HrpB1 beitragen. Der Phänotyp einer *hrpB1*-Mutante konnte erst durch die *in trans*-Expression von *hrpB1* unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors vollständig komplementiert werden, was darauf hin weist, dass die Überexpression von HrpB1 einen negativen Effekt auf die Funktion des T3S-Systems besitzt. Zur Identifizierung von Aminosäuren, die für die Funktion von HrpB1 von Bedeutung sind, wurden HrpB1-Derivate mit einer Deletion von Aminosäuren oder einer Aminosäuresubstitution synthetisiert. *In vitro*-Interaktionsstudien mit diesen HrpB1-Derivaten zeigten, dass die Derivate HrpB1<sub>21-159</sub> und HrpB1<sub>Δ91-97</sub> nur noch reduziert oder nicht mehr mit den bekannten Interaktionspartnern interagierten, was vermuten lässt, dass die Proteinfaltung in diesen Proteinen erheblich gestört ist. Währenddessen interagierten die Derivate HrpB1<sub>Δ116-128</sub> und HrpB1<sub>L97A</sub> nicht oder reduziert mit HrcD und die Derivate HrpB1<sub>L22A</sub> und HrpB1<sub>L97A</sub> nur noch reduziert mit HrpB1. Da diese Derivate den Phänotyp einer *hrpB1*-Mutante nicht oder partiell komplementierten ist möglicherweise die Interaktion von HrpB1 mit HrcD und eventuell die Komplexbildung von HrpB1 für die HrpB1-Funktion essentiell.

## 2.2.4 Ergänzende Ergebnisse

### 2.2.4.1 *In cis*-Expression von *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> in einer *hrpB1*-Mutante

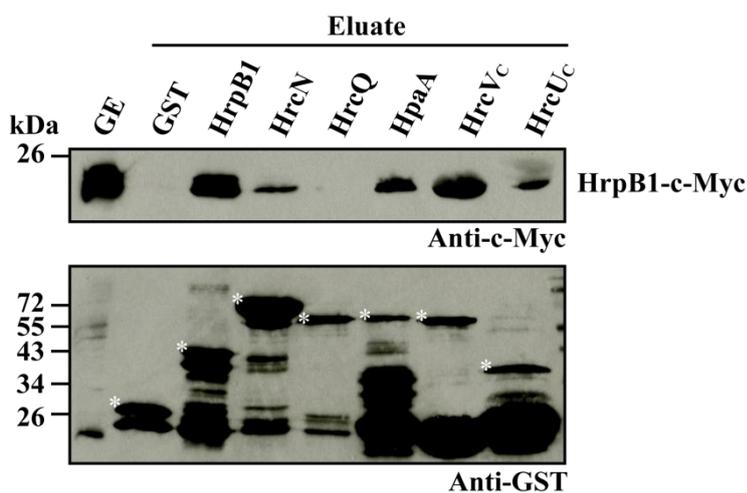
Um Aminosäuren zu identifizieren, die zur HrpB1-Proteinfunktion beitragen, wurden HrpB1-Derivate mit einer Aminosäuresubstitution generiert die über die HrpB1/HrpK-Proteinfamilie konserviert sind (siehe Kapitel 2.2.2). Durch die ektopische Expression von *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> unter der Kontrolle des nativen *hrpB1*-Promotors konnte der Phänotyp einer *hrpB1*-Deletionsmutante nicht komplementiert werden (siehe Kapitel 2.2.1). Möglicherweise hat die ektopische Expression von *hrpB1* einen negativen Effekt auf die Symptomausbildung. Aus diesem Grund wurden die Gene *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> unter Kontrolle des nativen *hrpB1*-Promotors in die *hpaF/hpaG*-Region in das Genom (*in cis*) des 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes inseriert. Wie erwartet, führte die Inokulation des 85-10-Stammes in suszeptiblen ECW-Pflanzen zur Ausbildung von Krankheitssymptomen und in resistenten ECW-10R-Pflanzen zu einer HR (Abbildung 2.1). Während die Expression von *hrpB1* unter seinem natürlichen Promotor *in cis* den Phänotyp des 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes vollständig komplementierte, führte die *in cis*-Expression von *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> zu einer partiellen Komplementation des Phänotyps eines 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes (Abbildung 2.1). Die Aminosäuren 96, 97 und 128 sind daher vermutlich für die Proteinfunktion von Bedeutung, aber nicht essentiell.



**Abbildung 2.1: Partielle Komplementation des Phänotyps eines 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes durch die *in cis*-Expression von *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub>.** Die Gene *hrpB1*<sub>C96A</sub>, *hrpB1*<sub>L97A</sub> oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> wurden mit ihrem nativen Promotor in die *hpaF/hpaG*-Region in das Genom des 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Stammes integriert. Der Xcv-Stamm 85-10 (wt) und dessen 85-10 $\Delta$ *hrpB1*-Deletionsmutante ( $\Delta$ *hrpB1*) die *hrpB1* (HrpB1), *hrpB1*<sub>C96A</sub> (C96A), *hrpB1*<sub>L97A</sub> (L97A) oder *hrpB1*<sub>L128A</sub> (L128A) unter der Kontrolle des nativen Promotors *in cis* exprimierten, wurden mit einer Bakteriendichte von  $2 \times 10^7$  KBE ml<sup>-1</sup> in suszeptible ECW- und in resistente ECW-10R-Paprikapflanzen inokuliert. Nach sieben Tagen wurden die Krankheitssymptome dokumentiert. Für eine bessere Visualisierung der HR wurden die Blätter der resistenten Pflanzen nach drei Tagen geerntet und in Ethanol gebleicht. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstelle hin. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

### 2.2.4.2 HrpB1 interagiert mit zytoplasmatischen und IM-Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems

Die Ergebnisse der vorangegangenen Studien deuten darauf hin, dass HrpB1 ein periplasmatisches Protein ist. Weil HrpB1 möglicherweise T3S-abhängig in das Periplasma transportiert werden könnte, wurde die Interaktion von HrpB1 mit T3S-Komponenten getestet, die an der Kontrolle der T3S, der Rekrutierung von T3S-Substraten oder putative Substratbindestellen des T3S-Systems sind. Für die Interaktionsstudien wurden GST oder translationale Fusionen zwischen GST und HrpB1, dem T3S-Kontrollprotein HpaA, der T3S-assoziierten ATPase HrcN sowie den C-terminalen zytoplasmatischen Domänen von HrcV (HrcV<sub>C</sub>) und HrcU (HrcU<sub>C</sub>), welche eventuell als Substratbindestellen des T3S-Systems dienen, an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit *E. coli*-Zelllysaten inkubiert, welche HrpB1-c-Myc enthielten. GST-HrpB1 und GST-HrcQ dienten dabei als Kontrollen. Die Gesamtzellextrakte und die eluierten Proteine wurden mittels eines Immunoblots analysiert. Wie erwartet konnte HrpB1-c-Myc nicht im Eluat von GST-HrcQ, aber im Eluat von GST-HrpB1 nachgewiesen werden (Abbildung 2.2). Weiterhin eluierte HrpB1-c-Myc mit GST-HrcN, GST-HpaA, GST-HrcV<sub>C</sub> und GST-HrcU<sub>C</sub>, nicht jedoch mit GST (Abbildung 2.2), was darauf hin deutet, dass HrpB1 mit der T3S-assoziierten ATPase HrcN, dem T3S-Kontrollprotein HpaA sowie mit den angenommenen Substratbindestellen HrcV<sub>C</sub> und HrcU<sub>C</sub> interagiert. HrpB1 könnte daher vermutlich als T3S-Substrat erkannt und T3S-abhängig in das bakterielle Periplasma transportiert werden.



**Abbildung 2.2: Interaktionsstudien von ausgewählten T3S-Komponenten mit HrpB1-c-Myc.** GST und GST-HrpB1 (HrpB1), GST-HrcN (HrcN), GST-HrcQ (HrcQ), GST-HpaA (HpaA), GST-HrcV<sub>C</sub> (HrcV<sub>C</sub>) und GST-HrcU<sub>C</sub> (HrcU<sub>C</sub>) wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und einem *E. coli*-Gesamtzelllysate inkubiert, welches HrpB1-c-Myc enthielt. Die Gesamtzellextrakte (GE) und die eluierten Proteine (Eluate) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot, unter Verwendung eines c-Myc- und eines GST-spezifischen Antikörpers, analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. GST und die vollständigen GST-Fusionsproteine wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Weitere Signale stellen Degradationsprodukte dar. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

## 2.3 HrcU kontrolliert die T3S und Translokation von „frühen“ und „späten“ Substraten

### 2.3.1 Publikation III: „The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates“

*Microbiology* (2014), 160, 576–588

DOI 10.1099/mic.0.075176-0

#### The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates

Jens Hausner and Daniela Büttner

Institute of Biology, Department of Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany

##### Correspondence

Daniela Büttner  
daniela.buettner@genetik.uni-halle.de

Received 17 November 2013  
Accepted 8 January 2014

The majority of Gram-negative plant- and animal-pathogenic bacteria employ a type III secretion (T3S) system to deliver effector proteins to eukaryotic cells. Members of the YscU protein family are essential components of the T3S system and consist of a transmembrane and a cytoplasmic region that is autocatalytically cleaved at a conserved NPTH motif. YscU homologues interact with T3S substrate specificity switch (T3S4) proteins that alter the substrate specificity of the T3S system after assembly of the secretion apparatus. We previously showed that the YscU homologue HrcU from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* interacts with the T3S4 protein HpaC and is required for the secretion of translocon and effector proteins. In the present study, analysis of HrcU deletion, insertion and point mutant derivatives led to the identification of amino acid residues in the cytoplasmic region of HrcU (HrcU<sub>C</sub>) that control T3S and translocation of the predicted inner rod protein HrpB2, the translocon protein HrpF and the effector protein AvrBs3. Mutations in the vicinity of the NPTH motif interfered with HrcU cleavage and/or the interaction of HrcU<sub>C</sub> with HrpB2 and the T3S4 protein HpaC. However, HrcU function was not completely abolished, suggesting that HrcU cleavage is not crucial for pathogenicity and T3S. Given that mutations in HrcU differentially affected T3S and translocation of HrpB2 and effector proteins, we propose that HrcU controls the secretion of different T3S substrate classes by independent mechanisms.

#### INTRODUCTION

Many Gram-negative plant- and animal-pathogenic bacteria utilize a type III secretion (T3S) system to translocate effector proteins into eukaryotic cells and thus manipulate host cellular pathways for their own benefit (Büttner & Bonas, 2010; Ghosh, 2004). T3S systems consist of a membrane-spanning basal body which is composed of ring structures in the inner membrane (IM) and outer membrane that are presumably linked by a periplasmic inner rod (Blocker *et al.*, 2001; DePamphilis & Adler, 1971; Francis *et al.*, 1994; Kubori *et al.*, 1998; Marlovits *et al.*, 2004; Sani *et al.*, 2007). Additional components include at least five IM proteins that belong to the YscR, S, T, U and V families (He *et al.*, 2004). YscU and YscV family members contain large cytoplasmic domains that are associated with the predicted cytoplasmic (C) ring and the cytoplasmic ATPase complex

of the T3S system, and were proposed to be involved in substrate docking (Büttner, 2012). The membrane-spanning basal body of translocation-associated T3S systems is associated with an extracellular needle (in animal pathogens) or pilus structure (in plant pathogens), which provides a transport channel for secreted proteins to the host–pathogen interface (Büttner, 2012). Translocation of effector proteins is mediated by a channel-like bacterial translocon, which inserts into the host plasma membrane (Büttner *et al.*, 2002; Mattei *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2008).

Given the architecture of the T3S system, the assembly of extracellular needles or pili presumably precedes the translocation of effector proteins. It was therefore suggested that the T3S substrate specificity switches from early substrates including extracellular components of the T3S system to late substrates, i.e. effector proteins. The switch in substrate specificity is controlled by T3S substrate specificity switch (T3S4) proteins, which interact with the cytoplasmic regions of members of the YscU family of IM components of the T3S system (Agrain *et al.*, 2005; Büttner, 2012; Cornelis *et al.*, 2006; Deane *et al.*, 2010). The cytoplasmic region of YscU family members is autoproteolytically cleaved between the asparagine and proline residues of a conserved NPTH

Abbreviations: ECW, Early Cal Wonder; GST, glutathione S-transferase; HR, hypersensitive response; IM, inner membrane; p.i., post-inoculation; SN, culture supernatants; TE, total cell extracts; T3S, type III secretion; *Xcv*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

One supplementary table and four supplementary figures are available with the online version of this paper.

amino acid motif (Björnfort *et al.*, 2009; Deane *et al.*, 2008; Ferris *et al.*, 2005; Lavander *et al.*, 2002; Lountos *et al.*, 2009; Sorg *et al.*, 2007; Wiesand *et al.*, 2009; Zarivach *et al.*, 2008). According to a current model, the cleavage and/or a conformational change in the cytoplasmic regions of YscU family members initiates the T3S substrate specificity switch upon binding of the T3S4 protein (Büttner, 2012). Crystal structure analyses of YscU family members from animal pathogens suggest that the conformational change mainly involves a reorientation of the PTH loop of the NPTH motif following cleavage (Deane *et al.*, 2008; Lountos *et al.*, 2009; Wiesand *et al.*, 2009; Zarivach *et al.*, 2008).

YscU family members have been studied in animal-pathogenic bacteria and the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [*Xcv*, also termed *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004)], which is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato plants. We previously showed that the cytoplasmic region of the YscU homologue HrcU (HrcU<sub>C</sub>) from *Xcv* interacts with the T3S4 protein HpaC and the early substrate HrpB2, which is essential for T3S and is presumably part of the predicted periplasmic inner rod structure (Hartmann *et al.*, 2012; Lorenz & Büttner, 2011; Lorenz *et al.*, 2008). HpaC suppresses the efficient secretion of HrpB2 and promotes the secretion of translocon and effector proteins (Lorenz *et al.*, 2008). As both HpaC and HrpB2 bind in the vicinity of the NPTH motif of HrcU, they may compete for the same binding sites (Lorenz & Büttner, 2011). Alternatively, HpaC indirectly interferes with the binding of HrpB2 to HrcU<sub>C</sub> by inducing a conformational change in HrcU<sub>C</sub> that alters the T3S substrate specificity. The model of an HpaC-induced conformational change in HrcU<sub>C</sub> was supported by the finding that the *hpaC* mutant phenotype can be suppressed by exchange of the conserved tyrosine residue at position 318 of the C-terminal LARxLY amino acid motif of HrcU against aspartic acid (Lorenz & Büttner, 2011). Notably, however, the Y318D mutation in HrcU does not suppress the oversecretion of HrpB2 in the *hpaC* mutant (Lorenz & Büttner, 2011). Extragenic suppressor mutations in the C-terminal regions of YscU family members were also identified in T3S4 mutants from animal-pathogenic bacteria and presumably affect the protein conformation in or around the NPTH motif (Deane *et al.*, 2008; Edqvist *et al.*, 2003; Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Zarivach *et al.*, 2008).

In the present study, we aimed to characterize the HrcU-dependent T3S substrate specificity switch in *Xcv* at the molecular level. The results of random and targeted mutagenesis approaches suggest that the LARxLY motif of HrcU and the linker region between the transmembrane domain and the NPTH motif are required for T3S and pathogenicity. Furthermore, infection and secretion studies revealed that HrcU cleavage per se is dispensable for protein function and that HrcU controls the secretion and translocation of early and late substrates by independent mechanisms that can be uncoupled.

## METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** *Xcv* strains were grown at 30 °C in nutrient-yeast-glycerol (NYG) medium (Daniels *et al.*, 1984) or in minimal medium A (pH 7.0) (Ausubel *et al.*, 1996), which was supplemented with sucrose (10 mM) and Casamino acids (0.3%). *Escherichia coli* was grown at 37 °C in lysogeny broth (LB) medium (Bertani, 1951). Plasmids were introduced into *Xcv* by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (Figurski & Helinski, 1979) and into *E. coli* by chemical transformation. Antibiotics were used at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup>; gentamicin, 15 µg ml<sup>-1</sup>; kanamycin, 25 µg ml<sup>-1</sup>; rifampicin, 100 µg ml<sup>-1</sup>; spectinomycin, 100 µg ml<sup>-1</sup>.

**Infection experiments.** *Xcv* strains were inoculated with a needleless syringe into the intercellular spaces of leaves of the near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW) and ECW-10R at concentrations of 1 × 10<sup>8</sup> c.f.u. ml<sup>-1</sup> in 1 mM MgCl<sub>2</sub> if not stated otherwise (Kousik & Ritchie, 1998; Minsavage *et al.*, 1990). Disease symptoms and the hypersensitive response (HR) were monitored over a period of 1–14 days post-inoculation (days p.i.). For better visualization of the HR, leaves were bleached in 70% ethanol. Experiments were repeated at least twice.

### Generation of HrcU derivatives with pentapeptide insertions.

To generate HrcU derivatives with pentapeptide insertions, *hrcU*<sub>1–206</sub> and *hrcU*<sub>207–357</sub> were amplified by PCR from *Xcv* strain 85-10 and inserted into the *Sma*I site of vector pUC57ΔBsaI in a restriction-ligation reaction (Bolchi *et al.*, 2005; Morbitzer *et al.*, 2011). Transposon-mutagenized derivatives of pUC57hrcU<sub>207–357</sub> were generated with the MGS Mutation Generation System kit (Finnzymes) according to the manufacturer's instructions and transposon insertions were identified by PCR after transformation of the reaction into *E. coli*. The Entranceposon was removed by digestion of the plasmid DNA by *Not*I. Re-ligation led to the generation of 15 bp insertions consisting of a 10 bp Entranceposon sequence and 5 bp duplicated target site. The amino acid sequences of the corresponding pentapeptides varied according to the reading frame in which the Entranceposon had inserted and are listed below in Fig. 3(b). Derivatives of *hrcU*<sub>207–357</sub> with 15 bp insertions were ligated with *hrcU*<sub>1–206</sub> into the Golden Gate-compatible vector pBRM downstream of a single *lac* promoter and in-frame with a triple c-Myc epitope-encoding sequence (Engler *et al.*, 2008; Szczesny *et al.*, 2010). Plasmids that were generated in this study are listed in Table S1 (available in the online Supplementary Material).

### Generation of expression plasmids and deletion mutants.

*hrcU*-c-myc point mutant and deletion derivatives were generated by PCR using pBRMhrcU as template and phosphorylated primers that introduced the individual mutations and annealed back to back to the *hrcU* sequence. Similarly, point and deletion mutant derivatives of *gst*-*hrcU* and *gst*-*hrcU*<sub>255–357</sub> were generated by PCR using phosphorylated primers and constructs pGhrcU and pGhrcU<sub>255–357</sub> as templates (see Table S1; Lorenz & Büttner, 2011). Amplicons were religated and transformed into *E. coli*. To generate pBRMhrcU<sub>P265G/Y318D</sub>, pBRMhrcU<sub>P265G</sub> (Lorenz & Büttner, 2011) was used as a template and the Y318D mutation was introduced by the primer sequences. *hrcU*<sub>P265G/Y318D</sub> and *hrcU*<sub>255–357/P265G/Y318D</sub> were amplified by PCR and cloned into vector pGEX. To generate HrpB2<sub>1–76</sub>-AvrBs3Δ2, the first 76 codons of *hrpB2* were amplified by PCR and ligated into the *Eco*RI/*Clal* sites of pDS356F, in-frame with *avrBs3*Δ2, resulting in construct pDhrpB2<sub>1–76</sub>-356. Primer sequences are available upon request.

**T3S assays and immunoblot analysis.** *In vitro* T3S assays were performed as described previously (Rossier *et al.*, 1999). Equal amounts of bacterial total cell extracts and culture supernatants

were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting, using polyclonal antibodies specific for HrpF (Büttner *et al.*, 2002), HrpB2 (Rossier *et al.*, 2000), AvrBs3 (Knoop *et al.*, 1991) and monoclonal anti-c-Myc (Roche Applied Science) and anti-GST antibodies (Amersham Pharmacia Biotech). Horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat antibodies (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Blots were routinely incubated with an antibody specific for HrcJ to ensure that no bacterial lysis had occurred (Rossier *et al.*, 2000) (data not shown). Experiments were repeated at least twice.

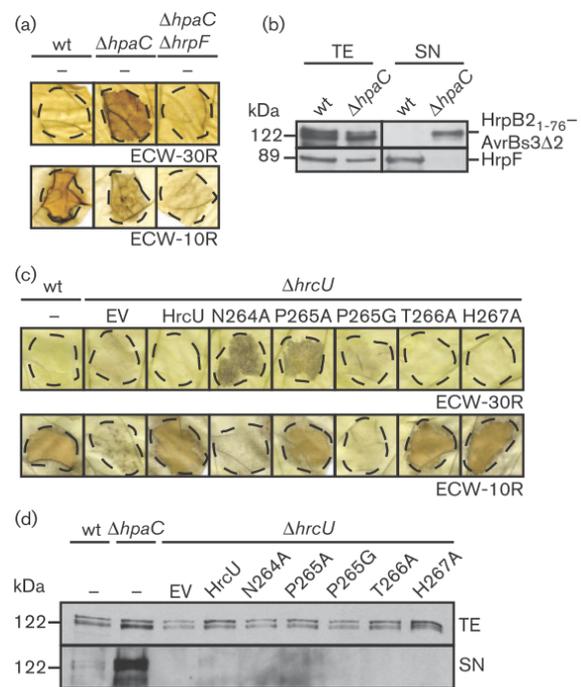
**Glutathione S-transferase (GST) pull-down assays.** GST pull-down assays were performed as described previously (Hartmann *et al.*, 2012). Fifteen microlitres of total protein lysates and 20  $\mu$ l eluted proteins were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies specific for the c-Myc epitope, HrcQ (Lorenz *et al.*, 2012) and GST, respectively. Experiments were repeated at least twice.

## RESULTS

### The N-terminal 76 aa of the early T3S substrate HrpB2 contain a translocation signal

We previously showed that HpaC and HrcU suppress the efficient secretion of the predicted inner rod protein HrpB2 (Lorenz *et al.*, 2008). To investigate whether they also interfere with a possible translocation of HrpB2 into the plant cell, we generated a fusion protein between the N-terminal 76 aa of HrpB2 and the reporter protein AvrBs3 $\Delta$ 2, which is a derivative of the effector protein AvrBs3. AvrBs3 $\Delta$ 2 contains the effector domain but is deleted in the secretion and translocation signal and is therefore only translocated by the T3S system as the C-terminal fusion partner of a functional translocation signal (Noël *et al.*, 2003; Szurek *et al.*, 2002). Translocation of AvrBs3 or AvrBs3 $\Delta$ 2 fusions into cells of AvrBs3-responsive ECW-30R pepper plants leads to induction of an HR, i.e. rapid local cell death at the infection site (Dangl & Jones, 2001; Römer *et al.*, 2009). HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 induced the HR in ECW-30R pepper plants when delivered by *Xcv* strain 85-10 $\Delta$ hpaC but not by strain 85-10, suggesting that it was translocated in the absence of HpaC (data not shown). Similar results were obtained with strains 85-10hrpG\* (85\*) and 85\* $\Delta$ hpaC (Fig. 1a). Derivatives of strain 85\* contain HrpG\*, which is a constitutively active version of the key regulator HrpG and activates the expression of T3S genes also under non-inducing conditions (Noël *et al.*, 2001; Rossier *et al.*, 1999; Wengelnik *et al.*, 1996, 1999). As control, bacteria were inoculated into leaves of resistant ECW-10R pepper plants, which induce the HR upon recognition of the type III effector AvrBs1 (Escobar *et al.*, 2001; Ronald & Staskawicz, 1988). As expected, strain 85\* elicited the HR in ECW-10R plants whereas a partial HR induction was observed for strain 85\* $\Delta$ hpaC (Fig. 1a) (Büttner *et al.*, 2006).

*In vitro* T3S assays showed that HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 was detected in the culture supernatant of strain 85\* $\Delta$ hpaC but not of strain 85\* (Fig. 1b), suggesting that it was efficiently secreted in the absence of HpaC. This is in contrast to the



**Fig. 1.** HpaC and HrcU suppress the translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2. (a) HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 is translocated by hpaC mutants. *Xcv* strains 85\* (wt), 85\* $\Delta$ hpaC ( $\Delta$ hpaC) and 85\* $\Delta$ hpaC $\Delta$ hrpF ( $\Delta$ hpaC $\Delta$ hrpF) containing HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 were inoculated at concentrations of  $4 \times 10^8$  c.f.u. ml<sup>-1</sup> into leaves of AvrBs3-responsive ECW-30R and AvrBs1-responsive ECW-10R pepper plants. Strain 85\* $\Delta$ hpaC $\Delta$ hrpF lacks the translocon gene hrpF and is therefore deficient in type III-dependent protein translocation. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 2 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas. (b) HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 is secreted by the hpaC deletion mutant. Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ hpaC ( $\Delta$ hpaC) containing HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 were incubated in secretion medium, and total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analysed by immunoblotting using AvrBs3- and HrpF-specific antibodies. (c) Cleavage-deficient HrcU derivatives promote translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2. Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ hrcU ( $\Delta$ hrcU) without expression construct (-), containing plasmid pBRM (EV) or carrying HrcU or derivatives thereof with N264A, P265A, P265G, T266A and H267A mutations as indicated were inoculated into pepper plants as described in (a). (d) *In vitro* secretion of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2. Strains 85\* (wt), 85\* $\Delta$ hpaC ( $\Delta$ hpaC) and 85\* $\Delta$ hrcU ( $\Delta$ hrcU) containing no expression construct (-), vector pBRM (EV), HrcU or derivatives thereof with N264A, P265A, P265G, T266A and H267A mutations as indicated were incubated in secretion medium. TE and SN were analysed by immunoblotting using AvrBs3-specific antibodies.

translocon protein HrpF, which is secreted in reduced amounts by strain 85\* $\Delta$ hpaC, as was reported previously (Büttner *et al.*, 2006). We conclude from these findings

that the N-terminal 76 aa of HrpB2 contain a functional T3S and translocation signal that is suppressed by HpaC.

### HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 is translocated in the presence of N264A and P265A mutations in HrcU

To investigate a possible contribution of HrcU to the control of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 translocation, we performed translocation assays with strain 85\*Δ*hrcU* containing HrcU or HrcU derivatives with point mutations in the NPTH motif. We previously showed that mutations of the conserved asparagine or proline residues of the NPTH motif of HrcU against alanine (N264A and P265A mutations) abolish HrcU cleavage and the interaction with HpaC, whereas the exchange of P265 against glycine (P265G mutation) additionally interferes with the interaction of HrcU with HrpB2 (Lorenz & Büttner, 2011). When bacteria were inoculated into leaves of ECW-30R pepper plants, HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 induced the HR when delivered in the presence of HrcU derivatives with N264A and P265A mutations but not with P265G, T266A or H267A mutations (Fig. 1c). As reported previously, N264A and P265G mutations abolished the HR induction in ECW-10R plants (Lorenz & Büttner, 2011) (Fig. 1c). However, given that they promote translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2, they did not completely abolish the formation of a functional translocon. We conclude from these findings that the cleavage of HrcU and/or the interaction with HpaC suppress the predicted translocation of HrpB2. Notably, the secretion of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 in *hrcU* mutant strains was not significantly increased, suggesting that even small amounts of protein are sufficient to trigger the HR (Fig. 1d). This is in contrast to the wild-type HrpB2 protein, which is oversecreted upon ectopic expression of *hrcU* or derivatives thereof (Lorenz & Büttner, 2011). The different secretion behaviour of both proteins might be due to the lack of the C-terminal region in HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 or the presence of the AvrBs3Δ2 fusion partner.

We also investigated the influence of a double point mutation (P265G and Y318D) in HrcU on the translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2. Previous pull-down assays revealed that individual Y318D and P265G mutations interfere with the binding of HrcU to HrpB2 and HpaC (Lorenz & Büttner, 2011). This was also observed for the double mutant derivative HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> (Fig. 2a). The Y318D mutation in HrcU activates effector protein secretion in the absence of the T3S4 protein HpaC whereas the P265G mutation leads to a loss of HrcU function (Lorenz & Büttner, 2011) (Fig. 2b, c). Notably, HrcU<sub>P265G/Y318D</sub>-c-Myc partially restored plant reactions in ECW and ECW-10R plants as well as HrpB2 secretion in strain 85\*Δ*hrcU* (Fig. 2b, c). Furthermore, HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 induced the AvrBs3-specific HR when delivered by strain 85\*Δ*hrcU* in the presence of HrcU<sub>P265G/Y318D</sub>-c-Myc, but not of HrcU<sub>P265G</sub>-c-Myc or HrcU<sub>Y318D</sub>-c-Myc (Fig. 2d). This suggests that the Y318D mutation, which presumably leads to a conformational change in HrcU (see above; Lorenz &

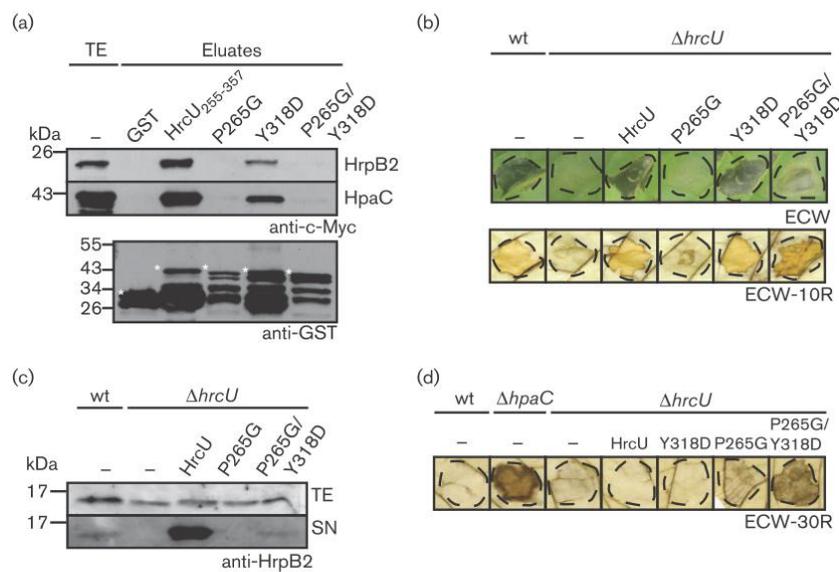
Büttner, 2011), allows the translocation of HrpB2 in the absence of HrcU cleavage and a detectable HrcU-HrpB2 interaction.

### Generation of HrcU transposon mutant derivatives

To gain further insights into functionally important regions of HrcU<sub>C</sub>, we performed a random transposon mutagenesis of *hrcU*<sub>207-357</sub> (*hrcU*<sub>C</sub>), which encodes the C-terminal cytoplasmic region of HrcU (Fig. 3a; see Methods) (Berger *et al.*, 2010). Transposon sequences in *hrcU*<sub>C</sub> were removed by *NotI* digestion and re-ligation, resulting in the in-frame insertions of a 15 bp random sequence including a 5 bp target duplication. In total, 33 mutagenized *hrcU*<sub>C</sub> derivatives were generated and ligated in-frame to *hrcU*<sub>1-206</sub> in the expression vector pBRM in fusion with a C-terminal c-Myc epitope-encoding sequence. The resulting HrcU derivatives are hereafter referred to by the position of the pentapeptide insertion (e.g. HrcU<sub>A243</sub> contains an insertion after the alanine residue at position 243). The positions and amino acid sequences of the insertions are summarized in Fig. 3(b). Six insertions were located in the N-terminal linker region of HrcU<sub>C</sub> (HrcU<sub>CN</sub>, amino acids 207–264), whereas 27 insertions were identified in the C-terminal region (HrcU<sub>CC</sub>, amino acids 265–357), which is separated from HrcU<sub>CN</sub> by the NPTH cleavage motif (amino acids 264–267) (Fig. 3a) (Berger *et al.*, 2010; Lorenz & Büttner, 2011). Expression constructs encoding HrcU mutant derivatives were introduced into *Xcv* strains 85-10Δ*hrcU* and 85\*Δ*hrcU*. Immunoblot analysis revealed that 17 insertions in the central region of HrcU<sub>C</sub> interfered with HrcU cleavage, suggesting that they affected the protein conformation around the NPTH motif (Fig. 3b; data not shown).

### Identification of amino acid regions in HrcU that contribute to the secretion of early and/or late substrates

When strains 85-10Δ*hrcU* and 85\*Δ*hrcU* containing HrcU or mutant derivatives thereof were incubated in secretion medium, the putative translocon protein HrpF was secreted by strain 85\* but was not detectable in the culture supernatant of strain 85\*Δ*hrcU* (Lorenz & Büttner, 2011) (Fig. 4a). Wild-type levels of HrpF secretion were restored by HrcU-c-Myc whereas HrcU insertion mutant derivatives led to a reduced or undetectable HrpF secretion (Fig. 3b; see also Fig. 4a). We also analysed the influence of selected insertions after residues Y268, A269, V270, A298, D324, P327, E328, R339 and W340 on T3S of the early substrate HrpB2 and the effector protein AvrBs3. As observed previously, HrpB2 was oversecreted upon ectopic expression of *hrcU*-c-myc in strain 85\*Δ*hrcU* (Fig. 4a) (Lorenz & Büttner, 2011). Reduced levels of HrpB2 were secreted in the presence of HrcU derivatives with insertions after positions 268, 269 or 270. By contrast, secretion of HrpB2 was not detectable in the presence of HrcU derivatives with insertions after positions 298, 324, 327 and 328 whereas



**Fig. 2.** HrcU<sub>Y318D/P265G</sub> partially restores pathogenicity, HrpB2 secretion and translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 in strain 85\*ΔhrcU. (a) HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> does not interact with HrpB2 and HpaC. GST, GST-HrcU<sub>255-357</sub> (HrcU<sub>255-357</sub>), GST-HrcU<sub>255-357/P265G</sub> (P265G), GST-HrcU<sub>255-357/Y318D</sub> (Y318D) and GST-HrcU<sub>255-357/P265G/Y318D</sub> (P265G/Y318D) were immobilized on glutathione Sepharose and incubated with bacterial lysates containing HrpB2-c-Myc and HpaC-c-Myc, respectively. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (Eluates) were analysed by immunoblotting, using c-Myc- and GST-specific antibodies. Bands corresponding to GST or GST fusion proteins are marked by asterisks; lower bands presumably represent degradation products. (b) HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> partially restores pathogenicity in strain 85\*ΔhrcU. Strains 85\* (wt) and 85\*ΔhrcU (ΔhrcU) containing plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc or derivatives thereof with P265G, Y318D or P265G/Y318D mutations as indicated were inoculated at concentrations of  $4 \times 10^8$  c.f.u. ml<sup>-1</sup> into leaves of susceptible ECW and AvrBs1-responsive ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed 9 days p.i. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas. (c) HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> partially restores HrpB2 secretion in strain 85\*ΔhrcU. Strains 85\* (wt) and 85\*ΔhrcU (ΔhrcU) containing plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc or derivatives thereof with P265G or P265G/Y318D mutations as indicated were incubated in secretion medium. TE and culture supernatants (SN) were analysed by immunoblotting using an HrpB2-specific antibody. (d) HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 is translocated in the presence of HrcU<sub>P265G/Y318D</sub>. Translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 was analysed in strains 85\* (wt), 85\*ΔhpaC (ΔhpaC) and 85\*ΔhrcU (ΔhrcU) containing plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc or derivatives thereof with Y318D, P265G or P265G/Y318D mutations as indicated. Bacteria were inoculated at concentrations of  $4 \times 10^8$  c.f.u. ml<sup>-1</sup> into leaves of AvrBs3-responsive ECW-30R pepper plants. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas.

HrcU<sub>R339</sub> led to increased levels of secreted HrpB2 (Fig. 4a). Notably, despite their differential effects on HrpB2 secretion, all HrcU derivatives led to a significant reduction in the secretion of HrpF and the effector protein AvrBs3 (Fig. 4a, see also above). Given that insertions at positions 339 and 340 of HrcU interfered with the secretion of HrpF and AvrBs3 but did not lead to a reduction in HrpB2 secretion, HrcU probably controls the secretion and translocation of different T3S substrates by independent molecular mechanisms. We also assume that HrcU employs different mechanisms to control the secretion and translocation of HrpB2, because we observed that insertions at positions Y268 and V270 of HrcU interfere with HrpB2 secretion (see above; Fig. 4a) but allow the translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 (Fig. S1). Notably, HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 did not induce the

AvrBs3-specific HR when delivered in the presence of the other HrcU insertion derivatives (Fig. S1; data not shown).

#### Uncleaved HrcU derivatives partially restore pathogenicity in hrcU deletion mutant strains

Next, bacteria were inoculated into leaves of susceptible and resistant pepper plants. As expected, strains 85-10 and 85\* induced disease symptoms in the form of water-soaked lesions that later became necrotic in ECW and the HR in ECW-10R pepper plants. No plant reactions were observed for the hrcU deletion mutant strains 85-10ΔhrcU and 85\*ΔhrcU (Fig. 4b) (Lorenz & Büttner, 2011). The wild-type phenotype was restored by HrcU-c-Myc but not by derivatives thereof, with insertions at positions A243, K244,

V262, A271, P282 and V308 (Fig. 3b). All other pentapeptide insertions partially interfered with the ability of HrcU-c-Myc to complement the *in planta* hrcU mutant phenotypes of strains 85-10ΔhrcU and/or 85\*ΔhrcU (Fig. 3b). Examples of plant reactions are shown in Fig. 4(b). Given that cleavage-deficient HrcU derivatives partially complemented the hrcU mutant phenotype, we assume that HrcU cleavage contributes to but is not essential for pathogenicity.

### The linker region of HrcU is essential for protein function and the interaction with HrpB2

We also generated HrcU derivatives with deletions of amino acids 217–228, 243–257 and 247–261, respectively, in the linker region (see Fig. 3a). Immunoblot analysis of bacterial cell extracts revealed that HrcU<sub>Δ217–228</sub>-c-Myc and HrcU<sub>Δ243–257</sub>-c-Myc were proteolytically cleaved whereas no cleavage product was detected for HrcU<sub>Δ247–261</sub>-c-Myc (Fig. 5a). None of the HrcU deletion derivatives complemented the mutant phenotype of strain 85\*ΔhrcU with respect to T3S and pathogenicity, suggesting that they were not functional (Fig. 5a).

To investigate whether the deletions in HrcU affect protein-protein interactions, we performed GST pull-down assays with selected HrcU interaction partners including HrpB2, the general T3S chaperone HpaB and the predicted C ring protein HrcQ (Lorenz & Büttner, 2009; Lorenz *et al.*, 2008, 2012). A contribution of the linker region of HrcU to the interaction with HpaC could not be tested because HpaC interacts only with the cytoplasmic region of HrcU including amino acids 255–357 (Lorenz *et al.*, 2008). Immobilized GST and GST fusions of HrcU and mutant derivatives thereof were incubated with *E. coli* lysates containing C-terminally c-Myc epitope-tagged derivatives of HrcU interaction partners. HpaB-c-Myc and HrcQ-c-Myc co-eluted with GST-HrcU and deletion derivatives thereof but not with GST (Fig. 5b). Significantly reduced amounts of HrpB2-c-Myc were detected in the eluate of GST-HrcU<sub>Δ247–261</sub> when compared with GST-HrcU, GST-HrcU<sub>Δ217–228</sub> and GST-HrcU<sub>Δ243–257</sub> (Fig. 5b). Amino acids 247–261 of HrcU might therefore contribute to the interaction with HrpB2.

### The LARxLY motif of HrcU is required for the interaction with HrpB2 and HpaC

In addition to the linker region, we analysed the contribution of the C-terminal LARxLY motif to HrcU function. An HrcU derivative lacking the LARxLY motif (HrcU<sub>Δ312–318</sub>) was not proteolytically cleaved and did not complement the hrcU mutant phenotype with respect to T3S and pathogenicity (Figs 6a and S2). Interaction studies revealed that HpaB-c-Myc and HrcQ-c-Myc, but not HrpB2-c-Myc, interacted with GST-HrcU<sub>Δ312–318</sub>-c-Myc (Fig. 6b). Furthermore, HpaC-c-Myc did not co-elute with a GST-HrcU<sub>255–357/Δ312–318</sub> fusion protein (Fig. 6c), suggesting that the LARxLY motif contributes to the interaction of HrcU with both HrpB2 and HpaC.

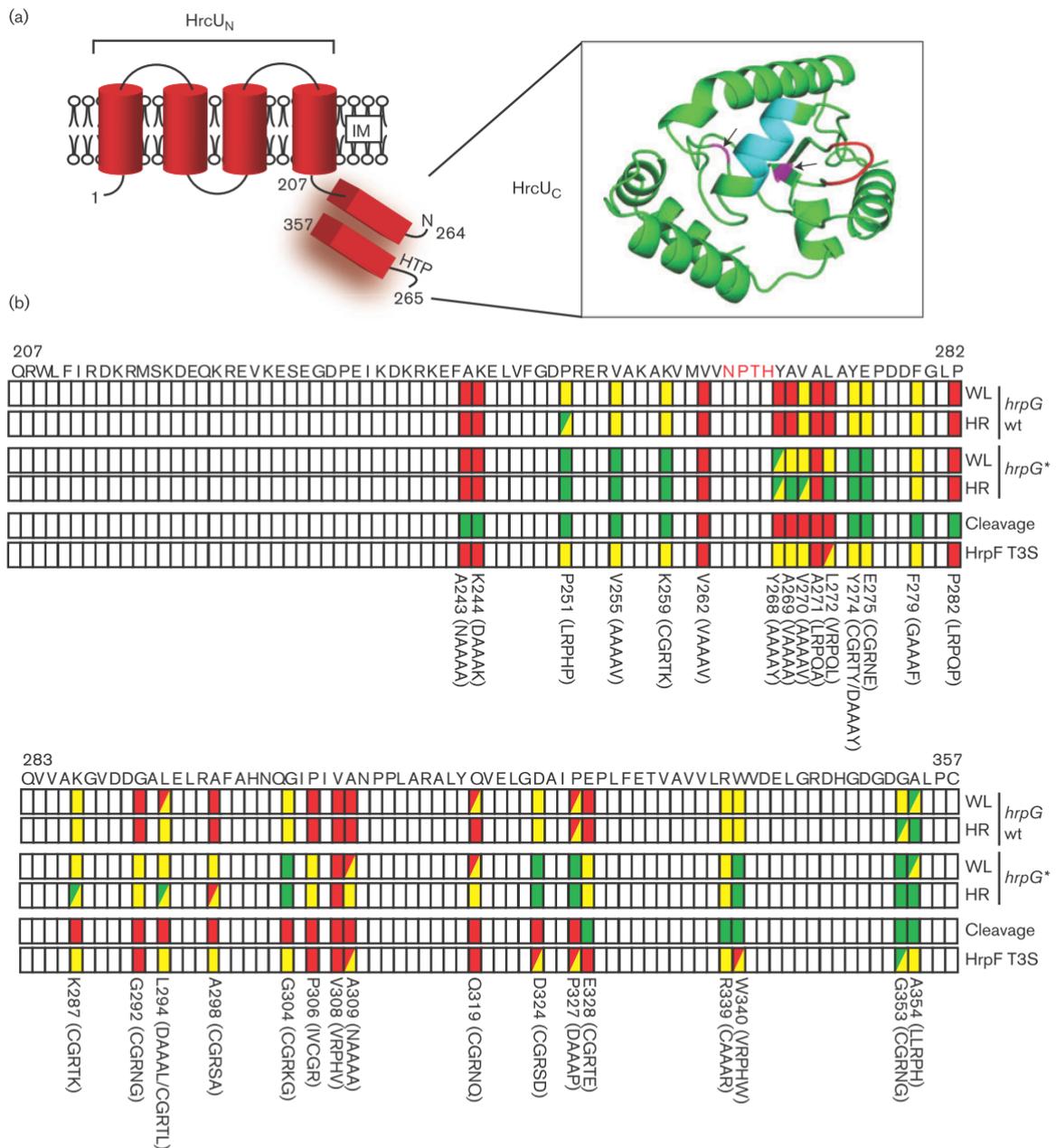
### Amino acid residues A271 and P282 of HrcU contribute to the interaction with HpaC and HrpB2

As it cannot be disproved that deletions and insertions in HrcU<sub>C</sub> led to conformational changes, we introduced point mutations at amino acid positions 271 (A271N), 282 (P282A) and 308 (V308A) of HrcU. Pentapeptide insertions at these positions led to a loss of HrcU function (see above; Fig. 3b). We also mutated the proline residue at position 312 (P312A) that directly flanks the LARxLY motif and is conserved in YscU family members (Fig. S3). With the exception of HrcU<sub>A271N</sub>-c-Myc, all HrcU point mutant derivatives were efficiently cleaved (Fig. 6a). Furthermore, all HrcU point mutant derivatives partially complemented the *in planta* phenotype of strain 85-10ΔhrcU and restored the wild-type phenotype in strain 85\*ΔhrcU (Fig. 6a and Fig. S2). The finding that HrcU<sub>A271N</sub>-c-Myc was not efficiently cleaved confirms our hypothesis that cleavage is not essential for HrcU function (see above).

When bacteria were incubated in secretion medium, HrcU<sub>A271N</sub>-c-Myc, HrcU<sub>V308A</sub>-c-Myc and HrcU<sub>P312A</sub>-c-Myc, but not HrcU<sub>P282A</sub>-c-Myc, partially restored secretion of the putative translocon protein HrpF, the effector protein AvrBs3 and the early substrate HrpB2 in strain 85\*ΔhrcU (Fig. 6a). *In vitro* interaction studies with GST-HrcU point mutant derivatives revealed that the interaction of HrpB2-c-Myc with GST-HrcU<sub>A271N</sub> and GST-HrcU<sub>P282A</sub> was reduced (Fig. 6b). Similar findings were obtained for HpaC-c-Myc, suggesting that the A271N and P282A mutations affect the interaction of HrcU with both HrpB2 and HpaC. The lack of interaction of these derivatives with HpaC and HrpB2 might explain the reduced T3S of early and late substrates (see above).

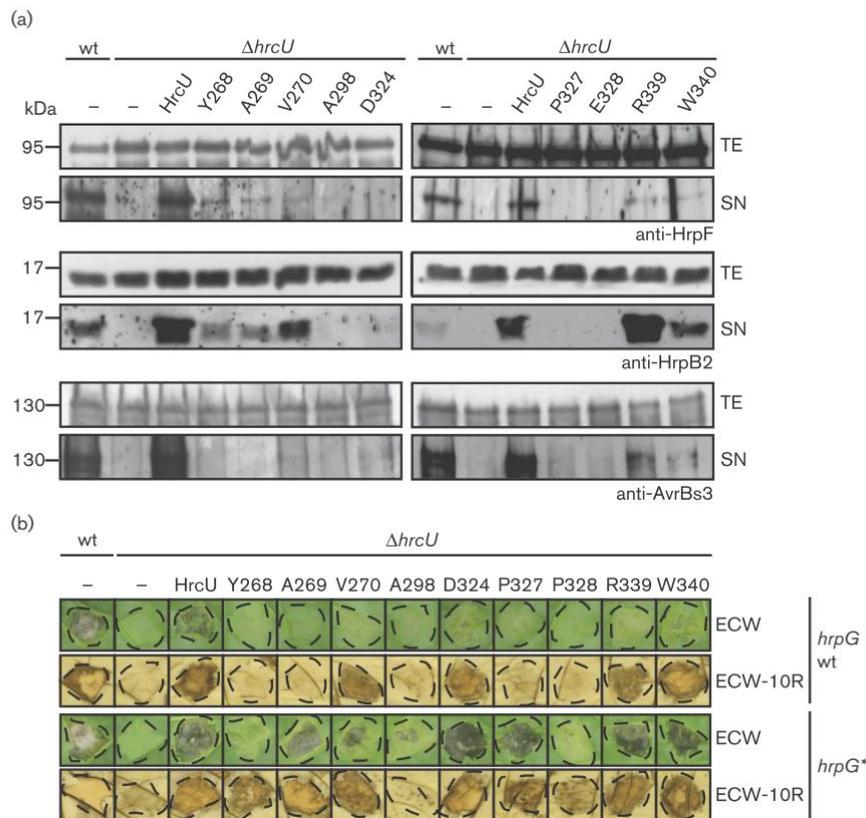
## DISCUSSION

In the present study, we provide experimental evidence that HrcU from *Xcv* promotes T3S of early and late substrates by different mechanisms and that HrcU cleavage is not essential for protein function. Furthermore, our data suggest that HrcU controls a possible translocation of HrpB2. The analysis of 33 pentapeptide insertion derivatives of HrcU revealed that insertions adjacent to the NPTH motif of HrcU or in the region spanning amino acids 287–327 led to a loss of detectable HrcU cleavage (Fig. 3). Comparison of the predicted structure of HrcU<sub>C</sub> to solved crystal structures of YscU family members suggests that amino acids 287–327 form two helices that are separated by a β sheet and are located in the vicinity of the NPTH motif (Fig. 3). Insertions in this region might therefore alter the protein conformation in or around the NPTH motif and thus affect the autocatalytic cleavage (Deane *et al.*, 2008; Ferris *et al.*, 2005; Lountos *et al.*, 2009; Wiesand *et al.*, 2009; Zarivach *et al.*, 2008). Cleavage of YscU family members was assumed to be essential for the T3S substrate specificity switch (Björnfot *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2003; Lavander *et al.*, 2002; Lorenz, 2009; Smith *et al.*,

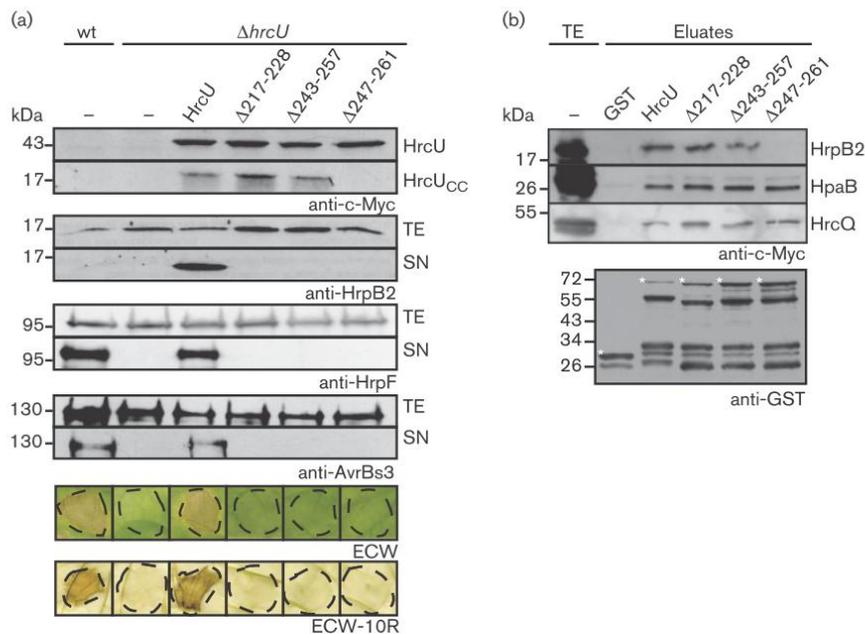


**Fig. 3.** Overview on pentapeptide insertion mutant derivatives of HrcU. (a) Topology model of HrcU. HrcU consists of four transmembrane helices (HrcU<sub>N</sub>) (Berger *et al.*, 2010) and a C-terminal cytoplasmic region (HrcU<sub>C</sub>) that is presumably cleaved between the asparagine and proline residues of the conserved NPTH motif. Numbers indicate amino acid positions. The right-hand panel shows the predicted tertiary structure of HrcU<sub>C</sub> that was generated by the I-TASSER software (<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>). The NPTH loop is shown in red, the LARxLY motif in blue. Arrows and purple regions indicate the positions of amino acids A271 (located on a  $\beta$  sheet) and P282 (located in a disordered region). IM, inner membrane. (b) Overview of the positions of pentapeptide insertions in HrcU<sub>C</sub> and their influence on pathogenicity, HrcU cleavage and HrpF secretion. The boxes and letters correspond to single amino acid residues in HrcU<sub>C</sub>, and numbers indicate the amino acid positions. The positions and amino acid sequences of pentapeptide insertions are listed below the boxes. In the case of HrcU<sub>Y274</sub> and HrcU<sub>L294</sub>, derivatives with two different pentapeptide insertions were identified. HrcU derivatives were

**Fig. 3. (cont.)** analysed in strains 85-10 $\Delta$ *hrcU* (*hrpG* wt) and 85\* $\Delta$ *hrcU* (*hrpG*\*), and bacteria were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants for complementation studies. Green rectangles indicate pentapeptide insertions that restored the wild-type phenotype with respect to disease symptoms and the HR, respectively. Yellow rectangles indicate a partial complementation by HrcU derivatives whereas pentapeptide insertions that did not complement the *hrcU* mutant phenotype are indicated by red rectangles. Infection studies were repeated at least three times. Rectangles that are subdivided into triangles indicate phenotypes that varied between full, partial or no complementation of the *hrcU* mutant phenotype as indicated by the colour of the triangles. For *in vitro* T3S assays, strains 85\*, 85\* $\Delta$ *hrcU* and 85\* $\Delta$ *hrcU* carrying HrcU or derivatives thereof were incubated in secretion medium and total cell extracts and culture supernatants were analysed by immunoblotting, using an HrpF-specific antibody. Yellow and red rectangles indicate reduced and undetectable levels of HrpF secretion, respectively. Rectangles that are subdivided into triangles indicate secretion patterns that varied between partial and undetectable HrpF secretion. Cleavage of HrcU derivatives was analysed by immunoblot analysis of total cell extracts using a c-Myc epitope-specific antibody. Pentapeptide insertions that did not affect HrcU cleavage are indicated by green rectangles, and insertions that abolished the detection of the C-terminal HrcU cleavage product by red rectangles. WL, water-soaked lesions.



**Fig. 4.** Analysis of selected HrcU pentapeptide insertion derivatives. (a) Influence of selected pentapeptide insertions on the *in vitro* secretion of HrpB2, HrpF and AvrBs3. Strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ *hrcU* ( $\Delta$ *hrcU*) carrying plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc (HrcU) or pentapeptide insertion derivatives thereof as indicated were incubated in secretion medium, and total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analysed by immunoblotting using HrpB2-, HrpF- and AvrBs3-specific antibodies, respectively. *avrBs3* was ectopically expressed from plasmid pDSF300. (b) Infection studies with *Xcv* strains carrying selected HrcU pentapeptide insertion derivatives. Strains 85-10 (wt, *hrpG* wt), 85\* (wt, *hrpG*\*), 85-10 $\Delta$ *hrcU* ( $\Delta$ *hrcU*, *hrpG* wt) and 85\* $\Delta$ *hrcU* ( $\Delta$ *hrcU*, *hrpG*\*) carrying plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc (HrcU) or pentapeptide insertions thereof were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed after 8 days. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas.



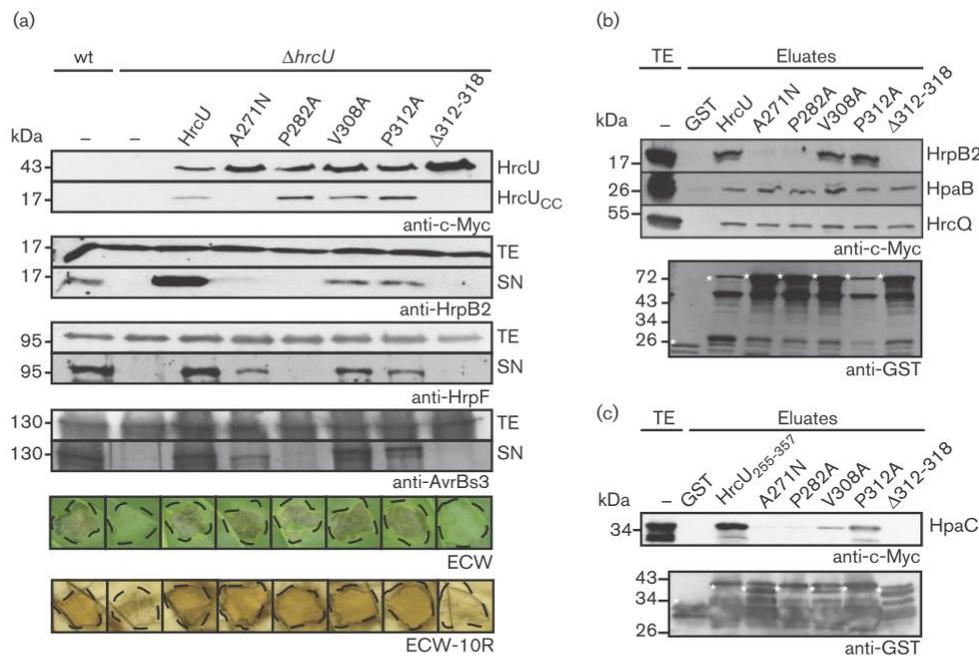
**Fig. 5.** Deletions in the linker region of HrcU abolish protein function. (a) HrcU derivatives with deletions in the linker do not promote T3S and pathogenicity. *Xcv* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta$ *hrcU* ( $\Delta$ *hrcU*) carrying plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc (HrcU) or derivatives thereof with deletions of amino acids 312–318, 217–228, 243–257 and 247–261, respectively, as indicated were grown in minimal medium (pH 7.0), and total cell extracts (TE) were analysed by immunoblotting using a c-Myc epitope-specific antibody. To investigate *in vitro* T3S, bacteria were incubated in secretion medium. TE and culture supernatants (SN) were analysed by immunoblotting using HrpB2-, HrpF- and AvrBs3-specific antibodies, respectively. *avrBs3* was ectopically expressed from plasmid pDSF300. For infection studies, bacteria were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed after 12 days. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas. (b) Deletion of amino acids 247–261 abolishes the efficient interaction of HrcU with HrpB2. GST and GST fusions of HrcU, HrcU $\Delta$ 217–228, HrcU $\Delta$ 243–257 and HrcU $\Delta$ 247–261, respectively, were immobilized on glutathione Sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HrpB2-c-Myc, HrcQ-c-Myc or HpaB-c-Myc. Total cell extracts (TE) and eluted proteins (Eluates) were analysed by immunoblotting, using c-Myc- and GST-specific antibodies. Bands corresponding to GST or GST fusion proteins are marked by asterisks; lower bands presumably represent degradation products.

2009; Sorg *et al.*, 2007). Most cleavage-deficient HrcU derivatives, however, partially restored plant reactions and T3S when analysed in *hrcU* deletion mutants, suggesting that the cleavage event itself is not crucial for HrcU function (Figs 3, 4 and 6). Intriguingly, one of the cleaved HrcU insertion derivatives, HrcU<sub>R339</sub>, led to a severe reduction in the secretion of late substrates but did not significantly interfere with the secretion of HrpB2 (Fig. 4). We therefore also assume that cleavage alone is not sufficient for HrcU function and that HrcU controls the secretion of early and late substrates by independent mechanisms.

Complementation studies revealed that HrcU function probably depends on the linker region between the transmembrane domain and the NPTH motif, because insertions and deletions in this region abolished protein function (Figs 3 and 5). This is in agreement with the finding that deletions

and point mutations in the linker regions of the HrcU homologues FlhB from *Salmonella* species and EscU from enteropathogenic *E. coli* interfere with T3S (Fraser *et al.*, 2003; Zarivach *et al.*, 2008). In HrcU, deletion of amino acids 247–261 led to a loss of cleavage and detectable interaction with HrpB2. As amino acids 247–261 are presumably involved in the formation of a  $\beta$  sheet flanking the NPTH loop (Figs 3 and S4), deletion of this region might affect the protein conformation around the NPTH motif. HrcU function presumably also depends on a conserved C-terminal LARxLY motif, which is located on a predicted helix next to the NPTH motif (Fig. 3). Deletion of the LARxLY motif interferes with HrcU cleavage and the efficient interaction of HrcU<sub>C</sub> with both HrpB2 and HpaC (Fig. 6).

Notably, the interaction between HrcU and HpaC was also affected in the presence of the point mutations A271N



**Fig. 6.** The LARxLY motif and amino acids A271 and P282 of HrcU are required for the interaction with HrpB2 and HpaC. (a) The LARxLY motif of HrcU is essential for protein function. *Xcv* strains 85\* (wt) and 85\* $\Delta hrcU$  ( $\Delta hrcU$ ) carrying plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc (HrcU) or derivatives thereof with A271N, P282A, V308A and P312A exchanges or deletions of amino acids 312–318 as indicated were grown in minimal medium (pH 7.0), and total cell extracts (TE) were analysed by immunoblotting using a c-Myc epitope-specific antibody. For T3S assays, bacteria were incubated in secretion medium. TE and culture supernatants (SN) were analysed by immunoblotting, using HrpB2-, HrpF- and AvrBs3-specific antibodies, respectively. *avrBs3* was ectopically expressed from plasmid pDSF300. For infection studies, bacteria were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed after 8 days. For better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol 3 days p.i. Dashed lines indicate the infiltrated areas. (b) A271N and P282A mutations and deletion of the LARxLY motif, respectively, abolish the efficient interaction of HrcU with HrpB2. GST and GST fusions of HrcU, HrcU<sub>A271N</sub>, HrcU<sub>P282A</sub>, HrcU<sub>V308A</sub>, HrcU<sub>P312A</sub> and HrcU <sub>$\Delta 312-318$</sub> , respectively, were immobilized on glutathione Sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HrpB2-c-Myc, HrcQ-c-Myc or HpaB-c-Myc. TE and eluted proteins (Eluates) were analysed by immunoblotting, using c-Myc- and GST-specific antibodies. Bands corresponding to GST or GST fusion proteins are marked by asterisks; lower bands presumably represent degradation products. (c) Amino acids A271, P282 and the LARxLY motif contribute to the interaction of HrcU with HpaC. GST and GST fusions of HrcU<sub>255-357</sub>, HrcU<sub>255-357/A271N</sub>, HrcU<sub>255-357/P282A</sub>, HrcU<sub>255-357/V308A</sub>, HrcU<sub>255-357/P312A</sub> and HrcU<sub>255-357/ $\Delta 312-318$</sub>  were immobilized on glutathione Sepharose and incubated with *E. coli* lysates containing HpaC-c-Myc. TE, and eluates were analysed as described in (b).

and P282A, respectively. Given that HrcU derivatives with A271N and P282A mutations partially complemented the *hrcU* mutant phenotype, the interaction between HrcU<sub>C</sub> and HpaC presumably contributes to but is not essential for HrcU function. A271N and P282A mutations also interfered with the interaction between HrcU and HrpB2, as well as with HrpB2 secretion. This observation is in line with the predicted role of HrcU as a substrate docking site for HrpB2 during the early phase of the T3S process. After the substrate specificity switch, however, the HrcU–HrpB2 interaction is presumably no longer required for HrpB2 secretion, suggesting the presence of alternative docking sites for HrpB2. Thus, a Y318D mutation in HrcU, which

presumably mimics the substrate specificity switch, still allows efficient HrpB2 secretion although the interaction with HrpB2 is reduced (Lorenz & Büttner, 2011). In agreement with this model, we show that low levels of HrpB2 are secreted in the presence of an HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> derivative, which does not interact with HrpB2 and HpaC *in vitro*. Furthermore, HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> promoted the translocation of an HrpB2<sub>1-76</sub>–AvrBs3 $\Delta 2$  reporter protein, suggesting that HrpB2 is not only secreted but also translocated. Translocation of HrpB2<sub>1-76</sub>–AvrBs3 $\Delta 2$  was also observed in *hpaC* deletion and *hrcU* mutant strains with mutations in or next to the NPTH motif that led to a loss of HrcU cleavage (Figs 1 and 2). We therefore conclude that the

HpaC-mediated substrate specificity switch and/or HrcU cleavage suppress the secretion and translocation of HrpB2. Notably, however, translocation of the native HrpB2 protein still needs to be confirmed.

We previously identified translocation signals in the N-terminal regions of the putative translocon proteins HrpF and XopA, which are presumably translocated in the absence of the general T3S chaperone HpaB (Büttner *et al.*, 2004). HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2, however, was not translocated by an *hpaB* deletion mutant (data not shown). Vice versa, the N-terminal region of HrpF did not target the AvrBs3Δ2 reporter for translocation in *hpaC* or selected *hrcU* mutant strains (data not shown). We therefore assume that HpaC and HrcU specifically inhibit the translocation of HrpB2 before the substrate specificity switch. Given the predicted function of HrpB2 as a periplasmic inner rod component of the T3S system (Hartmann *et al.*, 2012), the role of HrpB2 in the extracellular milieu or within the host cell remains to be investigated. Interestingly, secretion and translocation were previously also reported for predicted inner rod proteins from animal-pathogenic bacteria (Miao *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2008). As inner rod proteins can be detected within eukaryotic cells by the NLRC4 inflammasome (Miao *et al.*, 2010), suppression of their translocation after the assembly of the T3S system could help the pathogen evade recognition by the host immune system.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU2145/1-2 and BU 2145/5-1) and the Collaborative Research Centre (SFB 648) to D.B. We thank U. Bonas for critical comments on the manuscript.

## REFERENCES

- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L. J. & Cornelis, G. R. (2005). Characterization of a type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **56**, 54–67.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (editors) (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley.
- Berger, C., Robin, G. P., Bonas, U. & Koebnik, R. (2010). Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiology* **156**, 1963–1974.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293–300.
- Björnftot, A. C., Lavander, M., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. (2009). Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *J Bacteriol* **191**, 4259–4267.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. & Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**, 652–663.
- Bolchi, A., Ottonello, S. & Petrucco, S. (2005). A general one-step method for the cloning of PCR products. *Biotechnol Appl Biochem* **42**, 205–209.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 262–310.
- Büttner, D. & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 107–133.
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B. & Bonas, U. (2002). Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **184**, 2389–2398.
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D. & Bonas, U. (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol Microbiol* **54**, 755–768.
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E. & Bonas, U. (2006). Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **59**, 513–527.
- Cornelis, G. R., Agrain, C. & Sorg, I. (2006). Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **9**, 201–206.
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyk, M. K., Byrde, R. J. W. & Fielding, A. H. (1984). Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J* **3**, 3323–3328.
- Deane, J. E., Graham, S. C., Mitchell, E. P., Flot, D., Johnson, S. & Lea, S. M. (2008). Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Mol Microbiol* **69**, 267–276.
- Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S. & Lea, S. M. (2010). Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1065–1075.
- DePamphilis, M. L. & Adler, J. (1971). Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **105**, 384–395.
- Edqvist, P. J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. & Lloyd, S. A. (2003). YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**, 2259–2266.
- Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE* **3**, e3647.
- Escobar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. & Bonas, U. (2001). Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol* **2**, 287–296.
- Ferris, H. U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M. B., Kihara, M., Namba, K. & Macnab, R. M. (2005). FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem* **280**, 41236–41242.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648–1652.
- Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. & DeRosier, D. J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**, 1261–1270.
- Fraser, G. M., Hirano, T., Ferris, H. U., Devgan, L. L., Kihara, M. & Macnab, R. M. (2003). Substrate specificity of type III flagellar protein

- export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol Microbiol* **48**, 1043–1057.
- Ghosh, P. (2004).** Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 771–795.
- Hartmann, N., Schulz, S., Lorenz, C., Fraas, S., Hause, G. & Büttner, D. (2012).** Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* **158**, 1334–1349.
- He, S. Y., Nomura, K. & Whittam, T. S. (2004).** Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 181–206.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. & Schaad, N. W. (2004).** Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**, 755–762.
- Knoop, V., Staskawicz, B. & Bonas, U. (1991).** Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol* **173**, 7142–7150.
- Kousik, C. S. & Ritchie, D. F. (1998).** Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant Dis* **82**, 181–186.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S. I. (1998).** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602–605.
- Kutsukake, K., Minamino, T. & Yokoseki, T. (1994).** Isolation and characterization of FlkI-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 7625–7629.
- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P. J., Lloyd, S. A., Wolf-Watz, H. & Forsberg, A. (2002).** Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol* **184**, 4500–4509.
- Lorenz, C. (2009).** Functional characterization of the conserved components HrcN and HrcU of the type III secretion system from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. PhD thesis, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle, Germany.
- Lorenz, C. & Büttner, D. (2009).** Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **191**, 1414–1428.
- Lorenz, C. & Büttner, D. (2011).** Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol Microbiol* **79**, 447–467.
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U. & Büttner, D. (2008).** HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* **4**, e1000094.
- Lorenz, C., Hausner, J. & Büttner, D. (2012).** HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. *PLoS ONE* **7**, e51063.
- Lountos, G. T., Austin, B. P., Nallamsetty, S. & Waugh, D. S. (2009).** Atomic resolution structure of the cytoplasmic domain of *Yersinia pestis* YscU, a regulatory switch involved in type III secretion. *Protein Sci* **18**, 467–474.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galán, J. E. & Unger, V. M. (2004).** Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**, 1040–1042.
- Matteï, P. J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I. & Dessen, A. (2011).** Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**, 414–426.
- Miao, E. A., Mao, D. P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C. G., Warren, S. E., Leaf, I. A. & Aderem, A. (2010).** Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLR4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3076–3080.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J. & Stall, R. E. (1990).** Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* – pepper interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 41–47.
- Morbitzer, R., Elsaesser, J., Hausner, J. & Lahaye, T. (2011).** Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res* **39**, 5790–5799.
- Mueller, C. A., Broz, P. & Cornelis, G. R. (2008).** The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* **68**, 1085–1095.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. & Bonas, U. (2001).** cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* **41**, 1271–1281.
- Noël, L., Thieme, F., Gäbler, J., Büttner, D. & Bonas, U. (2003).** XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **185**, 7092–7102.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U. & Lahaye, T. (2009).** Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper *Bs3* alleles. *Plant Physiol* **150**, 1697–1712.
- Ronald, P. C. & Staskawicz, B. J. (1988).** The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol Plant Microbe Interact* **1**, 191–198.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. & Bonas, U. (1999).** The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9368–9373.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. & Bonas, U. (2000).** HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* **38**, 828–838.
- Sani, M., Allaoui, A., Fusetti, F., Oostergetel, G. T., Keegstra, W. & Boekema, E. J. (2007).** Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron* **38**, 291–301.
- Smith, T. G., Pereira, L. & Hoover, T. R. (2009).** *Helicobacter pylori* FlhB processing-deficient variants affect flagellar assembly but not flagellar gene expression. *Microbiology* **155**, 1170–1180.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Müller, S. A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A. & Cornelis, G. R. (2007).** YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J* **26**, 3015–3024.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U. & Büttner, D. (2010).** Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* **187**, 983–1002.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. & Bonas, U. (2002).** Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**, 13–23.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. & Bonas, U. (1996).** 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.
- Wengelnik, K., Rossier, O. & Bonas, U. (1999).** Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol* **181**, 6828–6831.
- Wiesand, U., Sorg, I., Amstutz, M., Wagner, S., van den Heuvel, J., Lührs, T., Cornelis, G. R. & Heinz, D. W. (2009).** Structure of the type

J. Hausner and D. Büttner

---

III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol* **385**, 854–866.

**Williams, A. W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S. I., Kawagishi, I. & Macnab, R. M. (1996).** Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**, 2960–2970.

**Wood, S. E., Jin, J. & Lloyd, S. A. (2008).** YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by

regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol* **190**, 4252–4262.

**Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2008).** Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**, 124–127.

---

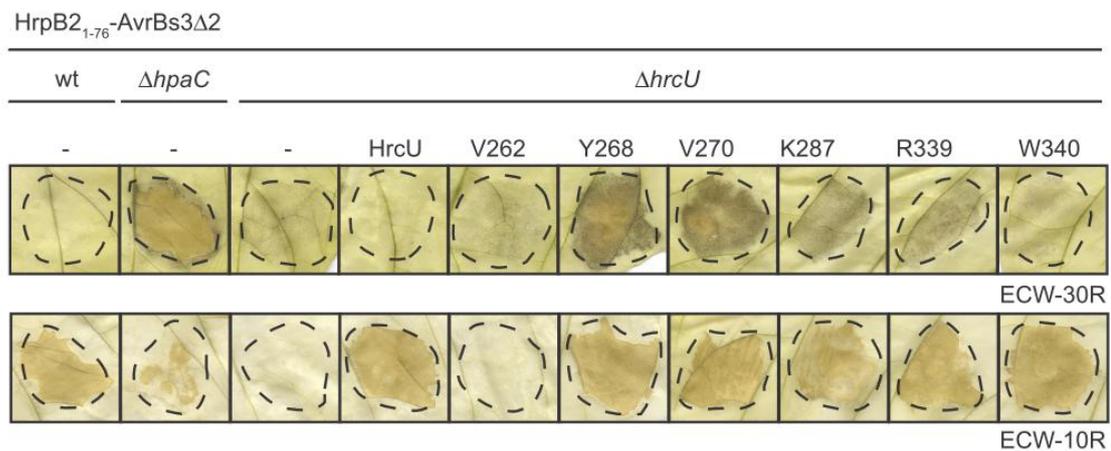
Edited by: V. Cid

## 2.3.2 Anhang der Publikation III

**Table S1:** Plasmids generated in this study.

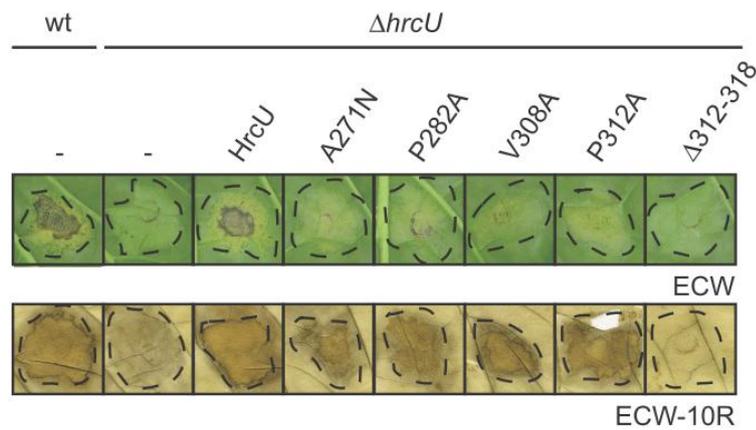
Plasmids	Relevant characteristics <sup>#</sup>
pBRMhrcU <sub>A271N</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>A271N</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>P282A</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>P282A</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>V308A</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>V308A</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>P312A</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>P312A</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>Δ217-228</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>Δ217-228</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>Δ243-257</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>Δ243-257</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>Δ247-261</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>Δ247-261</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>Δ312-318</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>Δ312-318</sub> -c-Myc
pBRMhrcU <sub>P265G/Y318D</sub>	pBRM derivative encoding HrcU <sub>P265G/Y318D</sub> -c-Myc
pDhrpB2 <sub>1-76-356</sub>	Derivative of pDSK602 encoding HrpB2 <sub>1-76</sub> -AvrBs3Δ2
pGhrcU <sub>A271N</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>A271N</sub>
pGhrcU <sub>P282A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>P282A</sub>
pGhrcU <sub>V308A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>V308A</sub>
pGhrcU <sub>P312A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>P312A</sub>
pGhrcU <sub>Δ217-228</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>Δ217-228</sub>
pGhrcU <sub>Δ243-257</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>Δ243-257</sub>
pGhrcU <sub>Δ247-261</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>Δ247-261</sub>
pGhrcU <sub>Δ312-318</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>Δ312-318</sub>
pGhrcU <sub>255-357/A271N</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/A271N</sub>
pGhrcU <sub>255-357/P282A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/P282A</sub>
pGhrcU <sub>255-357/V308A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/V308A</sub>
pGhrcU <sub>255-357/P312A</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/P312A</sub>
pGhrcU <sub>255-357/Δ312-318</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/Δ312-318</sub>
pGhrcU <sub>255-357/P265G/Y318D</sub>	pGEX-2TKM derivative encoding GST-HrcU <sub>255-357/P265G/Y318D</sub>
pUC57hrcU <sub>1-206</sub>	Derivative of pUC57ΔBsaI containing <i>hrcU</i> <sub>1-206</sub>
pUC57hrcU <sub>207-357</sub>	Derivative of pUC57ΔBsaI carrying <i>hrcU</i> <sub>207-357</sub>

<sup>#</sup> Ap, ampicillin; Gm, gentamycin; GST, glutathione *S*-transferase; R, resistant; Sm, spectinomycin.



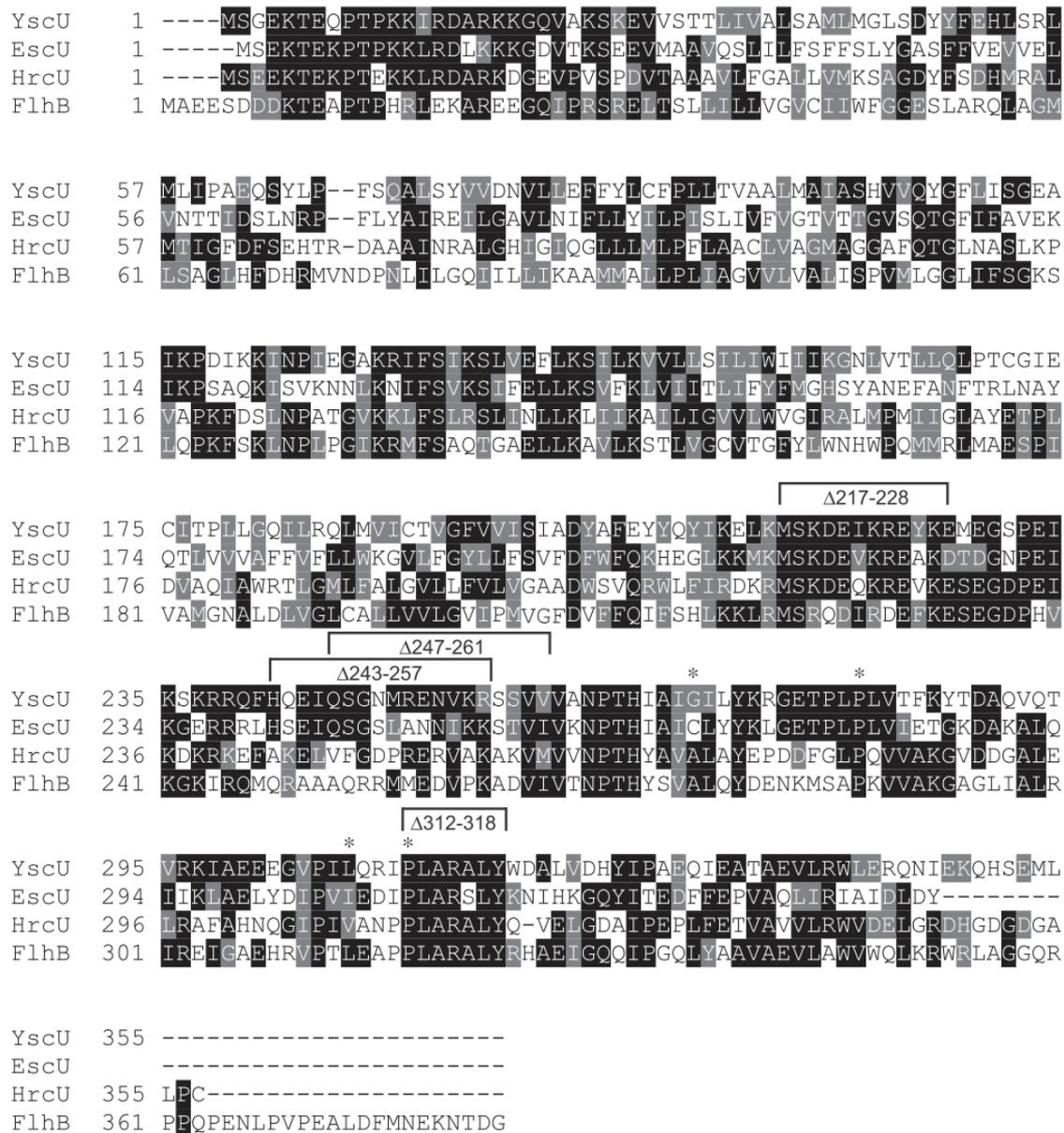
**Figure S1** HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 is translocated in the presence of pentapeptide insertions at positions 268 and 270 of HrcU.

*Xcv* strains 85\* (wt), 85\* $\Delta hpaC$  ( $\Delta hpaC$ ) and 85\* $\Delta hrcU$  ( $\Delta hrcU$ ) without plasmid (-) or containing expression constructs for HrcU-c-Myc (HrcU) and pentapeptide insertions thereof as indicated were inoculated at  $4 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> into leaves of ECW-30R (recognition of HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2) and ECW-10R (recognition of AvrBs1) pepper plants. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol two dpi (ECW-10R plants) and three dpi (ECW-30R plants). Dashed lines indicate the infiltrated areas.



**Figure S2** Complementation studies with HrcU point mutant derivatives.

Strains 85-10 (wt) and 85-10 $\Delta hrcU$  ( $\Delta hrcU$ ) carrying plasmid pBRM (-), HrcU-c-Myc (HrcU) or derivatives thereof with A271N, P282A, V308A, P312A exchanges and deletions of amino acids 312 to 318, respectively, were inoculated into leaves of susceptible ECW and resistant ECW-10R pepper plants. Disease symptoms were photographed after 8 days. For the better visualization of the HR, leaves were bleached in ethanol three dpi. Dashed lines indicate the infiltrated areas.



**Figure S3** Sequence alignment of HrcU and homologs. Amino acid sequences of HrcU from *Xcv* (GenBank accession no. CAJ22057), YscU from *Yersinia pestis* (AAS58555), EscU from *Escherichia coli* (AAL57530) and FlhB from *Salmonella enterica* (AAL20830) were aligned using ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)). Conserved amino acids are highlighted in black, amino acids with similar chemical properties in grey. Numbers refer to amino acid positions. Amino acids of HrcU that were mutated in this study are marked by asterisks. Internal deletions that were introduced into HrcU are indicated.



### 2.3.3 Zusammenfassung der Publikation III

Die Publikation „The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates“ beschäftigte sich mit der molekularen Charakterisierung des YscU-homologen Proteins HrcU aus *Xcv*. Frühere Studien zeigten, dass HrcU am Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt ist und mit dem T3S-Chaperon HpaB, der vorhergesagten C-Ringkomponente HrcQ, dem T3S4-Protein HpaC sowie mit dem „frühen“ Substrat HrpB2 interagiert. Durch Analyse von HrcU-Derivaten mit einer Insertion von fünf Aminosäuren oder einer Aminosäuresubstitution konnten Bereiche in der C-terminalen Domäne von HrcU (HrcU<sub>C</sub>) identifiziert werden, die einen Beitrag zur Sekretion von „frühen“ und/oder „späten“ Substraten leisten und für die Spaltung von HrcU<sub>C</sub> erforderlich sind. Da Mutationen in *hrcU* die T3S und Translokation von HrpB2 und Effektorproteinen unterschiedlich beeinflussen, kann vermutet werden, dass HrcU die Sekretion von verschiedenen Substratklassen durch unabhängige Mechanismen kontrollieren kann. Die Ergebnisse von Infektionsstudien mit *hrcU*-Deletionsstämmen, die ein spaltungsdefizientes HrcU-Derivat synthetisierten, deuten darauf hin, dass die Spaltung von HrcU<sub>C</sub> zur Virulenz von *Xcv* beiträgt, jedoch nicht essentiell für die Pathogenität ist. Translokationsstudien mit HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3Δ2 lassen vermuten, dass die Spaltung von HrcU<sub>C</sub> und/oder das T3S4-Protein HpaC die Translokation des „frühen“ Substrates HrpB2 supprimieren kann. Frühere Studien weisen darauf hin, dass die Interaktion von HrpB2 mit HrcU<sub>C</sub> für die effiziente HrpB2-Sekretion wichtig ist (Lorenz & Büttner, 2011). Weil das HrcU-Derivat HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> nicht mehr detektierbar mit HrpB2 interagiert und das HrpB2-Sekretionsdefizit einer *hrcU*-Mutante partiell komplementierte, kann angenommen werden, dass HrpB2 auch von weiteren Substratbindestellen des T3S-Systems erkannt wird. Neben HrcU-Derivaten mit einer Insertion oder Aminosäuresubstitution wurden HrcU-Derivate analysiert, welche eine Deletion von Aminosäuren in der „linker“-Region (Aminosäuren 207 bis 264) oder dem LARxLY-Motiv (Aminosäuren 312 bis 318) enthielten. Alle untersuchten HrcU-Deletionsderivate konnten den Phänotyp einer *hrcU*-Deletionsmutante nicht komplementieren. Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass alle HrcU-Deletionsderivate mit HpaB und HrcQ interagierten, währenddessen die Interaktion der Derivate HrcU<sub>Δ247-261</sub> und HrcU<sub>Δ312-318</sub> zu HrpB2 sowie die Interaktion des Derivates HrcU<sub>Δ312-318</sub> mit HpaC negativ beeinträchtigt war. Diese Daten lassen vermuten, dass die „linker“-Region und das LARxLY-Motiv für die Proteinfunktion essentiell sind und deuten darauf hin, dass die Aminosäuren 247 bis 261 zur Interaktion zwischen HrcU mit HrpB2 beitragen und die Aminosäuren 312 bis 318 für die Interaktion von HrcU mit HrpB2 und HpaC von Bedeutung sind.

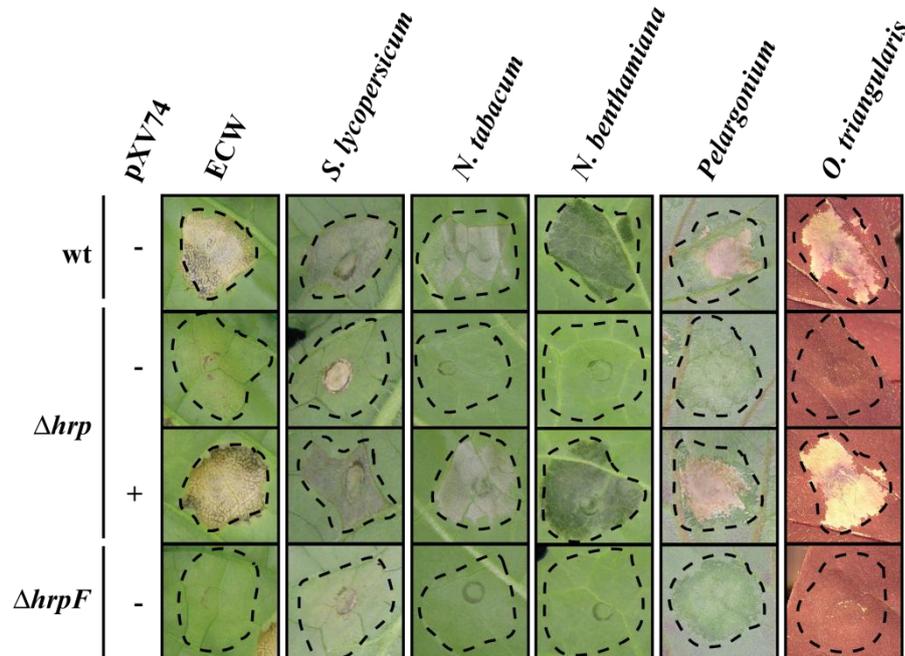
## 2.4 Die Erstellung eines modularen *hrp*-Genclusters

### 2.4.1 „proof of concept“ - Die Komplementation einer *hrp*-Gencluster-Mutante

Um die Charakterisierung von T3S-Komponenten und der Regulationsmechanismen des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus *Xcv* zu erleichtern, sollte ein System entwickelt werden, welches es erlaubt effizient und zur selben Zeit multiple Mutationen in die Nukleotidsequenz des *hrp*-Genclusters einzubringen. Zu diesem Zweck sollte die Nukleotidsequenz des *hrp*-Genclusters in Module unterteilt werden, welche gerichtet zum *hrp*-Gencluster assembliert werden können (siehe Abschnitt 2.4.2). Durch die Mutation der einzelnen Module können somit effizient und gleichzeitig vielfältige Mutationen in das *hrp*-Gencluster eingebracht werden. Das modular klonierte *hrp*-Gencluster könnte anschließend für Komplementationsstudien in eine *hrp*-Genclustermutante transferiert werden. In einem Vorexperiment sollte daher untersucht werden, ob es möglich ist eine *hrp*-Genclustermutante durch die *in trans*-Expression des *hrp*-Genclusters zu komplementieren. Aus diesem Grund wurde eine 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp*-Mutante erstellt, in der die Operons *hrpB* bis *hrpF* sowie ein Großteil des *hrpA*-Operons deletiert wurden (siehe Abbildung 1.3). Die Generierung der *hrp*-Mutante erfolgte, wie in Huguet *et al.* (1998) beschrieben, unter der Verwendung eines Suizidplasmids, welches die flankierenden Regionen des *hrp*-Genclusters und einen Teil des *hrpA*-Operons enthielt (Huguet *et al.*, 1998). Um die *hrp*-Mutante zu komplementieren wurde das Cosmid pXV74 verwendet, welches in einer früheren Studie erstellt wurde (Wengelnik *et al.*, 1996a) und das *hrp*-Gencluster des *Xcv*-Stammes 75-3 enthält, das identisch zum *hrp*-Gencluster des *Xcv*-Stammes 85-10 ist. Das Cosmid pXV74 wurde mittels triparentaler Konjugation in den Stamm 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp* transferiert und der neu generierte Stamm 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp* pXV74 sowie die Stämme 85-10*hrpG\** und 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp* in Paprika- und Tomatenpflanzen inokuliert. Wie erwartet, führte die Inokulation von 85-10*hrpG\** zur Ausbildung von Krankheitssymptomen in ECW-Paprikapflanzen und Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum*, Kultivar „Moneymaker“), während nach der Inokulation des 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp*-Stammes keine Ausbildung von pflanzlichen Symptomen beobachtet werden konnte (Abbildung 2.3). Der Phänotyp des 85-10*hrpG\** $\Delta$ *hrp*-Stammes konnte durch pXV74 komplementiert werden (siehe Abbildung 2.3), was vermuten lässt, dass durch die *in trans*-Expression der *hrp*-Gene ein funktionales T3S-System assembliert werden kann.

Das *hrp*-Gencluster ist aber nicht nur für die Ausbildung von Krankheitssymptomen auf Wirtspflanzen, sondern auch für die Induktion einer HR in resistenten Wirtspflanzen sowie auf Nicht-Wirtspflanzen essentiell (Bonas *et al.*, 1991). So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass nach der Inokulation von *Xcv* in *Nicotiana tabacum* (Kultivar „Bottom special“)

und *Vigna unguiculata* (Kultivar „Blackeye“) eine HR auf diesen Pflanzen induziert wird (Bonas *et al.*, 1991). Um zu überprüfen, ob die *in trans*-Expression des *hrp*-Genclusters für eine Nicht-Wirts-Pathogen-Interaktion in bisher noch nicht getesteten Nicht-Wirtspflanzen essentiell ist, wurden neben *Nicotiana tabacum* auch *Nicotiana benthamiana*, *Pelargonium* und *Oxalis triangularis* mit verschiedenen *Xcv*-Stämmen infiziert.



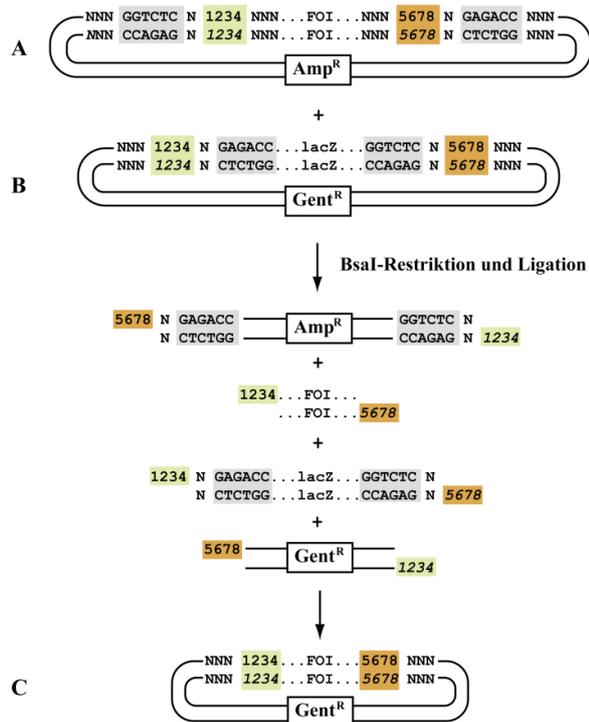
**Abbildung 2.3: Infektionsstudien mit *Xcv* auf Paprika- und Tomatenpflanzen sowie auf verschiedenen Nicht-Wirtspflanzen.** Die *Xcv*-Stämme 85-10*hrpG*\* (wt), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpF* und 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrp*, welche kein Cosmid (-) oder das Cosmid pXV74 (+) enthalten, wurden in ECW-Paprikapflanzen, Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum*), *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Pelargonium* oder in *O. triangularis* mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> inokuliert. Das Cosmid pXV74 ist ein pLAFR3-Derivat, welches das gesamte *hrp*-Gencluster des *Xcv*-Stammes 75-3 enthält. Die Krankheitssymptome wurden drei (*S. lycopersicum*) bzw. sieben Tage (ECW) nach der Inokulation dokumentiert, während die pflanzlichen Reaktionen auf Nicht-Wirtspflanzen ein bis neun Tage nach der Inokulation dokumentiert wurden. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Die Infiltration von *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Pelargonium* und *Oxalis triangularis* mit 85-10*hrpG*\* führte zur Ausbildung einer Nicht-Wirtsreaktion, welche durch ein lokales Absterben der Pflanze im Bereich der Inokulationsstelle gekennzeichnet ist, während nach der Inokulation des 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrp*- sowie des 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpF*-Stammes keine pflanzlichen Reaktionen festgestellt werden konnten (Abbildung 2.3). HrpF bildet wahrscheinlich das Translokation des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus *Xcv* aus, das den Transport von Effektorproteinen über die Plasmamembran der Wirtszelle vermittelt (Büttner *et al.*, 2002). Die Komplementationsstudien lassen somit vermuten, dass die pflanzlichen Reaktionen nicht auf die Erkennung von *Xcv* oder T3S-Komponenten zurückzuführen sind. Der Phänotyp einer *hrp*-Mutante bzgl. der pflanzlichen Reaktion auf den Nicht-Wirtspflanzen konnte durch

pXV74 komplementiert werden, was darauf hin deutet, dass das Translokations-assoziierte T3S-System für die Induktion der pflanzlichen Reaktionen essentiell ist und vermutlich Effektorproteine in unterschiedliche Pflanzen translozieren kann.

#### **2.4.2 Die Assemblierung des *hrp*-Genclusters aus Modulen**

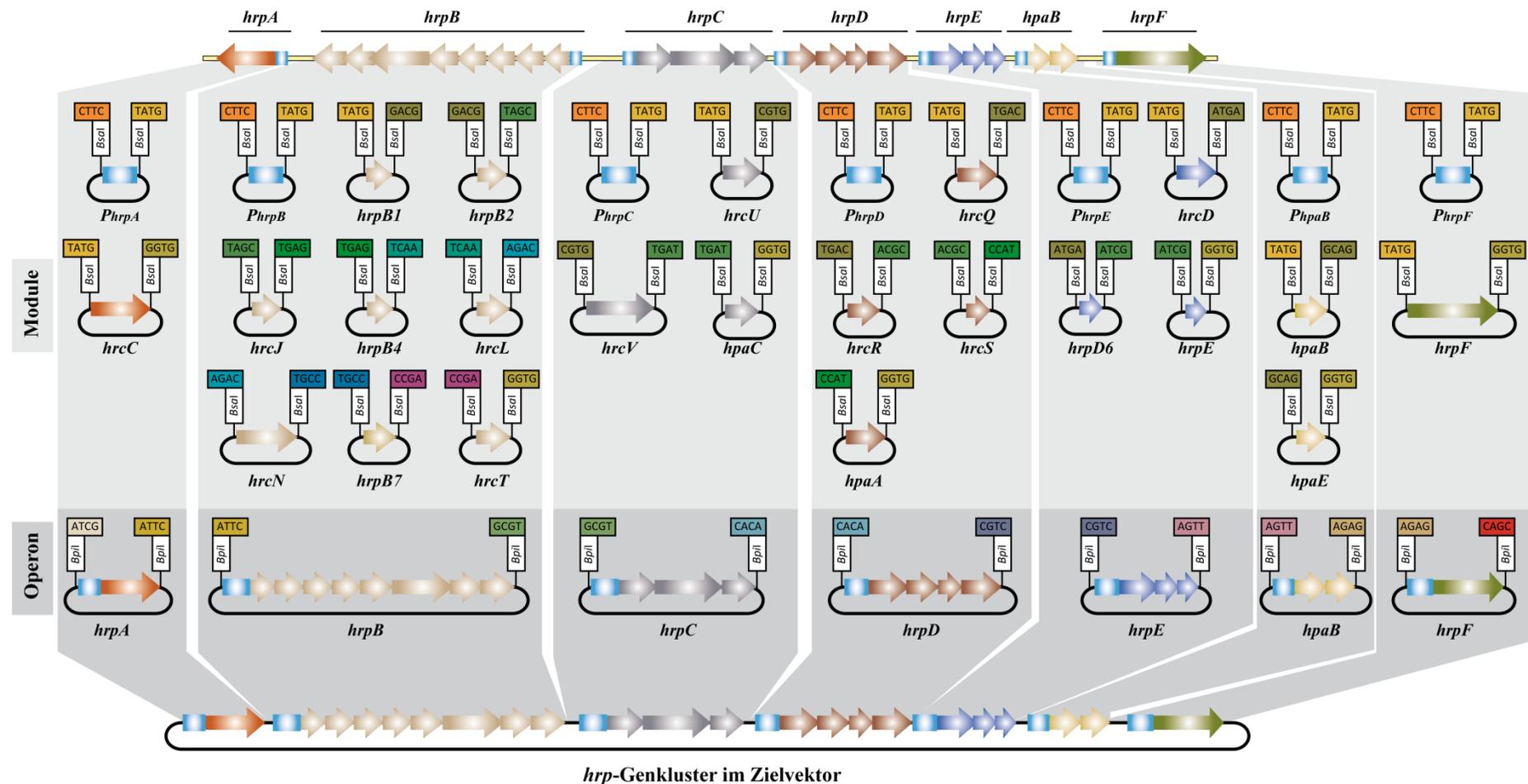
Das modulare System basiert auf der Klonierung der einzelnen Gene und Promotoren des *hrp*-Genclusters (Module), die anschließend schrittweise gerichtet assembliert und kloniert werden können (siehe Abbildung 2.5). Die Gene des *xopF1*-Operons des *hrp*-Genclusters wurden nicht in das modulare System einbezogen, da die Deletion des *xopF1*-Operons keinen Einfluss auf die Pathogenität von *Xcv* hatte (Büttner *et al.*, 2007). Für die Assemblierung der einzelnen Module wurde die „Golden Gate“-Klonierungsmethode gewählt, welche sich verschiedener Typ IIs-Restriktionsenzyme (z. B. *BsaI*, *Esp3I* oder *BpiI*) bedient, um DNA-Fragmente zu klonieren, ohne zusätzliche Nukleotide in die ursprüngliche DNA-Sequenz einzubringen (siehe Abbildung 2.4) (Engler *et al.*, 2008). Die Erkennungssequenz und Restriktionsschnittstelle überschneiden sich bei diesen Enzymen nicht, wodurch es möglich ist, die Erkennungssequenz des Enzyms außerhalb des zu klonierenden Fragments zu positionieren sowie spezifische Überhänge zu generieren, deren Komposition frei wählbar ist (siehe Abbildung 2.4). Da die Erkennungssequenz des Typ IIs-Restriktionsenzym im Zielvektor nicht mehr vorhanden ist, kann die Restriktionsspaltung und die Ligation der DNA-Fragmente in einem Reaktionsgefäß parallel stattfinden (Engler *et al.*, 2008). Nach der Klonierung werden die Module von der Erkennungssequenz des Typ IIs-Restriktionsenzym *BsaI* flankiert, weshalb die Module ausgeschnitten und durch die entstehenden Nukleotidüberhänge gerichtet zu den jeweiligen Operonen des *hrp*-Genclusters assembliert werden können (siehe Abbildung 2.6 und Kapitel 2.4.3). Nach der Assemblierung der einzelnen Operons können diese auf ihre Fähigkeit überprüft werden, als unabhängige transkriptionelle Einheit zu agieren (siehe Kapitel 2.4.4). Diese Überprüfung ist notwendig, da bisher noch unklar ist, ob der genomische Gesamtkontext der einzelnen Operons für die Expression der *hrp*-Gene und für die effiziente Funktion des T3S-Systems bedeutend ist. Weiterhin ist die Assemblierung des gesamten *hrp*-Genclusters aus 30 DNA-Fragmenten in einer „Golden Gate“-Klonierung vermutlich ineffizient, weshalb es sinnvoll ist, erst jedes Operon separat zu assemblieren. Die klonierten Operons werden ebenfalls von einer Erkennungssequenz eines Typ IIs-Restriktionsenzym (*BpiI*) flankiert, wodurch alle Operons ausgeschnitten und gerichtet in einen Zielvektor kloniert werden können (siehe Abbildung 2.5). Durch die Mutation der einzelnen Module können durch das modulare System effizient und gleichzeitig vielfältige Mutationen in das *hrp*-Gencluster eingebracht werden.



**Abbildung 2.4: Prinzip der „Golden Gate“-Klonierungsmethode.** A) Das zu klonierende DNA-Fragment („fragment of interest“, FOI), kann als PCR-Produkt oder als bereits kloniertes FOI in die Klonierung eingesetzt werden und wird von der Erkennungssequenz des Typ II-Restriktionsenzym *BsaI* (grau) flankiert, die entgegengesetzt orientiert sind. B) Der Zielvektor enthält für eine Blau-Weiß-Selektion das *lacZa*-Fragment (*lacZ*), welches ebenfalls von *BsaI*-Erkennungssequenzen flankiert wird, die komplementär zu den Erkennungssequenzen des FOI orientiert sind. Durch die *BsaI*-Restriktionsspaltung entsteht ein vier Nukleotid langer Überhang (braun und grün), dessen Komposition frei wählbar ist (1234 und 5678 stehen für eine beliebige Reihenfolge der Nukleotide). C) Da sich die Erkennungssequenz und die Restriktionsschnittstelle bei diesen Enzymen nicht überschneiden, kann die Restriktionsspaltung und Ligation in einem Reaktionsgefäß durchgeführt sowie die Erkennungssequenzen so positioniert werden, dass sie im Zielkonstrukt nicht enthalten sind. Kursive Zahlen weisen auf Nukleotide des komplementären DNA-Stranges hin. Mögliche Produkte zwischen den Vektor-Fragmenten und dem FOI bzw. des *lacZa*-Fragments wurden nicht gezeigt. N, beliebiges Nukleotid. Abbildung nach (Engler *et al.*, 2008).

### 2.4.3 Experimentelle Vorgehensweise für die Klonierung der Module

Die Klonierung des *hrp*-Genclusters verlangt, dass alle Erkennungssequenzen der verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme aus den zu klonierenden Sequenzen entfernt werden, ohne die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins zu verändern. In Abbildung 2.6 ist die verwendete Methodik für die Klonierung der einzelnen Module des *hrpC*-Operons exemplarisch dargestellt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *BsaI*, *BpiI* und *Esp3I* wurden durch eine PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese aus den Genen und Promotoren der Operons entfernt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide waren im 5'-



**Abbildung 2.5: Vorgehensweise für die Assemblierung des *hrp*-Genclusters aus den einzelnen *hrp*-Genen.** Die Module enthalten die klonierten *hrp*-Gene (Pfeile) oder Promotoren (hellblaue Boxen) und werden von *BsaI*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Durch die Nukleotidüberhänge (farbige Boxen mit vier Buchstaben), welche nach einer *BsaI*-Restriktionsspaltung entstehen, können die Module gerichtet zu den jeweiligen Operonen assembliert und anschließend kloniert werden. Die Komposition der Nukleotidüberhänge ist von der Nukleotidsequenz des jeweiligen Operons abhängig, damit keine Mutationen in die Operons eingebracht werden. Jedes Operon wird von *BpiI*-Erkennungssequenzen flankiert, wodurch alle Operons (*hrpA* bis *hrpF* und *hpaB*) ausgeschnitten und gerichtet assembliert sowie in einen Zielvektor kloniert werden können. Die Namen der klonierten *hrp*-Gene sowie der Promotoren des jeweiligen Operons ( $P_{hrpA}$  bis  $P_{hrpF}$  und  $P_{hpaB}$ ) sind unterhalb der einzelnen Module angegeben.

Bereich durch *BsaI*- und *Esp3I*-Erkennungssequenzen oder nur durch *Esp3I*-Erkennungssequenzen flankiert und ermöglichten somit die Klonierung der Amplifikate über eine *Esp3I*-„Golden Gate“-Klonierung in pICH41021 (S. Marillonnet, unveröffentlichte Daten), welcher ein pUC19-Derivat ist und ebenfalls durch Oligonukleotide mit flankierenden *Esp3I*-Restriktionsschnittstellen amplifiziert wurde (Abbildung 2.6, Mitte). Gene und Promotoren ohne interne *BsaI*-, *BpiI*- und *Esp3I*-Erkennungssequenz wurden durch Oligonukleotide amplifiziert, die von einer *BsaI*-Erkennungssequenz flankiert waren. Weiterführend wurden diese Amplifikate „blunt end“ in pICH41021 kloniert, welcher mit *SmaI* geschnitten wurde (siehe Abbildung 2.6, links und rechts). Überlappten die kodierenden Sequenzen zweier hintereinander liegenden Gene, wurde die kodierende Nukleotidsequenz des stromaufwärts befindlichen Gens vollständig kloniert, während das Modul des stromabwärts befindlichen Gens nicht die überlappende kodierende Nukleotidsequenz enthielt. Da die PIP-Boxen mancher *hrp*-Operonpromotoren in dem stromaufwärts befindlichen Operon enthalten sind, wurden für die Klonierung der PIP-Boxen auch Teile der kodierenden Nukleotidsequenzen des letzten Gens des stromaufwärts befindlichen Operons amplifiziert (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Promotorlänge und Position der PIP-Boxen der einzelnen *hrp*-Operons.**

Operon	Länge des Promotors <sup>1</sup>	Überschneidung des Promotors <sup>3</sup>	Position der PIP-Box
<i>hrpA</i>	205 Bp	124 Bp	Keine PIP-Box <sup>4</sup>
<i>hrpB</i>	119 Bp	32 Bp	106 Bp stromaufwärts des GTG-Startcodons <sup>5</sup>
<i>hrpC</i>	103 Bp	32 Bp	94 Bp stromaufwärts des ATG-Startcodons <sup>6</sup>
<i>hrpD</i>	279 Bp	148 Bp	273 Bp stromaufwärts des ATG-Startcodons <sup>7</sup>
<i>hrpE</i>	279 Bp <sup>2</sup>	279 Bp <sup>2</sup>	280 Bp stromaufwärts des GTG-Startcodons <sup>8</sup> bzw. 7 Bp stromaufwärts des annotierten ATG-Startcodons
<i>hpaB</i>	259 Bp	205 Bp	keine PIP-Box
<i>hrpF</i>	403 Bp	-	Imperfekte PIP-Box 146 Bp stromaufwärts des ATG-Startcodons <sup>9</sup>

<sup>1</sup> Die Länge des Promotors ist in Basenpaaren (Bp) angegeben.

<sup>2</sup> Der Promotor bezieht sich auf das annotierte ATG-Startcodon.

<sup>3</sup> Die Länge der Überschneidung zwischen dem klonierten Promotor und der kodierenden Sequenz des stromaufwärts liegenden Operons ist in Basenpaaren (Bp) angegeben. Das *hrpC*- und *hrpB*-Operon sind entgegengesetzt orientiert (siehe Kapitel 1.10.2, Abbildung 1.3), wodurch sich die klonierten Promotoren überschneiden.

<sup>4</sup> (Wengelnik *et al.*, 1996a)

<sup>5</sup> (Fenselau & Bonas, 1995, Koebnik *et al.*, 2006)

<sup>6</sup> (Koebnik *et al.*, 2006)

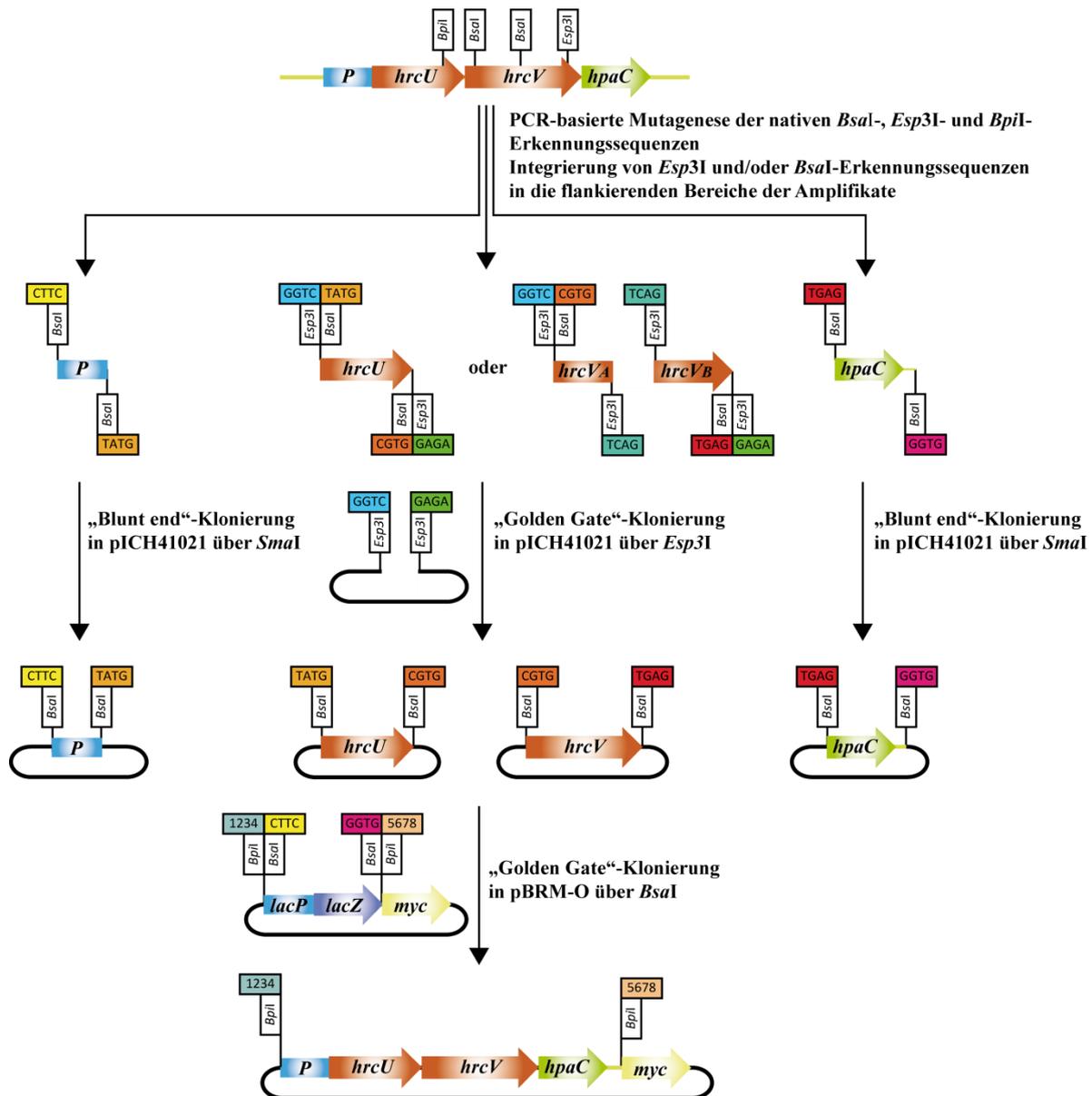
<sup>7</sup> (Huguet *et al.*, 1998, Koebnik *et al.*, 2006)

<sup>8</sup> (Koebnik *et al.*, 2006, Weber *et al.*, 2007)

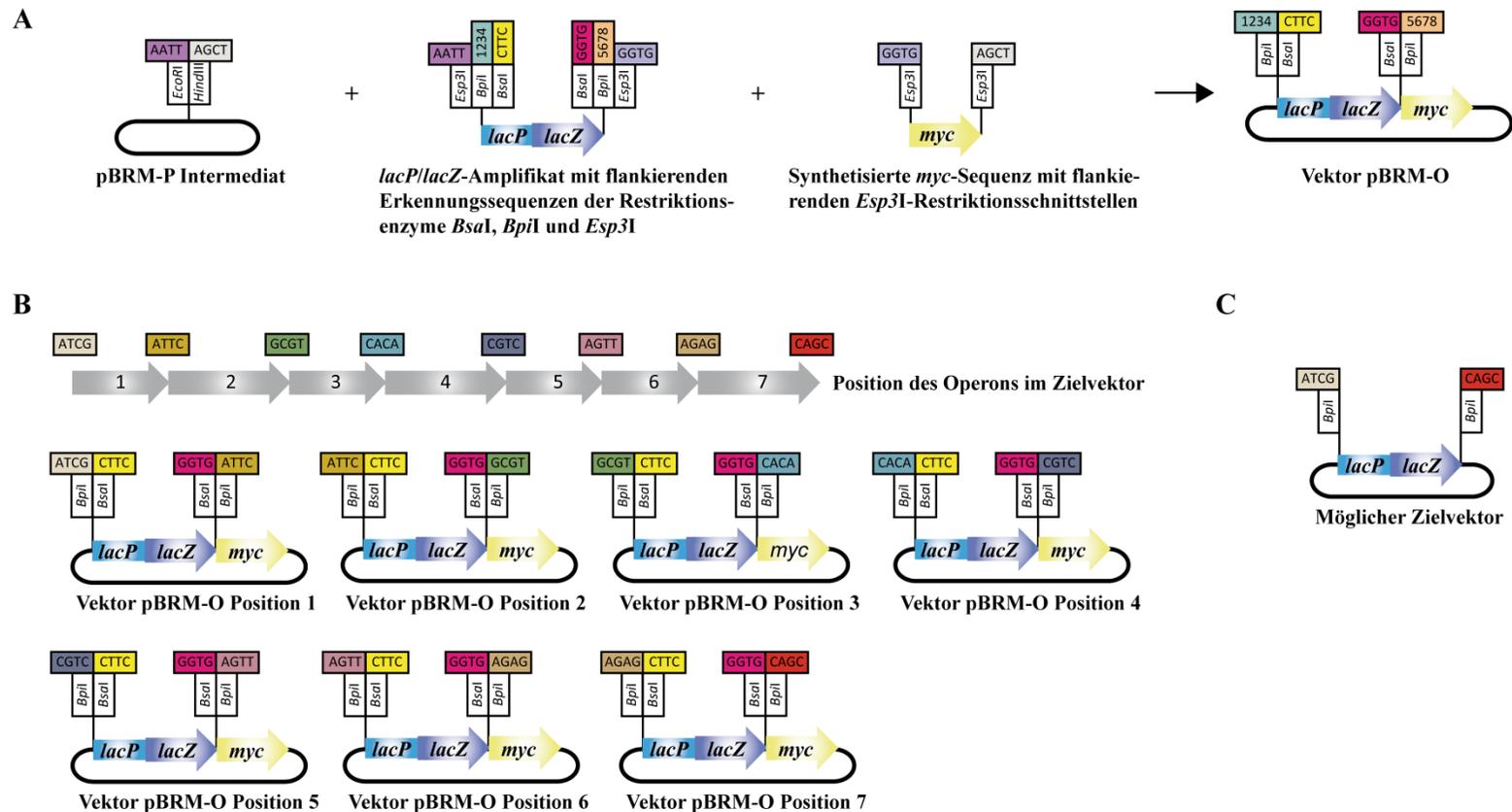
<sup>9</sup> (Huguet & Bonas, 1997, Koebnik *et al.*, 2006)

Die klonierten Module werden im Vektor pICH41021 von *BsaI*-Erkennungssequenzen flankiert, wodurch die Module ausgeschnitten, gerichtet assembliert und in den Vektor pBRM-O kloniert werden können (siehe Abbildung 2.6). Für die Generierung des pBRM-O-Vektors wurde der *lac*-Promotor und das *lacZα*-Fragment aus pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) mit Oligonukleotiden amplifiziert, die von *BsaI*-, *BpiI*- und *Esp3I*-Erkennungssequenzen flankiert waren (Abbildung 2.7, A). Anschließend wurde das Amplifikat mit einer für das 3x c-Myc-Epitop kodierenden Nukleotidsequenz in den Vektor pBRM-P-Intermediat kloniert (Abbildung 2.7, A). Der Vektor pBRM-P-Intermediat ist ein Derivat des „broad-host-range“-Vektors pBRM (Szczeny *et al.*, 2010), der sowohl in *E. coli* als auch in *Xcv* repliziert wird und keine Erkennungssequenzen für Typ II-Restriktionsenzyme enthält. Durch die Verwendung von verschiedenen pBRM-O-Vektoren, die nach der *BpiI*-Restriktionsspaltung zu unterschiedlichen flankierenden Nukleotidüberhängen der Operons führen, können die einzelnen Operons gerichtet an verschiedene Positionen in einen Zielvektor kloniert werden (siehe Abbildung 2.7, B). Ein Zielvektor wurde noch nicht generiert, dieser könnte jedoch für eine Blau-Weiß-Selektion den *lacP*-Promotor und das *lacZα*-Fragment des pBRM-Vektors flankierend von *BpiI*-Erkennungssequenzen sowie das Rückgrat des Cosmids pLAF3, welches für die Generierung des Cosmids pXV74 verwendet wurde, enthalten (siehe Abbildung 2.7, C).

Die für das 3x c-Myc-Epitop kodierende Nukleotidsequenz wurde durch die Firma MWG-Operon synthetisiert und erlaubt eine translationale Fusion zwischen dem letzten Genprodukt des jeweiligen Operons mit dem 3x c-Myc-Epitop. Das Amplifikat des letzten Gens jedes Operons enthielt aber nicht nur die kodierende Nukleotidsequenz, sondern auch eine 95 bis 165 lange Nukleotidsequenz stromabwärts des annotierten Stoppcodons, um eventuelle Transkriptionsterminatoren mit einzuschließen. Das letzte Genprodukt aller Operons enthält somit ein Stoppcodon und wird nicht als translationale Fusion mit dem 3x c-Myc-Epitop synthetisiert. In den Kapiteln 2.1.1 und 2.2.1 wurde beschrieben, dass die *in trans*-Expression von *hrcQ* oder *hrpB1* einen negativen Effekt auf die Pathogenität von *Xcv* hat. Aus diesem Grund wurden die einzelnen *hrp*-Operons auch in das Genom von *Xcv* durch den „Golden Gate“-kompatiblen Suizidvektor pLAND-P (siehe Kapitel 2.1.1) integriert. Durch die Verwendung der „Golden Gate“-Klonierungsmethode war lediglich die Modifizierung des 5'-Überhangs der Promotoren notwendig, da alle anderen Überhänge untereinander kompatibel waren. Die Integration der einzelnen Operons erfolgte in die *hpaF/hpaG*-Region des Genoms von *Xcv*, wie in Huguet *et al.* (1998) beschrieben (Huguet *et al.*, 1998). Die *hpaF/hpaG*-Region wurde als Integrationsort ausgewählt, da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass Mutationen in der *hpaF/hpaG*-Region nicht mit der Pathogenität von *Xcv* interferieren (Noël *et al.*, 2002, Tamir-Ariel *et al.*, 2007).



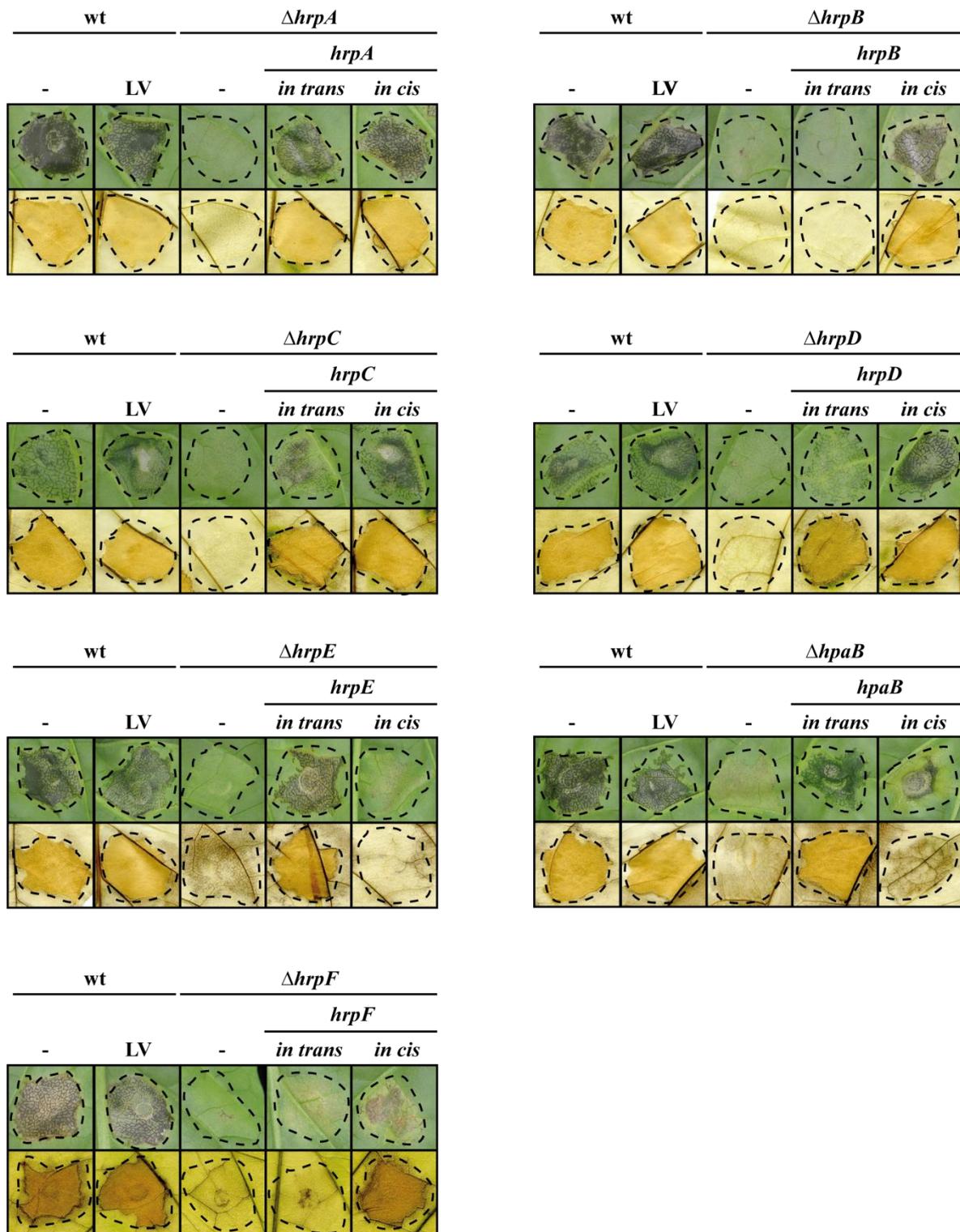
**Abbildung 2.6: Methodik für die Generierung der Module und die Assemblierung der einzelnen *hrp*-Operons am Beispiel des *hrpC*-Operons.** Interne *Bsal*-, *Bpil*- und *Esp31*-Erkennungssequenzen der Gene *hrcU* und *hrcV* wurden durch eine PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese entfernt. Da *hrcV* eine *Bsal*-Erkennungssequenz in der Mitte der kodierenden Nukleotidsequenz besitzt, wurde das Gen in zwei Fragmente (*hrcV<sub>A</sub>* und *hrcV<sub>B</sub>*) unterteilt und diese separat amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide waren durch *Bsal*- sowie *Esp31*-Erkennungssequenzen oder nur durch *Esp31*-Erkennungssequenzen flankiert und erlaubten dadurch eine *Esp31*-„Golden Gate“-Klonierung der Amplifikate in den Vektor pICH41021 (S. Marillonnet, unveröffentlichte Daten), welcher ebenfalls durch Oligonukleotide amplifiziert wurde, die von *Esp31*-Erkennungssequenzen flankiert waren. Der natürliche Promotor des *hrpC*-Operons (P) sowie *hpaC* enthalten keine internen *Bsal*-, *Bpil*- und *Esp31*-Erkennungssequenzen und wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die von *Bsal*-Erkennungssequenzen flankiert waren. Die Amplifikate wurden anschließend „blunt end“ in den Vektor pICH41021 kloniert, welcher vorher mit *SmaI* geschnitten wurde. Das *hpaC*-Amplifikat umfasst nicht nur das Gen, sondern auch 137 Nukleotide stromabwärts des annotierten Stoppcodons, wodurch HpaC nicht als translationale Fusion mit dem 3x c-Myc-Epitop synthetisiert wird. Alle Gene und der natürliche Promotor können durch eine weitere *Bsal*-„Golden Gate“-Klonierung assembliert und in den Vektor pBRM-O kloniert werden. Das assemblierte *hrpC*-Operon wird von *Bpil*-Erkennungssequenzen flankiert. Die Komposition der Nukleotidüberhänge hängt von dem verwendeten pBRM-O Vektor ab (siehe Abbildung 2.7).



**Abbildung 2.7: Die Vektoren der pBRM-O-Serie bestimmen die Position des Operons im Zielvektor.** **A**) Generierung der pBRM-O Vektoren. Der *lac*-Promotor (*lacP*) und das *lacZ<sub>α</sub>*-Fragment (*lacZ*) wurden aus dem Vektor pBRR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) mit Oligonukleotiden amplifiziert, welche von *BsaI*-, *BpiI*- und *Esp31*-Erkennungssequenzen flankiert waren. Das *lacPlacZ*-Amplifikat sowie die *myc*-Nukleotidsequenz (*myc*), welche für ein 3x c-Myc-Epitop kodiert und von *Esp31*-Erkennungssequenzen flankiert wird, wurden über *Esp31* in den *EcoRI/HindIII* geschnittenen Vektor pBRM-P-Intermediat kloniert. Der daraus erhaltene Vektor pBRM-O enthält eine *BsaI*- sowie eine *BpiI*-Erkennungssequenz. Die nach einer *BpiI*-Restriktionsspaltung entstehenden Nukleotidüberhänge (1234 und 5678) unterscheiden sich je nach Position des Operons im Zielvektor. Die *myc*-Sequenz wurde durch die Firma MWG-Operon synthetisiert und erlaubt eine translationale Fusion zwischen dem letzten Genprodukt des jeweiligen Operons mit dem 3x c-Myc-Epitop. **B**) Die assemblierten *hrp*-Operons werden nach der Klonierung in dem Vektor pBRM-O von *BpiI*-Erkennungssequenzen flankiert. Durch die Verwendung von Vektoren mit unterschiedlichen Nukleotidüberhängen können die einzelnen Operons gerichtet an verschiedene Positionen im Zielvektor kloniert werden. **C**) Mögliches Design des Zielvektors. Der Zielvektor sollte für eine Blau-Weiß-Selektion den *lacP*-Promotor und das *lacZ<sub>α</sub>*-Fragment des pBRR1MCS-5-Vektors, flankierend von *BpiI*-Erkennungssequenzen sowie das Vektorrückgrat des Cosmids pLAF3, welches für die Generierung des Cosmids pXV74 (siehe Kapitel 2.4.1) verwendet wurde, enthalten. Farbige Balken geben die Sequenz der Überhänge an.

#### 2.4.4 Die Komplementation einzelner *hrp*-Operonmutanten

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Operons als unabhängige transkriptionelle Einheit agieren können, wurden *Xcv*-Stämme erstellt, die in jeweils einem *hrp*-Operon (*hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE*, *hpaB*, *hrpF*) deletiert sind. Falls Überlappungen zwischen einem Gen und dem Promotor des folgenden Operons vermutet wurden, blieben Teile des zu deletierenden Operons im Genom von *Xcv* erhalten, welche jedoch zu keinem funktionalen Protein führten. Für die Komplementationsstudien wurden die einzelnen *hrp*-Operons ektopisch (*in trans*) unter der Kontrolle des nativen Promotors in der jeweiligen Operonmutante exprimiert oder vorher in die *hpaF/hpaG*-Region in das Genom (*in cis*) der jeweiligen Operonmutante integriert. Im Gegensatz zu 85-10*hrpG*\*-Stämmen, die in je einem einzelnen *hrp*-Operon deletiert waren, führte die Inokulation des Stammes 85-10*hrpG*\* zur Ausbildung von Krankheitssymptomen in ECW-Pflanzen sowie zu einer HR in resistente ECW-10R-Pflanzen (Abbildung 2.8). Während das *hrpA*-Operon den Phänotyp einer *hrpA*-Operonmutante sowohl durch die *in trans*- als auch durch die *in cis*-Expression komplementierte, konnte der Phänotyp einer *hrpC*- und *hrpD*-Operonmutante nur durch die *in cis*-Expression des jeweiligen Operons komplementiert werden (Abbildung 2.8). Der Phänotyp einer *hrpE*- und *hpaB*-Operonmutante konnte hingegen durch die *in cis*-Expression der jeweiligen Operons nicht bzw. nur partiell komplementiert werden, obwohl die *in trans*-Expression dieser Operone zu einer vollständigen Komplementation des Phänotyps der jeweiligen Operonmutante führte. Weiterhin konnte der Phänotyp einer *hrpB*- und *hrpF*-Operonmutante nur durch eine *in cis*-Expression des jeweiligen Operons partiell komplementiert werden (Abbildung 2.8). Zusammenfassend lassen die Infektionsexperimente den Schluss zu, dass die einzelnen *hrp*-Operons als unabhängige transkriptionelle Einheit agieren können. Weil die *in cis*- oder *in trans*-Expression der Operons mit der Virulenz von *Xcv* interferiert, sollte in weiterführenden Experimenten ein möglicher Einfluss der flankierenden Regionen auf die Expression des *hrpE* und des *hpaB*-Operons untersucht sowie sichergestellt werden, dass die klonierten Promotoren ausreichend für eine effiziente Expression der einzelnen Operons sind. Weiterhin ist es vermutlich notwendig das assemblierte *hrp*-Gencluster in einem Vektor mit einer niedrigen Kopienzahl zu klonieren oder in das Genom einer *hrp*-Mutante zu integrieren.



**Abbildung 2.8: Komplementationsstudien mit verschiedenen *hrp*-Operonmutanten.** Die *Xcv*-Stämme 85-10*hrpG*\* (wt), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpA* ( $\Delta$ *hrpA*), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpB* ( $\Delta$ *hrpB*), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpC* ( $\Delta$ *hrpC*), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpD* ( $\Delta$ *hrpD*), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpE* ( $\Delta$ *hrpE*), 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hpaB* ( $\Delta$ *hpaB*) und 85-10*hrpG*\* $\Delta$ *hrpF* ( $\Delta$ *hrpF*), welche kein Plasmid (-), einen pBRM (LV) oder ein bestimmtes *hrp*-Operon *in trans* bzw. *in cis* exprimierten, wurden in ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer bakteriellen Dichte von  $4 \times 10^8$  KBE ml<sup>-1</sup> inokuliert. Die Krankheitssymptome wurden nach sieben Tagen bzw. für das *hrpB*- und *hrpF*-Operon am neunten Tag nach der Inokulation dokumentiert. Für eine bessere Visualisierung wurden die Blätter von resistenten Pflanzen zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol gebleicht. Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Die putative C-Ringkomponente HrcQ ist eine Substratbindestelle für T3S-abhängig sekretierte Proteine

##### 3.1.1 Unter Sekretionsbedingungen assoziiert HrcQ mit bakteriellen Membranen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HrcQ nicht sekretiert wird, mit sich selbst interagiert und unter Sekretionsbedingungen mit der bakteriellen Membran assoziiert (siehe Kapitel 2.1.1). Außer der HrcQ-Selbstinteraktion konnte weiterhin eine Interaktion von HrcQ mit den IM-Komponenten HrcU und HrcV sowie mit der zytoplasmatischen T3S-assoziierten ATPase HrcN und ihrem putativen Regulator HrcL (siehe Kapitel 2.1.1), welche ebenfalls unter Sekretionsbedingungen mit bakteriellen Membranen assoziieren (Lorenz & Büttner, 2009), nachgewiesen werden. Die Homologie von HrcQ zu C-Ringkomponenten aus tierpathogenen Bakterien (Diepold & Wagner, 2014) und die experimentellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass HrcQ eine zytoplasmatische C-Ringkomponente des Translokations-assoziierten T3S-Systems ist, welche im Komplex mit den zytoplasmatischen Proteinen HrcN und HrcL unter Sekretionsbedingungen an das T3S-System bindet. Die Interaktion des C-Ring-ATPase-Komplexes mit dem T3S-System könnte dabei durch die IM-Komponenten HrcU oder HrcV vermittelt werden. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnte ebenfalls eine Komplexbildung zwischen der putativen C-Ringkomponente, der T3S-assoziierten ATPase und/oder ihrem Regulator für verschiedene tierpathogene Bakterien gezeigt werden (Jackson & Plano, 2000, Jouihri *et al.*, 2003, Morita-Ishihara *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2008, Johnson & Blocker, 2008, Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2011). Wie für HrcQ, konnten für die HrcQ-homologen Proteine aus *P. syringae*, *Y. pseudotuberculosis* und für C-Ringkomponenten des Flagellum-assoziierten T3S-Systems die Ausbildung eines oligomeren Komplexes nachgewiesen (Fadouloglou *et al.*, 2004, Paul & Blair, 2006, Bzymek *et al.*, 2012) sowie für die putativen C-Ringkomponenten aus EPEC und *P. syringae* eine Anlagerung an Membranen gezeigt werden (Fadouloglou *et al.*, 2004, Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2011).

Die C-Ringkomponente Spa33 aus *S. flexneri* konnte durch Immunogoldmarkierung auf der zytoplasmatischen Seite der IM, in der Nähe des Translokations-assoziierten T3S-Systems, lokalisiert werden (Morita-Ishihara *et al.*, 2006). Dennoch konnte bis heute durch die elektronenmikroskopische Analyse von gereinigten Translokations-assoziierten T3S-Systemen noch keine C-Ringstruktur nachgewiesen werden, wie es für das Flagellum-assoziierte T3S-System beschrieben ist (Kubori *et al.*, 1998, Kimbrough & Miller, 2000, Tamano *et al.*, 2000, Blocker *et al.*, 2001, Sekiya *et al.*, 2001, Yip *et al.*, 2005, Kawamoto *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass der C-Ring des Translokations-

assoziierten T3S-Systems während der Reinigungsprozedur der isolierten T3S-Apparate dissoziiert. Neueste Studien zeigen durch einen *in situ*-Vergleich von Translokations-assoziierten und Flagellum-assoziierten T3S-Systemen, dass sich die beiden Apparate bzgl. des C-Ringes deutlich unterscheiden. Demnach besitzt das Translokations-assoziierte T3S-System aus *Salmonella* spp. keine zytoplasmatische C-Ringstruktur. Stattdessen bildet vermutlich die C-terminale zytoplasmatische Domäne der IM-Komponente InvA (YscV-Homolog) eine als „wing-like disc“ bezeichnete Struktur auf der zytoplasmatischen Seite der IM, nahe des T3S-Systems aus (Kawamoto *et al.*, 2013). Diese Struktur könnte als Barriere gegen eine freie Proteindiffusion durch das T3S-System dienen, um einen spezifischen und regulierten Proteintransport zu gewährleisten (Kawamoto *et al.*, 2013). Obwohl die verwendete Auflösung der elektronenmikroskopischen Studien keine Struktur wie den C-Ring des Flagellum-assoziierten T3S-Systems hervorbrachte, vermuten die Autoren, dass die putative C-Ringkomponente SpaO mit den zytoplasmatischen Proteinbereichen der IM-Ringkomponenten assoziiert und eine Ringstruktur formt, die ein funktionales Gegenstück zu dem Flagellum-assoziierten C-Ring bildet (Kawamoto *et al.*, 2013). Vermutlich könnte auch HrcQ eine ähnliche zytoplasmatische Struktur des T3S-Systems ausbilden. Die exakte Lokalisierung von HrcQ in einem assemblierten T3S-System ist eine technische Herausforderung, die eine elektronenmikroskopische Analyse von T3S-Apparaten *in situ* verlangt. Bisher gelangen jedoch keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen von T3S-Apparaten aus *Xcv*. Eine Alternative wäre die *in situ*-Lokalisierung eines HrcQ-GFP-Fusionsproteins. Durch die Fluoreszenzmikroskopie von *Xcv*-Stämmen, die HrcQ-GFP synthetisieren, konnten innerhalb eines *Xcv*-Bakteriums ein bis vier distinkte Fluoreszenzpunkte nachgewiesen werden (Jens Hausner, unveröffentlichte Daten), was möglicherweise auf die Oligomerisation von HrcQ zurückzuführen ist. Wird eine weitere T3S-Komponente, die oligomere Komplexe ausbilden kann, mit einem anderen Fluoreszenzprotein markiert und überlappen die Fluoreszenzsignale der beiden Proteine, kann die *in situ*-Lokalisierung von HrcQ zumindest auf eine Co-Lokalisierung mit der jeweiligen T3S-Komponente eingegrenzt werden.

### **3.1.2 Die C-Ringkomponente HrcQ ist eine mögliche Substratbindestelle für T3S-System-abhängig sekretierte Proteine**

HrcQ interagiert neben zytoplasmatischen und IM-Komponenten des T3S-Systems auch mit den sekretierten T3S-Komponenten HrpB2 und HrpE sowie mit Effektorproteinen, was darauf hin deutet, dass HrcQ eine Substratbindestelle des Translokations-assoziierten T3S-Systems sein könnte. Die effiziente Erkennung von T3S-Substraten ist wahrscheinlich von

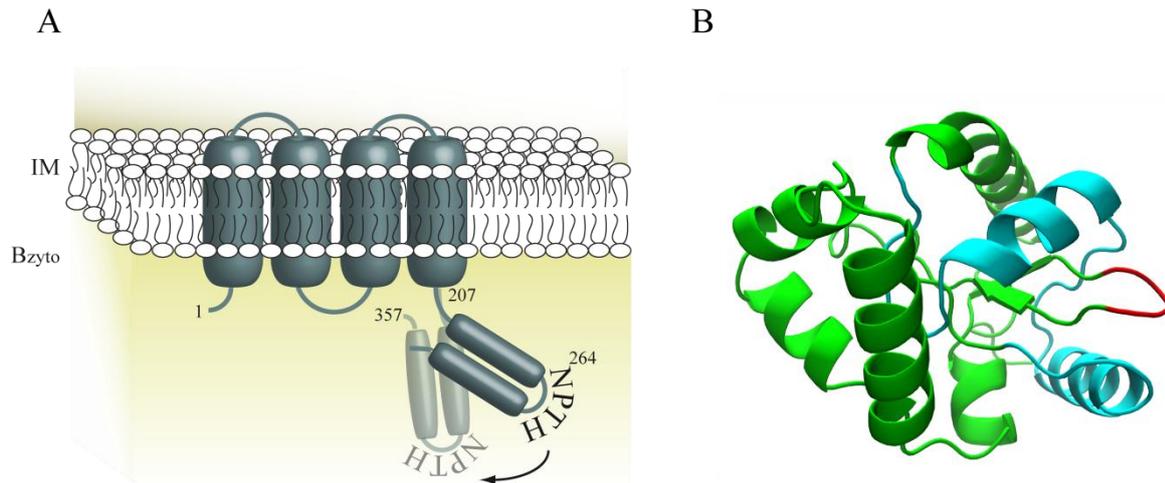
einem N-terminalen T3S-Signal und möglicherweise zusätzlich von der Chaperonbindestelle abhängig (Lee & Galan, 2004, Galan & Wolf-Watz, 2006, Arnold *et al.*, 2010). Für die Interaktion zwischen HrcQ und dem Effektorprotein AvrBs3 waren die N-terminalen 152 Aminosäuren von AvrBs3, welche das T3S-Signal und die Chaperonbindestelle enthalten (Büttner *et al.*, 2004), jedoch nicht erforderlich (siehe Kapitel 2.1.1). Die erhaltenen Daten lassen demnach vermuten, dass die AvrBs3-HrcQ-Interaktion erst nach dem signalvermittelten Transport zum T3S-System stattfindet und dass die effiziente Erkennung von T3S-Substraten indirekt von T3S-Chaperonen abhängig ist. In der Tat konnte zwischen HrcQ und dem T3S-Chaperon HpaB eine schwache Interaktion detektiert werden, die darauf hin deuten könnte, dass HrcQ an der Erkennung des T3S-Chaperons und damit an der Rekrutierung von T3S-Substraten beteiligt ist. Weil HpaB nicht nur mit HrcQ, sondern auch mit HrcN sowie mit den IM-Komponenten HrcU und HrcV interagiert (Lorenz & Büttner, 2009, Hartmann & Büttner, 2013), besitzt das Translokations-assoziierte T3S-System vermutlich mehrere HpaB-Bindestellen. Die Ausbildung eines C-Ring-Chaperon-Komplexes konnte ebenfalls in anderen Translokations-assoziierten und Flagellum-assoziierten T3S-Systemen nachgewiesen (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2006, Spaeth *et al.*, 2009, Lara-Tejero *et al.*, 2011) und für die putative C-Ringkomponente Spa33 aus *S. flexneri* eine direkte Interaktion mit Effektorproteinen gezeigt werden (Morita-Ishihara *et al.*, 2006). Komponenten des C-Ringes sind somit wahrscheinlich an der Rekrutierung von T3S-Substraten beteiligt (Morita-Ishihara *et al.*, 2006) und stellen damit vermutlich eine zentrale Stelle für Multi-Proteininteraktionen dar (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2006, Spaeth *et al.*, 2009). Der vorhergesagte C-Ring scheint jedoch nicht nur die Funktion einer generellen Substratbindestelle zu übernehmen. Für die putative C-Ringkomponente SpaO aus *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass SpaO im Komplex mit anderen zytoplasmatischen Komponenten eine Plattform bildet, die durch T3S-Chaperone spezifisch mit T3S-Substraten „beladen“ werden kann (Lara-Tejero *et al.*, 2011). Aus diesem Grund postulieren die Autoren, dass der putative C-Ring im Komplex mit weiteren zytoplasmatischen Proteinen eine Sortierungsplattform bildet, die eine Hierarchie der zu sekretierenden Proteine festlegt. Möglicherweise bildet auch HrcQ eine zytoplasmatische Sortierungsplattform des T3S-Systems, die zu einer geordneten und hierarchischen Sekretion beiträgt. In weiterführenden Studien sollte diese Theorie durch eine Immunopräzipitation von HrcQ aus *Xcv* mit anschließender massenspektroskopischer Analyse überprüft werden. Auf diese Weise können T3S-Substrate identifiziert werden, die mit der vorhergesagten C-Ringkomponente interagieren. Durch die Verwendung von geeigneten *Xcv*-Mutanten, welche in einem oder mehreren T3S-Substraten deletiert sind, könnte HrcQ mit anderen T3S-Substraten „beladen“ und diese Interaktionspartner durch die benannten Methoden identifiziert werden. Somit

könnten diese Experimente Aufschluss über eine mögliche hierarchische HrcQ-abhängige Sortierungsstruktur von sekretierten Proteinen geben.

### 3.2 HrcU und der Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems

#### 3.2.1 Die Spaltung von HrcU ist nicht essentiell für die Proteinfunktion

Neben der vorhergesagten C-Ringkomponente HrcQ wurde in dieser Arbeit auch die IM-Komponente HrcU untersucht. Die C-terminale zytoplasmatische Domäne von HrcU (HrcU<sub>C</sub>) ist vermutlich am Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems beteiligt und wird wahrscheinlich zwischen dem Asparagin (N) und Prolin (P) des konservierten NPTH-Motivs gespalten (Lorenz & Büttner, 2011). Die Analyse von HrcU-Derivaten mit einer Insertion von fünf Aminosäuren verdeutlichte, dass Insertionen in der Nähe des NPTH-Motivs sowie Insertionen im Bereich der Aminosäuren 287 bis 327 zu einem Verlust der detektierbaren HrcU-Spaltung führten (siehe Kapitel 2.3.1). Komplementationsstudien mit diesen spaltungsdefizienten HrcU-Derivaten zeigten weiterhin, dass die meisten HrcU-Derivate in der Lage waren den Phänotyp sowie das HrpF-Sekretionsdefizit einer *hrcU*-Deletionsmutante partiell zu komplementieren. Die erhaltenen Daten lassen somit vermuten, dass die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung *per se* nicht für die Funktion des Proteins essentiell ist. Die *in silico*-Vorhersage der HrcU<sub>C</sub>-Struktur mit dem Programm iTasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), weist darauf hin, dass die Aminosäuren 287 bis 327 in der räumlichen Nähe des NPTH-Motivs zwei  $\alpha$ -Helices ausbilden, die durch eine unstrukturierte Region verbunden sind (Abbildung 3.1). Es ist vorstellbar, dass Veränderungen in diesem Bereich die Konformation des Proteins im oder nahe des NPTH-Motivs ändern und somit die Spaltung beeinflussen. Die Analyse von Kristallstrukturen für EscU aus EPEC, YscU aus *Y. pestis* und Spa40 aus *S. flexneri* zeigten, dass die autokatalytische Spaltung die Zyklisierung des konservierten Asparaginrestes des NPTH-Motivs erfordert, welche durch weitere Aminosäuren stabilisiert wird (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009). Der Mechanismus der autokatalytischen Spaltung erfordert daher eine spezifische Konformation der NPTH-Schleife, welche vermutlich durch die korrekte Faltung der C-terminalen Domäne stabilisiert wird (Deane *et al.*, 2008). So beeinflussten Veränderungen im oder in der Nähe des NPTH-Motivs auch die Spaltung in HrcU-homologen Proteinen (Ferris *et al.*, 2005, Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009, Wiesand *et al.*, 2009). Die Analyse der Kristallstrukturen zeigte weiterhin, dass die Spaltung des konservierten NPTH-Motivs zu einer veränderten Ladung der Proteinoberfläche in diesem



**Abbildung 3.1: Die „linker“-Region in HrcU könnte eine Positionsveränderung von HrcU<sub>C</sub> ermöglichen.** A) HrcU besteht aus vier transmembranen Helices und einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne (Berger *et al.*, 2010), in der das konservierte NPTH-Motiv (rot) lokalisiert ist. Kristallstrukturen von HrcU-homologen Proteinen weisen darauf hin, dass der Bereich zwischen den transmembranen Helices und dem NPTH-Motiv („linker“-Region) eine hohe Flexibilität besitzt (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008). Eventuell könnte auch die „linker“-Region in HrcU (Aminosäuren 207 bis 263) eine hohe Flexibilität aufweisen, wodurch eine Bewegung der C-terminalen Domäne weg von der IM denkbar wäre. Zahlen weisen auf die Aminosäureposition hin. B) Die vorhergesagte tertiäre Struktur von HrcU<sub>C</sub> wurde durch das Programm iTasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) generiert. Durch die Aminosäuren 287 bis 327 werden in der räumlichen Nähe des NPTH-Motivs zwei  $\alpha$ -Helices ausgebildet, welche durch einen unstrukturierten Bereich getrennt sind (cyan). IM, innere Membran; Bzyto, bakterielles Zytoplasma.

Bereich führt, welche die Interaktion mit weiteren T3S-Komponenten gestatten würde (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte durch Fraktionierungsstudien mit EPEC nachgewiesen werden, dass die Spaltung von EscU für die effiziente Assoziation des T3S-Chaperons CesT mit der IM wichtig ist (Thomassin *et al.*, 2011), wodurch postuliert wurde, dass die Spaltung von EscU für die Rekrutierung von Chaperon-Effektor-Komplexen von Bedeutung ist (Thomassin *et al.*, 2011). Obwohl das gespaltene EscU-Protein eine gute Bindestelle für andere T3S-Komponenten darstellt, induziert vermutlich nicht die Spaltung selbst den Substratspezifitätswechsel (Zarivach *et al.*, 2008). Experimente mit dem Translokations-assoziierten T3S-System aus *S. typhimurium* weisen darauf hin, dass die vollständige Assemblierung der „inner rod“-Struktur eine Konformationsänderung im T3S-System induziert, wie möglicherweise in Vertretern der YscU/FlhB-Proteinfamilie, welche zu dem Substratspezifitätswechsel des T3S-Systems führt (Marlovits *et al.*, 2006). YscU-homologe Proteine und das T3S4-Protein würden demnach ihren Einfluss auf den Substratspezifitätswechsel durch die Sekretionskontrolle der „inner rod“-Proteine ausüben (Wood *et al.*, 2008). Welchen Einfluss die HrcU-Spaltung auf die Rekrutierung von T3S-Komponenten an die IM hat, wurde für *Xcv* noch nicht genau untersucht. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen spaltungsdefizienten HrcU-

Derivaten mit dem T3S-Chaperon HpaB und der putativen C-Ringkomponente HrcQ nicht beeinträchtigt war (siehe Kapitel 2.3.1), was vermuten lässt, dass die Spaltung für die Rekrutierung von HpaB und HrcQ nicht notwendig ist. Ob die Rekrutierung von anderen T3S-Komponenten durch ein spaltungsdefizientes HrcU-Derivat an die IM gestört ist, könnte durch Fraktionierungsstudien untersucht werden.

### **3.2.2 Die „linker“-Region und das LARxLY-Motiv könnten für die Rekrutierung von T3S-Komponenten erforderlich sein**

HrcU-Derivate mit einer Deletion oder Insertion von Aminosäuren zwischen den transmembranen Helices und dem NPTH-Motiv (auch bezeichnet als „linker“-Region) konnten den Phänotyp einer *hrcU*-Deletionsmutante nicht komplementieren (siehe Kapitel 2.3.1). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Deletionen und Aminosäuresubstitutionen in der „linker“-Region von HrcU-homologen Proteinen wie FlhB aus *Salmonella* spp. und EscU aus EPEC berichtet (Fraser *et al.*, 2003, Zarivach *et al.*, 2008). Kristallstrukturen der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von EscU aus EPEC, SpaS aus *S. typhimurium*, YscU aus *Y. pestis* und Spa40 aus *S. flexneri* zeigten, dass die „linker“-Region eine hohe Flexibilität besitzt (Deane *et al.*, 2008, Zarivach *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009). Eine solche Flexibilität könnte eine Bewegung der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne weg von der IM erlauben und somit die Größe und die elektrostatischen Bedingungen der Eintrittsstelle für T3S-Substrate verändern (Zarivach *et al.*, 2008, Lountos *et al.*, 2009). In Übereinstimmung mit dieser Theorie weisen Experimente mit FlhB aus *Salmonella* spp. darauf hin, dass Mutationen in *flhB* die Wahrscheinlichkeit des Eintritts von flagellaren Proteinen in die T3S-Eintrittspore erhöhen (Minamino & Namba, 2008) und FlhB somit eine Rolle in der Blockade des T3S-Systems spielen könnte (Deane *et al.*, 2008). Da Vertreter der YscU/FlhB-Proteinfamilie mit T3S-Komponenten, wie T3S-Chaperonen (Lorenz & Büttner, 2009) und Translokonproteinen (Creasey *et al.*, 2003) interagieren, könnte eine Positionsveränderung der C-terminalen Domäne möglicherweise auch die korrekte Rekrutierung dieser sowie weiterer T3S-Komponenten ermöglichen (Deane *et al.*, 2008). Ob die „linker“-Region aus *Xcv* eine hohe Flexibilität aufweist, kann mit den bisherigen experimentellen Daten nicht geklärt werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass neben EscU, YscU, Spa40 und SpaS auch die „linker“-Region von HrcU eine gewisse Flexibilität aufweist, welche eventuell die Positionsveränderungen von HrcU<sub>C</sub> erlauben würde (siehe Abbildung 3.1).

Neben der „linker“-Region scheint ebenfalls das konservierte LARxLY-Motiv, das vermutlich in der räumlichen Nähe des NPTH-Motivs lokalisiert ist (siehe Kapitel 2.3.1), eine bedeutende Rolle für die Proteinfunktion von HrcU zu besitzen. Ein HrcU-Derivat, welches

im LARxLY-Motiv deletiert ist, konnte den Phänotyp einer *hrcU*-Mutante nicht komplementieren, wurde nicht mehr gespalten und interagiert nicht mehr effizient mit HrpB2 und HpaC (siehe Kapitel 2.3.1). Eine Beeinflussung der Spaltung sowie der Interaktion zu HrpB2 und HpaC ist vermutlich auf eine Konformationsänderung im Bereich des NPTH-Motivs zurückzuführen, da gezeigt werden konnte, dass das NPTH-Motiv sowohl für die Spaltung als auch für die Interaktion von HrcU mit HrpB2 und HpaC essentiell ist (Lorenz & Büttner, 2011). Ein direkter Beitrag des konservierten LARxLY-Motivs für die Interaktion von HrcU mit HrpB2 und HpaC kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Kristallstrukturen von Spa40 aus *S. flexneri* zeigten, dass das LARxLY-Motiv Teil einer stark positiv geladenen  $\alpha$ -Helix in der räumlichen Nähe des NPTH-Motivs ist (Deane *et al.*, 2008). Deane *et al.* (2008) vermuteten auf Grund der konservierten Aminosäuren, welche die Position der  $\alpha$ -Helix in Spa40 bestimmen und durch die räumliche Nähe der positiv geladenen  $\alpha$ -Helix zum NPTH-Motiv, dass das LARxLY-Motiv für die Rekrutierung oder Bindung von T3S-Komponenten von Bedeutung ist (Deane *et al.*, 2008). Eine Kokristallisation von HrcU<sub>C</sub> mit ausgewählten T3S-Komponenten könnte Aufschluss über den Einfluss des LARxLY-Motivs auf die Interaktion zwischen HrcU<sub>C</sub> mit diesen T3S-Komponenten geben.

### **3.2.3 HrcU kontrolliert die Sekretion von „frühen“ und „späten“ Substraten durch unabhängige Mechanismen**

Das Derivat HrcU<sub>R339</sub> wurde effizient gespalten und erlaubte die Sekretion des „frühen“ T3S-Substrates HrpB2 ohne Einschränkungen, während die Sekretion von „späten“ T3S-Substraten reduziert war (siehe Kapitel 2.3.1). In einer früheren Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Derivat HrcU<sub>Y318D</sub> den Phänotyp eines *hpaC*-Deletionsstammes hinsichtlich der Krankheitssymptome und des partiellen Sekretionsdefizits von Translokon- und Effektorproteinen komplementieren kann (Lorenz & Büttner, 2011). Vermutlich besitzt das nicht mehr effizient gespaltene Derivat HrcU<sub>Y318D</sub> eine veränderte Proteinkonformation, welche die Sekretion von Effektoren erlaubt, aber die HrpB2-Sekretion nicht beeinflusst (Lorenz & Büttner, 2011). Es kann somit vermutet werden, dass HrcU die Sekretion von „frühen“ und „späten“ Substraten durch unabhängige Mechanismen kontrollieren kann. Weil spaltungsdefiziente HrcU-Derivate mit dem „frühen“ Substrat HrpB2 interagierten und das HrpB2-Sekretionsdefizit einer *hrcU*-Mutante komplementierten (Lorenz & Büttner, 2011), könnte die Sekretion von HrpB2 eventuell vor der HrcU<sub>C</sub>-Spaltung durch die Interaktion mit dem NPTH-Motiv ermöglicht werden. Interessanterweise konnte das HrpB2-Sekretionsdefizit einer *hrcU*-Mutante durch das HrcU-Derivat HrcU<sub>P265G/Y318D</sub>, welches in Protein-Protein-

Interaktionsstudien nicht mehr detektierbar mit HrpB2 interagierende, partiell komplementiert werden. Die Daten weisen darauf hin, dass HrpB2 durch weitere T3S-Komponenten, wie z. B. HrcQ oder HrcV, welche als Interaktionspartner von HrpB2 identifiziert wurden (siehe Kapitel 2.1.1) (Hartmann & Büttner, 2013), erkannt wird. Obwohl die autokatalytische Spaltung von Mitgliedern der YscU/FlhB-Proteinfamilie direkt nach der Synthese und Faltung stattfinden sollte, zeigten Studien mit YscU, dass nie alle YscU-Proteine gespalten waren, obgleich die YscU-Spaltung zu einem Zeitpunkt analysiert wurde, an dem alle Nadeln ihre korrekte Länge und den „tip“-Komplex besaßen (Sorg *et al.*, 2007). Es wäre demnach möglich, dass das nicht gespaltene NPTH-Motiv auch nach der Synthese und Faltung des Proteins als Interaktionsstelle zur Verfügung steht. Der Substratwechsel, d. h. der Sekretionswechsel von „frühen“ zu „späten“ Substraten, erfordert hingegen vermutlich eine Konformationsänderung in Vertretern der YscU/FlhB-Proteinfamilie (Ferris & Minamino, 2006, Büttner, 2012), welche möglicherweise nach der vollständigen Assemblierung des „inner rod“ induziert wird (siehe Kapitel 1.7.3). Obwohl die bisherigen Daten für eine exakte Beschreibung der unabhängigen Mechanismen nicht ausreichen, kann spekuliert werden, dass die effiziente Sekretion von „frühen“ Substraten, wie z. B. HrpB2, durch die Interaktion mit dem nicht gespaltenen NPTH-Motiv der YscU/FlhB-Proteinfamilie ermöglicht wird, während die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen eventuell eine Konformationsänderung in Vertretern der YscU/FlhB-Proteinfamilie erfordert.

### **3.2.4 Die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung und/oder HpaC supprimieren die Translokation von HrpB2**

In einer früheren Studie wurde beschrieben, dass die effiziente Sekretion des putativen „inner rod“-Proteins HrpB2 durch HrcU und das T3S4-Protein HpaC supprimiert wird (Lorenz *et al.*, 2008b). Um einen Einfluss von HrcU und/oder HpaC auf die Translokation von HrpB2 zu untersuchen, wurde eine translationale Fusion zwischen den N-terminalen 76 Aminosäuren von HrpB2 mit dem Reporterprotein AvrBs3 $\Delta$ 2, welches ein Derivat des Effektorproteins AvrBs3 ist, erstellt. AvrBs3 $\Delta$ 2 enthält zwar die Effektordomäne, aber nicht das Sekretions- und Translokationssignal von AvrBs3, wodurch AvrBs3 $\Delta$ 2 nur in translationaler Fusion mit einem funktionalen Translokationssignal transloziert wird (Szurek *et al.*, 2002, Noël *et al.*, 2003). Infektionsexperimente mit *Xcv*-Stämmen verdeutlichten, dass sowohl ein *hpaC*-Deletionsstamm als auch ein *hrcU*-Deletionsstamm, welcher eines der spaltungsdefizienten HrcU-Derivate HrcU<sub>N264A</sub>, HrcU<sub>P265A</sub> oder HrcU<sub>P265G/Y318D</sub> enthielt, die Translokation von HrpB2<sub>1-76</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 ermöglichte (siehe Kapitel 2.3.1), was darauf hin deutet, dass die Translokation von HrpB2 durch die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung und/oder HpaC supprimiert wird. Da alle getesteten spaltungsdefizienten HrcU-Derivate nicht mehr effizient mit HpaC interagierten,

könnte die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung möglicherweise für die Interaktion von HrcU<sub>C</sub> mit HpaC benötigt werden. Bindeexperimente zwischen dem T3S4-Protein FliK und dem HrcU-homologen Protein FlhB aus *Salmonella* spp. deuten darauf hin, dass nach der Interaktion von FliK mit FlhB eine Konformationsänderung in FlhB induziert wird (Morris *et al.*, 2010). Es wäre somit denkbar, dass durch die HrcU<sub>C</sub>-Spaltung das T3S4-Protein HpaC mit HrcU<sub>C</sub> interagiert und dadurch eine Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> induziert wird, welche die Translokation von HrpB2 supprimiert.

Warum sollte die Translokation von „inner rod“-Komponenten reguliert werden? Für die „inner rod“-Komponenten PrgJ des SPI-1 T3S-Systems aus *Salmonella* spp. und MxiI aus *S. flexneri* konnte gezeigt werden, dass sie das NLRC4-abhängige Inflammasom in eukaryotischen Zellen aktivieren (Miao *et al.*, 2010, Suzuki *et al.*, 2014). Die Suppression der Translokation von „inner rod“-Proteinen würde daher die Erkennung des Bakteriums durch die Wirtszelle erschweren. Neben PrgJ und MxiI induzierten die putativen „inner rod“-Proteine BsaK aus *Burkholderia pseudomallei*, EscI aus EPEC und PscI aus *P. aeruginosa* ebenfalls das NLRC4-abhängige Inflammasom (Miao *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu PrgJ konnte jedoch das „inner rod“-Protein SsaI des SPI-2 T3S-Systems aus *Salmonella* spp. das NLRC4-abhängige Inflammasom nicht aktivieren (Miao *et al.*, 2010). Im Vergleich zu PrgJ enthält SsaI in der C-terminalen Region eine Substitution von einem über verschiedene „inner rod“-Proteine konservierten Valinrestes zu einem Leucinrest (Miao *et al.*, 2010). Die Erkennung von konservierten Aminosäuren bzw. Proteinstrukturen in T3S-Komponenten ist sinnvoll, da die Wirtszelle somit auf unterschiedliche pathogene Bakterien durch die Aktivierung eines Signalweges der Immunantwort reagieren kann.

### **3.3 HrpB1 ist eine putative „inner rod“-Komponente des T3S-Systems**

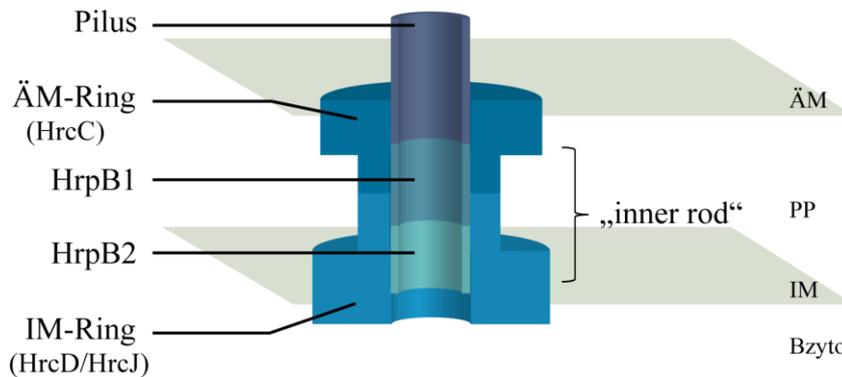
#### **3.3.1 HrpB1 ist ein periplasmatisches Protein**

Um die subzelluläre Lokalisation von HrpB1 zu bestimmen, wurden Subfraktionierungsstudien durchgeführt. Bei diesen Studien wurde HrpB1 ausschließlich in der angereicherten periplasmatischen Fraktion nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.1), was darauf hin deutet, dass HrpB1 ein periplasmatisches Protein ist. Die Detektion von HrpB1 in der angereicherten periplasmatischen Fraktion ist in guter Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die beschreiben, dass HrpB1 nicht sekretiert wird (Rossier *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu HrpB1, konnte das putative „inner rod“-Protein HrpB2 sowohl in der angereicherten periplasmatischen Fraktion als auch in der angereicherten ÄM-Fraktion detektiert werden. Möglicherweise ist die Interaktion von HrpB1 mit T3S-Komponenten der

ÄM und mit T3S-Komponenten, welche selbst mit Komponenten in der ÄM interagieren, schwächer, als die Interaktion von HrpB2 zu diesen T3S-Komponenten. Es ist weiterhin denkbar, dass HrpB2 in dem verwendeten Puffersystem nicht stabil ist und während der für die Subfraktionierung notwendigen Zentrifugationen präzipitiert. HrpB1 weist mit HrpK aus *Ralstonia solanacearum* eine Aminosäureidentität von 36% auf (Fenselau & Bonas, 1995) und ist ein Vertreter der HrpB1/HrpK-Proteinfamilie (Sequenzhomologievergleich, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Über die Funktion von Mitgliedern dieser Familie ist nicht viel bekannt. Studien mit HrpK aus *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 zeigten, dass HrpK in das extrazelluläre Milieu sekretiert und geringe Aminosäureidentität mit dem Translokonprotein HrpF aus *Xcv* aufweist, wodurch angenommen wurde, dass HrpK ein putatives Translokonprotein ist (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005). Da HrpB1 nicht sekretiert und wahrscheinlich ein periplasmatisches Protein ist, kann vermutet werden, dass HrpB1 seine Proteinfunktion im bakteriellen Periplasma ausübt und nicht die Funktion eines Translokonproteins übernimmt.

### **3.3.2 Der „inner rod“ des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus *Xcv* könnte aus HrpB2 und HrpB1 aufgebaut werden**

Protein-Protein-Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass HrpB1 mit sich selbst, dem Sekretin HrcC, der IM-Komponente HrcD, dem Pilusprotein HrpE und dem putativen „inner rod“-Protein HrpB2 interagiert (siehe Kapitel 2.2.1). Auch für HrpB2 konnte eine Interaktion mit der IM-Komponente HrcD, jedoch nicht mit dem Sekretin HrcC und dem Pilusprotein HrpE nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.2.2 und Abbildung 5). HrcD ist somit ein gemeinsamer Interaktionspartner von HrpB1 und HrpB2. Die Interaktion mit Komponenten des Basalapparates, die Ausbildung von HrpB1-Proteinkomplexen und die Lokalisierung von HrpB1 in das bakterielle Periplasma (siehe Kapitel 2.2.1) lassen vermuten, dass HrpB1 Teil einer Struktur im Inneren des Basalapparates des Translokations-assoziierten T3S-Systems von *Xcv* ist, welche das putative „inner rod“-Protein HrpB2 mit dem Pilus und dem Sekretin verbindet (siehe Abbildung 3.2). Eventuell könnte HrpB1 auch selbst einen Teil des „inner rod“ aufbauen. Der Pilus des T3S-Systems könnte somit dem „inner rod“ aufsitzen und möglicherweise bis in das bakterielle Periplasma ragen. Auch für die Translokations-assoziierten T3S-Systeme aus *S. typhimurium*, *S. flexneri* und EPEC wurden ähnliche Annahmen beschrieben, die davon ausgehen, dass die extrazelluläre Struktur bis in das Periplasma reicht und/oder einer periplasmatischen Struktur aufsitzt (Marlovits *et al.*, 2006, Ogino *et al.*, 2006, Sani *et al.*, 2007).



**Abbildung 3.2: HrpB1 ist möglicherweise ein Teil des „inner rod“ des Translokations-assoziierten T3S-Systems.** Das periplasmatische Protein HrpB1 könnte eine Struktur innerhalb des Translokations-assoziierten T3S-Systems ausbilden, die das putative „inner rod“-Protein HrpB2 mit dem Pilus und dem ÄM-Ring, welcher wahrscheinlich durch das Sekretin HrcC ausgebildet wird, verbindet. Der IM-Ring besteht vermutlich aus den Proteinen HrcJ sowie HrcD, wobei HrcD als gemeinsamer Interaktionspartner von HrpB1 und HrpB2 identifiziert werden konnte. Der Pilus des T3S-Systems könnte dem „inner rod“ aufsitzen und bis in das bakterielle Periplasma ragen. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; PP, Periplasma; Bazyto, bakterielles Zytoplasma.

Die HrpB1-Selbstinteraktion sowie die Ausbildung von Proteinkomplexen sind in Übereinstimmung mit den derzeitigen Modellen, die annehmen, dass „inner rod“-Proteine polymerisieren müssen, um eine Struktur innerhalb des T3S-Systems auszubilden (Cornelis, 2006, Marlovits *et al.*, 2006). Eine Selbstinteraktion sowie eine Interaktion mit dem Sekretin wurde ebenfalls für die putative „inner rod“-Komponente EscI aus EPEC durch die Immunopräzipitation eines V5-Epitop-markierten EscI-Proteins aus EPEC gezeigt (Sal-Man *et al.*, 2012). Interessanterweise konnte durch eine Immunopräzipitation aus dem *E. coli*-Stamm BL21, welcher kein Translokations-assoziiertes T3S-System besitzt, keine Interaktion von EscI mit dem Sekretin EscC nachgewiesen werden, wodurch die Autoren vermuteten, dass die Interaktion zwischen EscI und EscC indirekt über eine weitere T3S-Komponente vermittelt werden könnte (Sal-Man *et al.*, 2012). Möglicherweise könnte somit auch der „inner rod“ des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus EPEC durch mehrere T3S-Komponenten aufgebaut oder über weitere T3S-Komponenten mit dem Basalapparat verbunden werden. Die elektronenmikroskopische Analyse von isolierten Translokations-assoziierten T3S-Systemen aus *Salmonella* spp. weisen jedoch darauf hin, dass der „inner rod“ aus mehreren Kopien einer T3S-Komponente (PrgJ) aufgebaut wird (Marlovits *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Translokations-assoziierten T3S-Systemen aus *Salmonella* spp. besteht der „inner rod“ von Flagellum-assoziierten T3S-Systemen aus vier verschiedenen Komponenten, die einen proximalen (bestehend aus FlgB, FlgC und FlgF) und einen distalen (bestehend aus FlgG) „rod“ aufbauen (Homma *et al.*, 1990). Die Anzahl der unterschiedlichen Proteine, die den „inner rod“ in pflanzenpathogenen Translokations-assoziierten T3S-Systemen aufbauen, ist noch nicht bekannt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von

isolierten Translokations-assoziierten T3S-Systemen aus *hrpB1*-, *hrpB2*- und weiteren *Xcv*-Mutanten könnten Hinweise liefern, welche T3S-Komponenten den „inner rod“ aufbauen oder bei der Assemblierung des „inner rod“ von Bedeutung sind.

### **3.3.3 Das Translokations-assoziierte T3S-System könnte durch HrpB1 im Periplasma verankert werden**

Die Assoziation des putativen „inner rod“-Proteins HrpB1 mit Peptidoglykan (PG) und die Interaktion von HrpB1 mit verschiedenen Komponenten des Basalapparates deutet darauf hin, dass HrpB1 das Translokations-assoziierte T3S-System im Periplasma verankern könnte (siehe Kapitel 2.2.1). Die Analyse der Sekundärstruktur von HrpB1 durch PHYRE<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) lässt vermuten, dass HrpB1 strukturelle Ähnlichkeiten zur U-Domäne der lytischen Transglykosylase Slt70 aus *E. coli* aufweist (siehe Kapitel 2.2.2, Abbildung S2), welche möglicherweise die Bindung von Slt70 zu PG vermittelt, jedoch keine katalytischen Bereiche enthält (van Asselt *et al.*, 1999). Auf Grund der fehlenden strukturellen Ähnlichkeit zu der katalytischen Domäne von Slt70 ist es wahrscheinlich, dass HrpB1 keine PG-spaltende Aktivität besitzt. Für das Pilotin InvH und die IM-Ringkomponenten PrgH und PrgK aus *Salmonella* spp. konnte eine Assoziation mit PG nachgewiesen werden, währenddessen das Sekretin InvG nicht mit PG assoziierte (Pucciarelli & Garcia-del Portillo, 2003). Die effiziente Assoziation von PrgH und PrgK mit PG war dabei von dem „inner rod“-Protein PrgJ und dem Nadelprotein PrgI abhängig (Pucciarelli & Garcia-del Portillo, 2003), was vermuten lässt, dass die IM-Ringkomponenten des T3S-Systems u. a. über „inner rod“-Proteine mit dem PG verbunden sind. Weiterhin konnte für die PG-bindende Komponente ExeA des T2S-Systems aus *Aeromonas hydrophila* gezeigt werden, dass die PG-Bindung von ExeA für die korrekte Assemblierung des T2S-Sekretin essentiell ist (Howard *et al.*, 2006). PG-bindende Proteine können somit auch bei der Assemblierung von Sekretionssystemen eine bedeutende Rolle einnehmen. Für ein besseres Verständnis der Bindung von HrpB1 zu PG ist die Analyse von HrpB1-Kristallen in Anwesenheit und Abwesenheit von PG essentiell und sollte Gegenstand der weiteren Analyse von HrpB1 sein.

### **3.3.4 HrpB1 könnte T3S-abhängig in das bakterielle Periplasma transportiert werden**

Obwohl HrpB1 nicht in das extrazelluläre Milieu sekretiert wird, interagiert es wie HrpB2 mit den zytoplasmatischen C-terminalen Domänen von HrcU und HrcV sowie mit dem T3S4-Protein HpaC (siehe Kapitel 2.2.4.2, Jens Hausner, unveröffentlichte Daten) (Lorenz *et al.*, 2008b, Hartmann & Büttner, 2013). Die Interaktion zwischen HrpB2 und HrcU ist vermutlich

für die effiziente Sekretion von HrpB2 in das extrazelluläre Milieu wichtig und wird eventuell nach der Interaktion von HpaC mit HrpB2 und/oder HrcU inhibiert (Lorenz & Büttner, 2011). Es ist vorstellbar, dass HrpB1, wie HrpB2, für den Transport über die IM die Interaktion mit HrcU<sub>C</sub> benötigt und dass HrpB1 dem gleichen HpaC-abhängigen Kontrollmechanismus unterliegen könnte. Komplementationsstudien mit HrpB1-Derivaten lassen weiterhin vermuten, dass die C-terminalen 20 Aminosäuren für die Proteinfunktion entbehrlich sind, während die N-terminalen 10 Aminosäuren zur Funktion von HrpB1 beitragen. Möglicherweise beinhalten die N-terminalen Aminosäuren ein T3S-Signal, welches für den HrpB1-Transport in das Periplasma wichtig ist. In weiteren Experimenten sollte daher, neben der Identifizierung der Interaktionsregionen in HrcU und HpaC, auch die HrpB1-Sekretion in das Periplasma untersucht werden. Die Lokalisation von HrpB1 in das Periplasma könnte durch die translationale Fusion von HrpB1 mit der alkalischen Phosphatase (PhoA), unter der Verwendung des chromogenen Substrates X-Phos, untersucht werden. Weil die PhoA im Periplasma eine höhere Aktivität als im Zytoplasma aufweist (Manoil & Beckwith, 1986), kann das chromogene Substrat X-Phos schneller umgesetzt werden. Die erhöhte PhoA-Aktivität bzw. der erhöhte Umsatz von X-Phos würde somit auf einen Transport des Fusionsproteins HrpB1-PhoA in das Periplasma hinweisen. Eine translationale Fusion zwischen HrpB1 und der PhoA wird wahrscheinlich, wie die translationale Fusion des c-Myc-Epitops, mit der HrpB1-Funktion interferieren. Dennoch könnte unter Verwendung von HrcU-, HrpB1- oder HpaC-Derivaten die Regulation der periplasmatischen HrpB1-Sekretion näher analysiert werden.

### **3.3.5 Die HrpB1/HrcD-Interaktion sowie die HrpB1-Komplexbildung ist möglicherweise für die HrpB1-Proteinfunktion von Bedeutung**

Um Bereiche in HrpB1 zu identifizieren, die für die Proteinfunktion von Bedeutung sind, wurden HrpB1-Derivate mit Deletionen, Insertionen und Aminosäuresubstitutionen analysiert (siehe Kapitel 2.2.1). Die meisten HrpB1-Derivate konnten den Phänotyp einer *hrpB1*-Mutante nicht oder nur noch partiell komplementieren, interagierten aber noch mit HrpB2, HrpE und HrcD, was darauf hin deutet, dass die Proteinfaltung dieser Derivate vermutlich nicht vollständig gestört und die *in vivo*-Interaktion mit noch nicht getesteten oder unbekanntem Interaktionspartnern beeinträchtigt sein könnte. Die Derivate HrpB1<sub>Δ116-128</sub> und HrpB1<sub>L97A</sub> interagierten nicht oder nur noch reduziert mit HrcD und das Derivat HrpB1<sub>L22A</sub> sowie HrpB1<sub>L97A</sub> nur noch reduziert mit HrpB1. Weil die Interaktion der HrpB1-Derivate mit HrpB2 und HrpE nicht beeinträchtigt war und diese Derivate den Phänotyp einer *hrpB1*-Mutante nicht oder partiell komplementierten, ist die Interaktion von HrpB1 mit HrcD und die

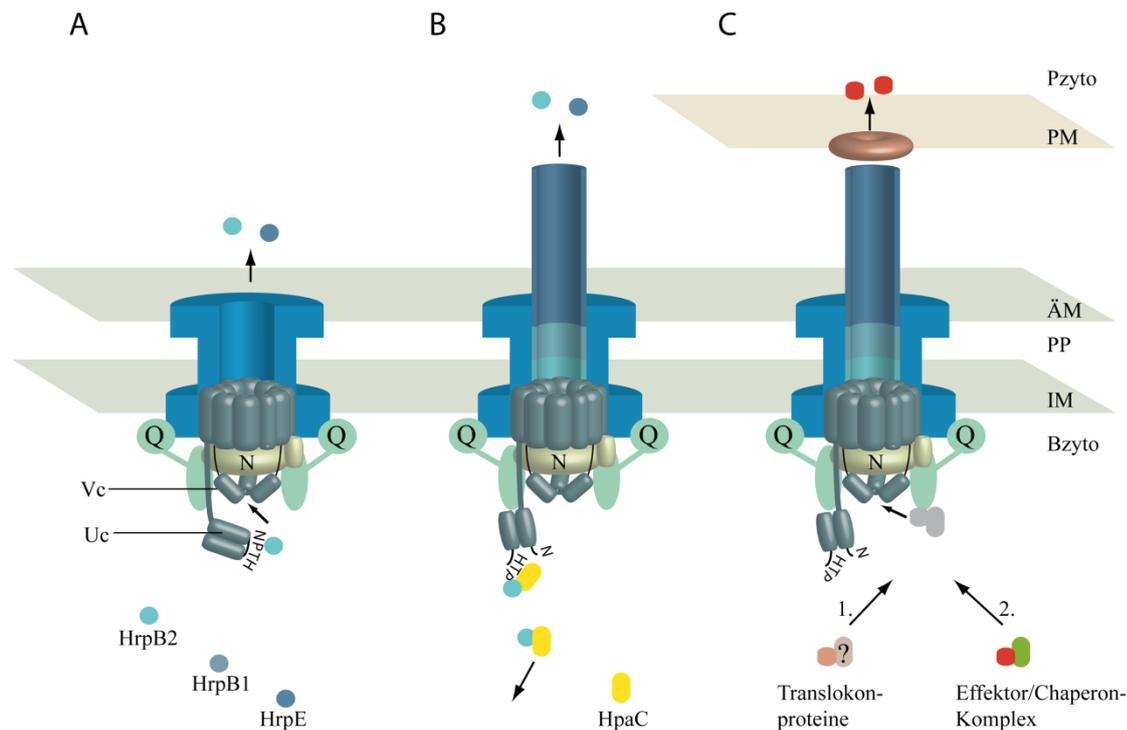
Selbstinteraktion von HrpB1 möglicherweise für die HrpB1-Proteinfunktion von Bedeutung, aber vermutlich nicht essentiell. Obwohl durch die *in trans*-Expression der Gene *hrpBI*<sub>C96A</sub> oder *hrpBI*<sub>L128A</sub>, unter der Kontrolle des nativen *hrpBI*-Promotors, der Phänotyp einer *hrpBI*-Mutante nicht komplementiert werden konnte, führte die *in cis*-Expression zu einer partiellen Komplementation des Phänotyps einer *hrpBI*-Mutante (siehe Kapitel 2.2.4.1), wodurch vermutet werden kann, dass die Aminosäuren C96 und L128 nicht essentiell für die HrpB1-Proteinfunktion sind. Um einen negativen Effekt der *in trans*-Expression zu vermeiden, sollten in den weiterführenden Experimenten die Gene aller untersuchten HrpB1-Derivate in das Genom von *Xcv* integriert werden.

Zu beachten ist, dass die *in vitro*-Interaktionsstudien mit HrpB1-Derivaten durchgeführt wurden, die in *E. coli* und in translationaler Fusion mit einem c-Myc-Epitop synthetisiert wurden. Daher ist es notwendig die ermittelten Interaktionen im Kontext eines assemblierten T3S-Systems zu bestätigen. Eine etablierte Methode zum Nachweis von *in vivo*-Interaktionen in *Xcv* ist die Co-Immunopräzipitation, durch die das zu untersuchende Protein mit seinem Interaktionspartner über einen spezifischen Antikörper aus einem *Xcv*-Proteinextrakt konzentriert werden kann. Bei dieser Methode kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die ermittelte Interaktion indirekt über weitere Proteine vermittelt wird. Die Untersuchung von Interaktionen in Anwesenheit eines assemblierten T3S-Systems, in dem verschiedene Proteine die gleichen Interaktionspartner haben können, ist eine technische Herausforderung, die im Detail noch gelöst werden muss. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung eines UV-abhängigen Aminosäurequervernetzers, wie p-Benzoyl-L-phenylalanin, durch den *in vivo* ortsspezifisch kovalente Quervernetzungen zwischen zwei Proteinen hergestellt werden können (Farrell *et al.*, 2005). Obwohl diese Methode für die *in vivo*-Quervernetzungen von Proteinen in *E. coli*, *S. typhimurium* als auch für *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich verwendet wurde (Farrell *et al.*, 2005, Krishnamurthy *et al.*, 2011, Lancia *et al.*, 2013M, Lefebvre & Galan, 2014), konnte dennoch gezeigt werden, dass die genaue und effiziente Quervernetzung von der Aminosäureposition im untersuchten Protein sowie von der beteiligten Aminosäure im Interaktionspartner abhängig ist (Majmudar *et al.*, 2009, Lancia *et al.*, 2013). Die Verwendung eines Aminosäurequervernetzers zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in *Xcv* erfordert somit vermutlich eine Optimierung der Methode.

### 3.4 Modell des Substratspezifitätswechsels in *Xcv*

Es ist vorstellbar, dass als erste T3S-Substrate das Pilusprotein HrpE und die putative „inner rod“-Komponente HrpB2 durch ein *prae*-assembliertes T3S-System, welches aus dem Basalapparat mit assoziiertem Exportapparat besteht, sekretiert werden. Das putative „inner

rod“-Protein HrpB2 interagiert wahrscheinlich mit dem NPTH-Motiv von HrcU<sub>C</sub> und wird sekretiert (Lorenz & Büttner, 2011). Neben HrpB2 interagiert auch HrpB1 mit HrcU<sub>C</sub>, wodurch HrpB1 vermutlich in das Periplasma transportiert wird (Abbildung 3.3, A). Möglicherweise wird nach dem Aufbau des „inner rod“ durch HrpB1 und HrpB2 eine Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> induziert und durch die Spaltung des NPTH-Motivs die



**Abbildung 3.3: Modell des Substratspezifitätswechsels in *Xcv*.** A) Als erste Substrate werden das Pilusprotein HrpE sowie die angenommenen „inner rod“-Komponenten HrpB1 und HrpB2 durch ein *prae*-assembliertes T3S-System, welches aus dem Basalapparat mit assoziiertem Exportapparat besteht, sekretiert. Die C-terminale Domäne der IM-Komponente HrcV (V<sub>C</sub>) bildet wahrscheinlich eine Barriere auf der zytoplasmatischen Seite der IM, in der Nähe der T3S-Eintrittspore. Das putative „inner rod“-Protein HrpB2 interagiert mit dem NPTH-Motiv und wird sekretiert (Lorenz & Büttner, 2011). Neben HrpB2 interagiert auch HrpB1 mit HrcU<sub>C</sub> und wird vermutlich in das bakterielle Periplasma transportiert. B) Nach der Fertigstellung des „inner rod“ durch HrpB1 und HrpB2, wird in HrcU<sub>C</sub> (Uc) eventuell eine Konformationsänderung induziert, wodurch eine mögliche Blockade der T3S-Eintrittspore durch HrcU<sub>C</sub> aufgelöst werden könnte. Durch die Spaltung des NPTH-Motivs kann HpaC möglicherweise mit HrcU<sub>C</sub> interagieren, weshalb die effiziente Sekretion sowie Translokation von HrpB2 inhibiert wird. Auch die Interaktion zwischen HpaC und HrpB2 könnte zur Inhibierung der HrpB2-Sekretion beitragen. C) Eventuell dient HrcQ als Sortierungsplattform für T3S-Substrate, die erst mit Translokonproteinen und anschließend mit Effektorproteinen „beladen“ wird. Während die Rekrutierung von Effektorproteinen vermutlich über das T3S-Chaperon HpaB vermittelt wird, erfolgt die Rekrutierung der Translokonproteine wahrscheinlich über eine andere T3S-Komponente, weil bisher keine Interaktion von HpaB mit Translokonproteinen nachgewiesen werden konnte. Das Fragezeichen weist darauf hin, dass eine andere T3S-Komponente als HpaB an der Rekrutierung von Translokonproteinen beteiligt sein könnte, Zahlen auf die geordnete Rekrutierung von Translokon- und Effektorproteinen. N, T3S-assoziierte ATPase HrcN mit ihrem Regulator; Pzyto, pflanzliches Zytoplasma; PM, Plasmamembran der Wirtszelle; ÄM, äußere bakterielle Membran, PP, Periplasma; IM, innere bakterielle Membran; Bztyo, bakterielles Zytoplasma.

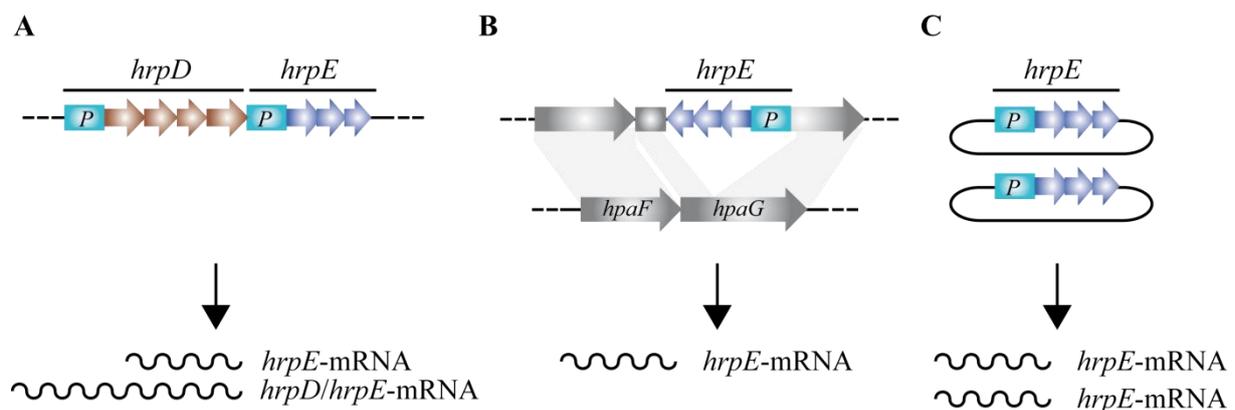
Interaktion von HpaC mit HrcU<sub>C</sub> erlaubt. Die Interaktion zwischen HpaC und HrcU<sub>C</sub> könnte zu einer Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> führen, wodurch die effiziente Sekretion sowie Translokation von HrpB2 inhibiert wird (siehe Abbildung 3.3, B). Weiterhin ist es möglich, dass auch die Interaktion von HpaC mit HrpB2 zur Inhibierung der HrpB2-Sekretion beiträgt. Die „inner rod“-induzierte Konformationsänderung in HrcU<sub>C</sub> könnte eine mögliche Blockade der T3S-Eintrittspore auflösen und/oder die Rekrutierung weiterer T3S-Komponenten an das T3S-System zulassen, wodurch die Sekretion von Translokatoren und Effektoren erlaubt wird. Möglicherweise könnte HrcQ ähnlich zu SpaO aus *S. typhimurium*, als Sortierungsplattform für T3S-Substrate fungieren, welche durch das T3S-Chaperon HpaB oder andere T3S-Komponenten mit Translokatoren und Effektoren „beladen“ wird (siehe Abbildung 3.3, C). Im Fokus zukünftiger Studien sollte vor allem die Bedeutung von HrcQ auf eine geordnete Rekrutierung von T3S-Substraten sowie der Einfluss der HrcU<sub>C</sub>-Spaltung auf die Rekrutierung von T3S-Komponenten wie HpaC näher untersucht werden. Desweiteren sollte der HrpB1-Transport in das bakterielle Periplasma analysiert und T3S-Komponenten identifiziert werden, die an der Kontrolle des HrpB1-Transportes beteiligt sind.

### **3.5 Die Klonierung des *hrp*-Genclusters als modulares System**

#### **3.5.1 Die einzelnen *hrp*-Operons können als funktionelle Einheit agieren**

Um die Charakterisierung von T3S-Komponenten und der Regulationsmechanismen des Translokations-assoziierten T3S-Systems zu erleichtern, wurde ein System entwickelt, wodurch das *hrp*-Gencluster schrittweise aus Modulen assembliert und anschließend kloniert werden kann (siehe Kapitel 2.4). Die Verwendung dieses modularen Systems erlaubt es effizient multiple Mutationen in die Nukleotidsequenz des *hrp*-Genclusters einzubringen. Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt, ob der genomische Gesamtkontext der einzelnen Operons für die Expression der *hrp*-Gene und für die effiziente Funktion des T3S-Systems bedeutend ist. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Operons auf ihre Fähigkeit getestet, als unabhängige transkriptionelle Einheit zu agieren (siehe Kapitel 2.4.4). Durch die *in cis*-Expression, nicht jedoch die *in trans*-Expression des *hrpC*- oder des *hrpD*-Operons konnte der Phänotyp der jeweiligen Mutante vollständig komplementiert werden, wodurch vermutet werden kann, dass die Kopienzahl des Plasmids und die damit einhergehend erhöhte Transkriptmenge des Operons, einen negativen Effekt hat. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Expression des *hrcQ*- oder *hrpB1*-Gens beschrieben (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.2.1). Die partielle Komplementation einer *hrpE*- oder *hpaB*-Operonmutante durch die *in cis*-Expression des jeweiligen Operons könnte darauf hinweisen, dass nicht der vollständige Promotor des

Operons kloniert wurde, obwohl die vorhergesagten PIP-Boxen in den klonierten Promotoren enthalten sind (siehe Kapitel 2.4.3). Es ist weiterhin denkbar, dass die einzelnen Operons keine funktionalen Terminatoren enthalten, wodurch die Expression eines Operons nicht nur von dem eigenen, sondern auch von dem Promotor des davor liegenden Operons abhängig ist (siehe Abbildung 3.4). Durch die Integration der einzelnen Operons in die *hpaF/hpaG*-Region in das *Xcv*-Genom, könnte somit die Transkriptmenge des *hrpE*- oder *hpaB*-Operons verringert sein, weshalb eine vollständige Komplementation der jeweiligen Operonmutante nicht möglich ist. Die angenommene verringerte Transkriptmenge, welche eventuell durch die „fehlende“ Expression des Promotors des davor liegenden Operons oder durch einen nicht vollständig klonierten Promotor entsteht, kann wahrscheinlich durch die Kopienzahl des Vektors kompensiert werden (siehe Abbildung 3.4). In der Tat konnte bereits für das *hrpA*-Operon gezeigt werden, dass eine vorhergesagte Transkriptionsterminationssequenz keinen Einfluss auf die Transkriptionstermination hat (Wengelnik *et al.*, 1996a). Anzumerken ist jedoch, dass bisher kein überlappendes Transkript zwischen den *hrpD*- und *hrpE*- bzw. *hrpE*- und *hpaB*-Operonen nachgewiesen werden konnte (Weber *et al.*, 2007). In weiteren Experimenten sollte daher überprüft werden, ob eine *hrpD/hrpE*- bzw. *hrpE/hpaB*-Doppelmutante durch die jeweiligen Operons (*hrpD/hrpE* bzw. *hrpE/hpaB*) *in cis* komplementiert werden kann oder die Klonierung einer längeren Promotorsequenz für eine vollständige Komplementation der jeweiligen Operonmutante hinreichend ist.



**Abbildung 3.4: Die Expression eines Operons könnte von verschiedenen Promotoren abhängig sein.** **A)** Möglicherweise besitzen die einzelnen Operons keine funktionalen Terminatoren, wodurch die Expression eines Operons nicht nur von dem eigenen, sondern auch von dem Promotor (P) des davor liegenden Operons abhängig sein könnte, wie hier für das *hrpE*-Operon dargestellt. **B)** Durch die Integration des *hrpE*-Operons in die *hpaF/hpaG*-Region in das *Xcv*-Genom, könnte die Transkriptmenge des *hrpE*-Operons verringert sein, weshalb eine *hrpE*-Operonmutante partiell komplementiert werden kann. **C)** Die verringerte Transkriptmenge kann wahrscheinlich durch die Kopienzahl des Vektors kompensiert werden.

Durch die *in cis*-Expression des *hrpB*- oder *hrpF*-Operons konnte der Phänotyp der jeweiligen Operonmutante nur partiell komplementiert werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von *hrpF* unter dem *lacUV5*-Promotor den Phänotyp einer *hrpF*-Mutante komplementieren kann (Büttner *et al.*, 2002). Es kann somit auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass nur ein Teil des vollständigen Promotors kloniert wurde. Für alle in das Genom inserierten Operons ist zu beachten, dass die Transkriptionsrichtung der inserierten Operons entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung des *hpaF*- und *hpaG*-Gens erfolgte (siehe Kapitel 2.1.2, Abbildung S3). Da der Promotor des *hpaF*-Gens eine vorhergesagte PIP-Box enthält (Noël *et al.*, 2002), ist es möglich, dass unter *hrp*-Gen induzierenden Bedingungen ein entgegengesetztes Transkript („antisense“-Transkript) zu dem Transkript des integrierten Operons entsteht. Das „antisense“-Transkript könnte eine Regulation des eigentlichen Transkriptes hervorrufen, wie es auch für „antisense“-Transkripte aus *E. coli* angenommen wird (Dornenburg *et al.*, 2010). Ein Einfluss der verwendeten *hpaF/hpaG*-Insertionsstelle auf die Transkription der Operons kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass die einzelnen *hrp*-Operons als unabhängige transkriptionelle Einheit agieren können. Weil die *in cis*- oder *in trans*-Expression der einzelnen Operons mit der Virulenz von *Xcv* interferiert, müssen die Ergebnisse der experimentellen Daten in die Assemblierung der Operons bzw. in die Erstellung des Zielkonstruktes einbezogen werden (siehe Kapitel 3.5.3).

### **3.5.2 Die Verwendung von T3S-Systemen als Transportsystem für rekombinante Proteine**

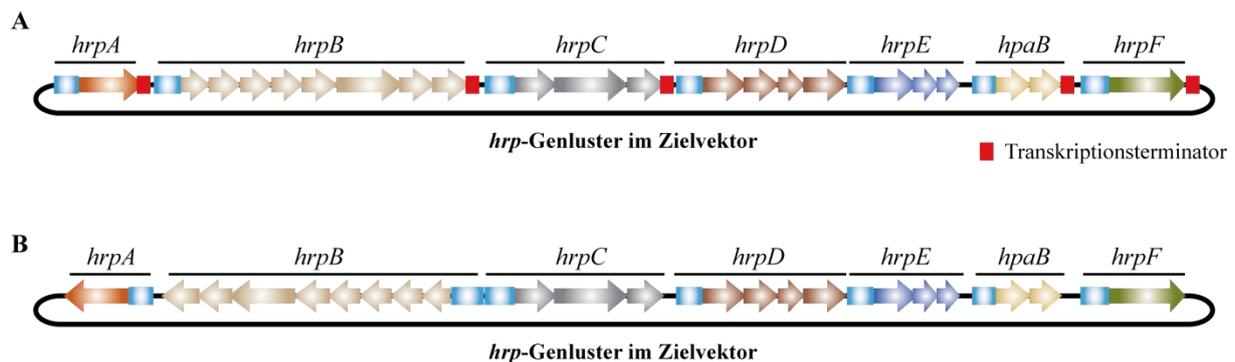
Neben der Funktion als Pathogenitätsfaktoren wurden T3S-Systeme als Transportsystem für die Sekretion oder Translokation von rekombinanten Proteinen in translationaler Fusion mit einem T3S-Signal verwendet. Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen ist es oft sinnvoll die Proteine in das extrazelluläre Milieu zu sekretieren, weil dies u. a. die Ausbildung von „inclusion bodies“ reduziert, die Faltung des Proteins unterstützt und die Ausbildung von Disulfidbindungen ermöglichen kann (Mergulhao *et al.*, 2005, Ni & Chen, 2009, Reed & Chen, 2013). Deshalb wurden auch T3S-Systeme u. a. zur Sekretion von Spinnenfadenmonomeren, des anti-viralen Peptides Enfuvirtide oder von IVY, ein Inhibitor des tierischen Lysozyms, verwendet (Derouazi *et al.*, 2008, Widmaier *et al.*, 2009, Berger *et al.*, 2011). Das T3S-System von *Salmonella* spp. diente weiterhin zur Translokation von Antigenen des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* durch attenuierte *Salmonella* spp.-Stämme in Mäusen, wodurch eine Immunisierung der Mäuse gegen *M. tuberculosis* erreicht wurde (Juarez-Rodriguez *et al.*, 2012). Durch die Translokation von rekombinanten Proteinen

können T3S-Systeme somit auch bei der Vakzination angewendet werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet von T3S-Systemen ist die Translokation von DNA-modifizierenden Proteinen wie TALEN („Transcription Activator-Like Effector Nucleases“) in eukaryotische Zellen (Jia *et al.*, 2014). Durch die bakterielle Übertragung von TALEN kann das Genom der Zielzelle verändert werden, ohne dass fremde DNA in die Zielzelle übertragen wird. Weil die Übertragung von fremder DNA oft in genetisch veränderten Organismen resultiert, ist die Übertragung von Proteinen für biotechnologische Anwendungen sinnvoll. Für bestimmte Anwendungen ist es jedoch notwendig T3S-Systeme in nicht-pathogenen Bakterien zu verwenden. So konnte durch die Verwendung eines nicht-pathogenen *P. fluorescens*-Stammes, der das T3S-System des Stammes *P. syringae* pv. *syringae* 61 enthält, ein Effektorprotein aus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* identifiziert werden, welches in Weizen eine HR auslöste (Upadhyaya *et al.*, 2014). Die Identifizierung von Effektorproteinen, die in Pflanzen erkannt werden, könnte dabei helfen neue Resistenzgene oder Resistenzproteine zu identifizieren. Studien des T3S-Systems aus *Salmonella* spp. zeigten, dass der Transfer der SPI-2-Gene in *E. coli* zur Sekretion des Effektorproteins SseB führte, was vermuten lässt, dass alle T3S-Komponenten synthetisiert waren, während keine Proteinsynthese von Komponenten des SPI-1 T3S-Systems aus *Salmonella* spp. in *E. coli* und keine SPI-1-Genexpression in *Agrobacterium tumefaciens* nachgewiesen werden konnte (Wilson & Nickerson, 2006, Wilson *et al.*, 2007). Weiterhin war der Stamm *P. fluorescens*, welcher das T3S-System des Stammes *P. syringae* pv. *syringae* 61 enthält, in der Lage Effektorproteine in Tabakpflanzen, aber nicht in Reis- und Flachspflanzen zu übertragen (Thomas *et al.*, 2009), wodurch angenommen werden kann, dass die Translokation von Effektorproteinen auch von dem Zielorganismus abhängig ist. Die Verwendung von T3S-Systemen für biotechnologische Anwendungen erfordert somit vermutlich die Modifikationen des T3S-Systems bzgl. der effizienten Translokation von Proteinen, Expression der T3S-Gene und/oder der Synthese von T3S-Komponenten.

### **3.5.3 Mögliche Anpassungen des modularen T3S-Systems - die Verwendung des T3S-Systems als Transportsystem für rekombinante Proteine**

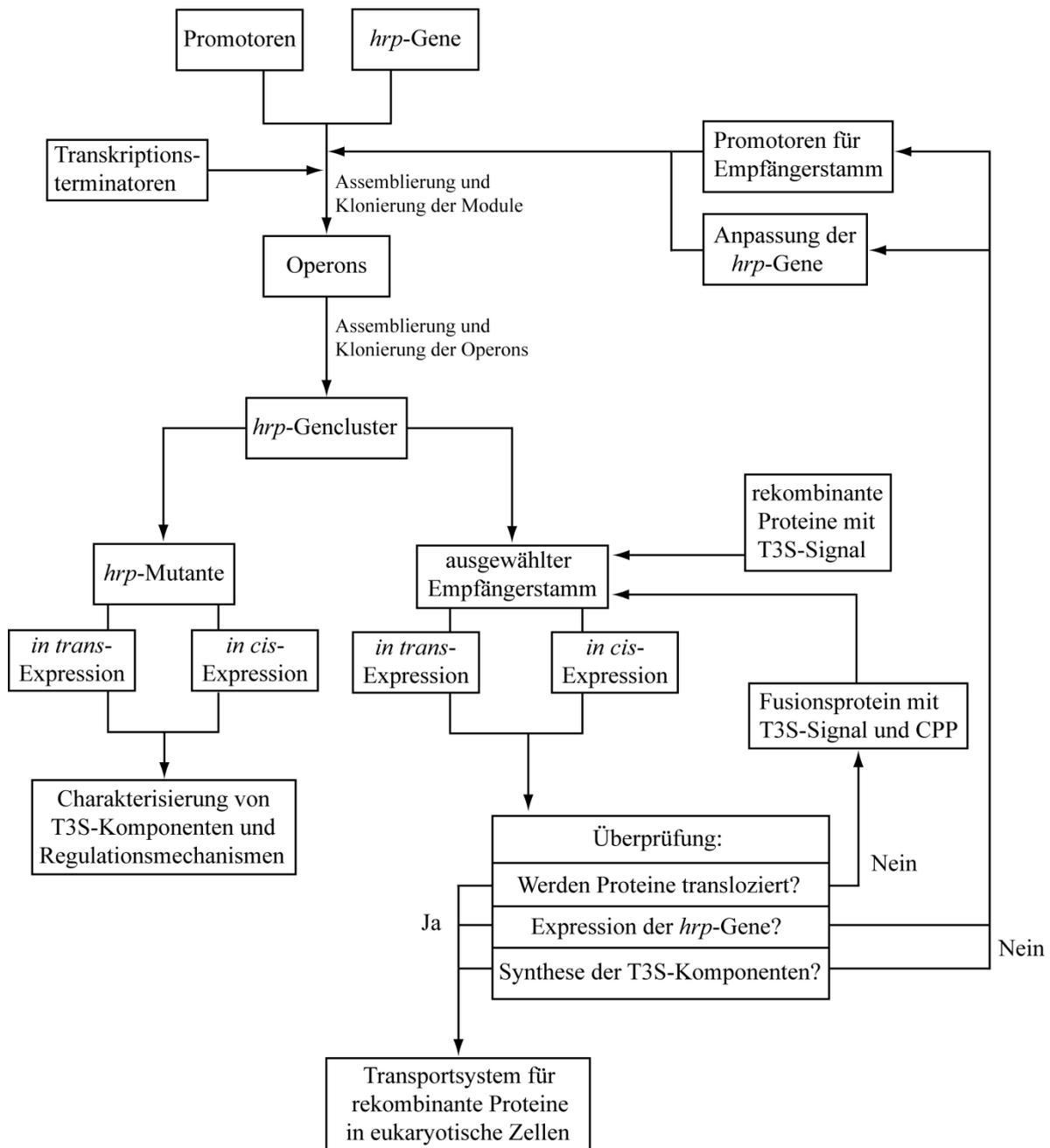
Die Komplementationsstudien lassen vermuten, dass die *in trans*-Expression des *hrp*-Genclusters zu einem funktionalen T3S-System führt (siehe Kapitel 2.4.1). Eine Integration der assemblierten Operons in das Genom von *Xcv* scheint folglich nicht essentiell zu sein. Die Verwendung von Plasmiden hat den Nachteil, dass diese ohne die Zugabe von Antibiotika während der bakteriellen Teilung nicht stabil weitergegeben werden. Aus diesem Grund sollte in Betracht gezogen werden, dass assemblierte und eventuell mutierte *hrp*-Gencluster in den

natürlichen genetischen Kontext in das Genom einer *hrp*-Mutante zu integrieren (siehe Abbildung 3.6). Bei der gerichteten Assemblierung der Operons in einer Transkriptionsrichtung sollten alle Operons einen Transkriptionsterminator enthalten, damit kein gemeinsames Transkript zwischen den Operonen entsteht (siehe Abbildung 3.5, A). Ohne Transkriptionsterminatoren könnten die erhöhten Transkriptmengen des *hrpB*- oder des *hrpC*-Operons mit der Virulenz von *Xcv* interferieren, wie für die *in trans*-Expression dieser Operons gezeigt werden konnte. Durch die Verwendung des modularen Systems können die Transkriptionsterminatoren als separates Modul in die Assemblierung eingesetzt werden, wodurch eine effiziente Klonierung des *hrp*-Genclusters gewährleistet ist. Wird das klonierte *hrp*-Gencluster in *Xcv* transferiert, könnten die Operons alternativ wie im nativen *hrp*-Gencluster orientiert werden (siehe Abbildung 3.5, B). Bestätigen weiterführende Experimente, dass die Expression des *hrpE*- und *hpaB*-Operons nicht nur von dem eigenen, sondern auch von dem Promotor des davor liegenden Operons abhängig ist, dann sollte das *hrpD*- und *hrpE*-Operon keinen Transkriptionsterminator enthalten.



**Abbildung 3.5: Die Operons sollten einen Transkriptionsterminator enthalten.** A) Bei der Assemblierung der Module zu den jeweiligen Operons sollte zusätzlich ein Transkriptionsterminator kloniert werden, damit kein gemeinsames Transkript zwischen den Operonen entsteht. Ist die Expression des *hrpE*- und *hpaB*-Operons nicht nur von dem eigenen, sondern auch von dem Promotor des davor liegenden Operons abhängig, dann sollte das *hrpD*- und *hrpE*-Operon kein Transkriptionsterminator enthalten. B) Für die Verwendung des klonierten *hrp*-Genclusters in *Xcv* könnten alternativ die Operons auch in der nativen Transkriptionsrichtung des *hrp*-Genclusters orientiert werden. Pfeile weisen auf Gene und hellblaue Boxen auf Promotoren hin.

Die Verwendung von T3S-Systemen für biotechnologische Anwendungen, wie z. B. für die Sekretion oder Translokation von rekombinanten Proteinen in verschiedenen Bakterien, verlangt die Anpassung des T3S-Systems bzgl. der Expression der T3S-Gene und/oder der im Bakterium verwendeten „codon usage“ (siehe Kapitel 3.5.2). Werden die *hrp*-Gene des modular klonierten *hrp*-Genclusters in einem Bakterium der Wahl (Empfängerstamm) nicht exprimiert, können die *Xcv*-Promotormodule mit einem für den Empfängerstamm beliebigen Promotor ausgetauscht werden (siehe Abbildung 3.6). Es ist weiterhin denkbar, dass die



**Abbildung 3.6: Mögliche Anpassungen des „modularen“ T3S-Systems.** Durch die Verwendung des modularen Systems können Transkriptionsterminatoren als separates Modul in die Assemblierung eingesetzt werden. Nach der Assemblierung der Operons und der Klonierung des *hrp*-Genclusters kann das *hrp*-Gencluster in einer *hrp*-Mutante oder in einen anderen Bakterienstamm (Empfängerstamm) transferiert werden. Durch die Integration des klonierten *hrp*-Genclusters in das Genom einer *hrp*-Mutante (*in cis*) oder durch die *in trans*-Expression des *hrp*-Genclusters können T3S-Komponenten sowie die Regulationsmechanismen des T3S-Systems analysiert werden. Für die effiziente Expression der *hrp*-Gene in einem ausgewählten Empfängerstamm können die *Xcv*-Promotormodule mit einem für den Empfängerstamm beliebigen Promotor ausgetauscht werden. Um die effiziente Synthese der T3S-Komponenten zu gewährleisten kann die Nukleotidsequenz der *hrp*-Gene auf die „codon usage“ des Empfängerstammes angepasst werden. Damit rekombinante Proteine über das T3S-System sekretiert werden können, muss eine translationale Fusion zwischen der Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins mit einem T3S-Signal erstellt werden. Kann das *Xcv*-Translokon nicht für die Translokation von Proteinen in ausgewählte pflanzliche und/oder tierische Zellen verwendet werden, könnten zellpenetrierende Proteine (CPP) für die Translokation von Proteinen genutzt werden.

klonierten *Xcv*-Promotoren verwendet werden, wenn *hrpX* unter der Kontrolle eines für den Empfängerstamm spezifischen Promotors, in den Zielvektor als zusätzliches Modul kloniert wird. HrpX ist ein AraC-Transkriptionsfaktor, welcher an die PIP-Box in den *Xcv*-Promotoren bindet und so zur Expression der T3S-Gene führt (Wengelnik & Bonas, 1996, Koebnik *et al.*, 2006). Es ist jedoch zu beachten, dass der Promotor des *hrpA*-Operons keine PIP-Box besitzt und somit durch einen HrpX spezifischen Promotor ersetzt wird. Da *Xcv* einen G/C-Gehalt von circa 65% besitzt (Thieme *et al.*, 2005), ist es möglich, dass die Synthese der T3S-Komponenten in anderen Bakterien, durch die Verwendung einer unterschiedlichen „codon usage“ nicht effizient ist. Durch die Anpassung der Nukleotidsequenz der *hrp*-Gene z. B. durch eine Gen-Synthese, kann eine effiziente Translation der *hrp*-Gene in verschiedenen Gram-negativen Bakterien gewährleistet werden. Die T3S und Translokation von Proteinen über das T3S-System erfordert eine N-terminale Signalsequenz, welche ein T3S-Signal und oft eine Bindestelle für T3S-Chaperone enthält (Arnold *et al.*, 2010). Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die T3S von rekombinanten Proteinen oder Reporterproteinen durch die translationale Fusion eines T3S-Signals ermöglicht (Schechter *et al.*, 2004, Sohn *et al.*, 2007, Widmaier *et al.*, 2009), während die effiziente Translokation von rekombinanten Proteinen oft von einem T3S-Chaperon abhängig ist (Widmaier *et al.*, 2009, Akeda *et al.*, 2012, Carleton *et al.*, 2013). Das „modulare“ System beinhaltet das Gen des T3S-Chaperons HpaB, welches für die Sekretion und Translokation von *Xcv*-Effektoren notwendig ist und sollte somit die effiziente Sekretion und Translokation von rekombinanten Proteinen in Fusion mit einem T3S-Signal erlauben. Um einen störenden Einfluss des T3S-Signals auf die Funktionalität des translozierten Proteins zu vermeiden, sollte eine Erkennungssequenz für eine Protease zwischen dem T3S-Signal und der Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins eingebracht werden, wodurch das T3S-Signal nach der T3S durch eine spezifische Protease abgespalten werden kann (Widmaier *et al.*, 2009). Vermutlich ist die Translokation von Proteinen aber auch von der Wirtszelle abhängig (siehe Kapitel 3.5.2). Soll das „modulare“ T3S-System als Transportsystem verwendet werden, muss sichergestellt werden, dass Effektoren in Nicht-Wirtspflanzen und in tierische Zellen transloziert werden. Durch Infektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass *Xcv* T3S-System-abhängig pflanzliche Reaktionen auf Nicht-Wirtspflanzen auslöst (siehe Kapitel 2.4.1), wodurch vermutet werden kann, dass *Xcv* Effektoren über das Translokon in unterschiedliche Pflanzen transloziert. Die Translokation von Effektoren durch *Xcv* in tierische Zellen wurde noch nicht untersucht. Sollte das *Xcv*-Translokon den Transport von Proteinen über tierische Membranen nicht erlauben, könnten zellpenetrierende Proteine („cell-penetrating peptides“, CPPs) für die Translokation von Proteinen in das Zytoplasma der Wirtszelle genutzt werden. CPPs sind kleine Proteine mit einer Länge von 5 bis 40

Aminosäuren und können Membranen Rezeptor-unabhängig durchqueren (Bechara & Sagan, 2013). Verschiedene Studien zeigten, dass CPPs für die Übertragung von verschiedenen Molekülen in pflanzliche und tierische Zellen verwendet werden können (Gratton *et al.*, 2003, Olson *et al.*, 2009, Lakshmanan *et al.*, 2013, Asai *et al.*, 2014). Das generierte modulare System ermöglicht die effiziente Anpassung des Translokations-assoziierten T3S-Systems, sodass das „modulare“ T3S-System nicht nur für die Charakterisierung von T3S-Komponenten, sondern vermutlich auch als Transportsystem für rekombinante Proteine in pflanzliche und tierische Zellen verwendet werden kann. Aus diesem Grund könnte das „modulare“ T3S-System für biotechnologische Anwendungen interessant sein.

#### 4. Literaturverzeichnis

- Abrusci, P., M.A. McDowell, S.M. Lea & S. Johnson, (2014) Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS. *Current opinion in structural biology* **25C**: 111-117.
- Abrusci, P., M. Vergara-Irigaray, S. Johnson, M.D. Beeby, D.R. Hendrixson, P. Roversi, M.E. Friede, J.E. Deane, G.J. Jensen, C.M. Tang & S.M. Lea, (2013) Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nature structural & molecular biology* **20**: 99-104.
- Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L.J. Mota & G.R. Cornelis, (2005) Characterization of a type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Molecular microbiology* **56**: 54-67.
- Akeda, Y. & J.E. Galan, (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Akeda, Y., T. Kimura, A. Yamasaki, T. Kodama, T. Iida, T. Honda & K. Oishi, (2012) Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in *Escherichia coli* K-12 strain as a molecular syringe. *Biochemical and biophysical research communications* **427**: 242-247.
- Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter & G.R. Cornelis, (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *Journal of bacteriology* **176**: 4534-4542.
- Anderson, D.M. & O. Schneewind, (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**: 1140-1143.
- Anderson, D.M. & O. Schneewind, (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular microbiology* **31**: 1139-1148.
- Andre, I., P. Bradley, C. Wang & D. Baker, (2007) Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17656-17661.
- Arnold, R., S. Brandmaier, F. Kleine, P. Tischler, E. Heinz, S. Behrens, A. Niinikoski, H.W. Mewes, M. Horn & T. Rattei, (2009) Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS pathogens* **5**: e1000376.
- Arnold, R., A. Jehl & T. Rattei, (2010) Targeting effectors: the molecular recognition of type III secreted proteins. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **12**: 346-358.
- Asai, T., T. Tsuzuku, S. Takahashi, A. Okamoto, T. Dewa, M. Nango, K. Hyodo, H. Ishihara, H. Kikuchi & N. Oku, (2014) Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Biochemical and biophysical research communications* **444**: 599-604.
- Baison-Olmo, F., E. Cardenal-Munoz & F. Ramos-Morales, (2012) PipB2 is a substrate of the *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system. *Biochemical and biophysical research communications* **423**: 240-246.
- Bange, G., N. Kummerer, C. Engel, G. Bozkurt, K. Wild & I. Sinning, (2010) FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11295-11300.
- Barison, N., R. Gupta & M. Kolbe, (2013) A sophisticated multi-step secretion mechanism: how the type 3 secretion system is regulated. *Cellular microbiology* **15**: 1809-1817.
- Bechara, C. & S. Sagan, (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* **587**: 1693-1702.

- Berger, C., G.P. Robin, U. Bonas & R. Koebnik, (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiol* **156**: 1963-1974.
- Berger, E., M.C. Crampton, N.P. Nxumalo & M.E. Louw, (2011) Extracellular secretion of a recombinant therapeutic peptide by *Bacillus halodurans* utilizing a modified flagellin type III secretion system. *Microbial cell factories* **10**: 62.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, W. Deng, L.J. Foster & B.B. Finlay, (2011) Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **193**: 5514-5519.
- Björnftot, A.C., M. Lavander, A. Forsberg & H. Wolf-Watz, (2009) Auto-proteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *Journal of bacteriology* **191**: 4259-4267.
- Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti & A. Allaoui, (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Molecular microbiology* **39**: 652-663.
- Blocker, A.J., J.E. Deane, A.K. Veenendaal, P. Roversi, J.L. Hodgkinson, S. Johnson & S.M. Lea, (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6507-6513.
- Bocsanczy, A.M., R.M. Nissinen, C.S. Oh & S.V. Beer, (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Molecular plant pathology* **9**: 425-434.
- Bogdanove, A., 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 & F. Van Gijsegem, (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular microbiology* **20**: 681-683.
- Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G.V. Minsavage, B.J. Staskawicz & 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 & 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. *Molecular microbiology* **70**: 1515-1528.
- Boyd, A.P., I. Lambermont & G.R. Cornelis, (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *Journal of bacteriology* **182**: 4811-4821.
- Brennan, R.G. & T.M. Link, (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Current opinion in microbiology* **10**: 125-133.
- Brown, I.R., J.W. Mansfield, S. Taira, E. Roine & M. Romantschuk, (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 394-404.
- Brown, P.N., M.A. Mathews, L.A. Joss, C.P. Hill & D.F. Blair, (2005) Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *Journal of bacteriology* **187**: 2890-2902.
- Broz, P., C.A. Mueller, S.A. Muller, A. Philippsen, I. Sorg, A. Engel & G.R. Cornelis, (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Molecular microbiology* **65**: 1311-1320.
- Buchko, G.W., G. Niemann, E.S. Baker, M.E. Belov, R.D. Smith, F. Heffron, J.N. Adkins & 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**: 2448-2458.
- Buell, C.R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I.T. Paulsen, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, R.T. Deboy, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M.J. Beanan, D.H. Haft, W.C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S.E. Van Aken, T.V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W.L. Deng, A.R. Ramos, J.R. Alfano, S. Cartinhour, A.K. Chatterjee, T.P. Delaney, S.G. Lazarowitz, G.B. Martin, D.J. Schneider, X. Tang, C.L. Bender, O. White, C.M. Fraser & A. Collmer, (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10181-10186.
- Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G.R. Cornelis, J. Tommassen & M. Koster, (2004) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology* **186**: 5366-5375.
- Büttner, D., (2012) Protein export according to schedule – architecture, assembly and regulation of type III secretion systems from plant and animal pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 262-310.
- Büttner, D. & U. Bonas, (2002) Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* **21**: 5313-5322.
- Büttner, D. & U. Bonas, (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS microbiology reviews* **34**: 107-133.
- Büttner, D., D. Gürlebeck, L.D. Noel & U. Bonas, (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular microbiology* **54**: 755-768.
- Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber & 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*. *Molecular microbiology* **59**: 513-527.
- Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener & U. Bonas, (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* **184**: 2389-2398.
- Büttner, D., L. Noel, J. Stuttmann & U. Bonas, (2007) Characterization of the non-conserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 1063-1074.
- Bzymek, K.P., B.Y. Hamaoka & P. Ghosh, (2012) Two translation products of *Yersinia* yscQ assemble to form a complex essential to type III secretion. *Biochemistry* **51**: 1669-1677.
- Cardenal-Munoz, E. & F. Ramos-Morales, (2011) Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA. *PLoS one* **6**: e26930.
- Carleton, H.A., M. Lara-Tejero, X. Liu & J.E. Galan, (2013) Engineering the type III secretion system in non-replicating bacterial minicells for antigen delivery. *Nature communications* **4**: 1590.
- Cerkauskas, R., T.A. Kucharek, B.H. Chew & G.L. Hartman, (2004) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Bacterial Spot, Fact sheet AVRDC **04-572**.
- Chen, H.M., Y. Wang, L.H. Su & C.H. Chiu, (2013) Nontyphoid *salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and neonatology* **54**: 147-152.

- Collazo, C.M. & J.E. Galan, (1996) Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infection and immunity* **64**: 3524-3531.
- Cordes, F.S., K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E.H. Egelman, A. Blocker & S.M. Lea, (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G.R., (2006) The type III secretion injectisome. *Nature reviews. Microbiology* **4**: 811-825.
- Cover, T.L. & R.C. Aber, (1989) *Yersinia enterocolitica*. *The New England journal of medicine* **321**: 16-24.
- Crago, A.M. & V. Koronakis, (1998) *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Molecular microbiology* **30**: 47-56.
- Creasey, E.A., R.M. Delahay, S.J. Daniell & G. Frankel, (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 2093-2106.
- Cusano, A.M., P. Burlinson, A. Deveau, P. Vion, S. Uroz, G.M. Preston & P. Frey-Klett, (2011) *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology reports* **3**: 203-210.
- Daefler, S. & M. Russel, (1998) The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Molecular microbiology* **28**: 1367-1380.
- Dale, C. & I. Maudlin, (1999) *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International journal of systematic bacteriology* **49 Pt 1**: 267-275.
- Dale, C., S.A. Young, D.T. Haydon & S.C. Welburn, (2001) The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1883-1888.
- Daniell, S.J., R.M. Delahay, R.K. Shaw, E.L. Hartland, M.J. Pallen, F. Booy, F. Ebel, S. Knutton & G. Frankel, (2001) Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infection and immunity* **69**: 4055-4064.
- De Geyter, C., R. Wattiez, P. Sansonetti, P. Falmagne, J.M. Ruyschaert, C. Parsot & V. Cabaux, (2000) Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 5769-5776.
- Deane, J.E., P. Abrusci, S. Johnson & S.M. Lea, (2010) Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1065-1075.
- Deane, J.E., S.C. Graham, E.P. Mitchell, D. Flot, S. Johnson & S.M. Lea, (2008) Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Molecular microbiology* **69**: 267-276.
- Demchick, P. & A.L. Koch, (1996) The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **178**: 768-773.
- Derouazi, M., B. Toussaint, L. Quenee, O. Epaulard, M. Guillaume, R. Marlu & B. Polack, (2008) High-yield production of secreted active proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Applied and environmental microbiology* **74**: 3601-3604.
- Diepold, A. & S. Wagner, (2014) Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS microbiology reviews*: doi: 10.1111/1574-6976.12061.
- Diepold, A., U. Wiesand & G.R. Cornelis, (2011) The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the *Yersinia* type III secretion apparatus occurs independently of

- other structural components and involves the formation of an YscV oligomer. *Molecular microbiology* **82**: 502-514.
- Dong, X., Y.J. Zhang & Z. Zhang, (2013) Using weakly conserved motifs hidden in secretion signals to identify type-III effectors from bacterial pathogen genomes. *PloS one* **8**: e56632.
- Dornenburg, J.E., A.M. Devita, M.J. Palumbo & J.T. Wade, (2010) Widespread antisense transcription in *Escherichia coli*. *mBio* **1**: e00024-00010.
- Edqvist, P.J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz & S.A. Lloyd, (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *Journal of bacteriology* **185**: 2259-2266.
- Engler, C., R. Kandzia & S. Marillonnet, (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one* **3**: e3647.
- Fadoulglou, V.E., A.P. Tampakaki, N.M. Glykos, M.N. Bastaki, J.M. Hadden, S.E. Phillips, N.J. Panopoulos & M. Kokkinidis, (2004) Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 70-75.
- Farrell, I.S., R. Toroney, J.L. Hazen, R.A. Mehl & J.W. Chin, (2005) Photo-cross-linking interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. *Nature methods* **2**: 377-384.
- Faudry, E., G. Vernier, E. Neumann, V. Forge & I. Attree, (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**: 8117-8123.
- Fenselau, S. & 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**: 845-854.
- Ferris, H.U., Y. Furukawa, T. Minamino, M.B. Kroetz, M. Kihara, K. Namba & R.M. Macnab, (2005) FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *The Journal of biological chemistry* **280**: 41236-41242.
- Ferris, H.U. & T. Minamino, (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends in microbiology* **14**: 519-526.
- Flor, H.H., (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* **9**: 275-296.
- Francis, M.R., G.E. Sosinsky, D. Thomas & D.J. DeRosier, (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**: 1261-1270.
- Fraser, G.M., T. Hirano, H.U. Ferris, L.L. Devgan, M. Kihara & R.M. Macnab, (2003) Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Molecular microbiology* **48**: 1043-1057.
- Galan, J.E. & H. Wolf-Watz, (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Galkin, V.E., W.H. Schmied, O. Schraidt, T.C. Marlovits & E.H. Egelman, (2010) The structure of the *Salmonella typhimurium* type III secretion system needle shows divergence from the flagellar system. *Journal of molecular biology* **396**: 1392-1397.
- Gauthier, A. & B.B. Finlay, (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **185**: 6747-6755.
- Ghosh, P., (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.

- Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara & K. Namba, (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Molecular microbiology* **60**: 984-998.
- Goure, J., A. Pastor, E. Faudry, J. Chabert, A. Dessen & I. Attree, (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infection and Immunology* **72**: 4741-4750.
- Gratton, J.P., J. Yu, J.W. Griffith, R.W. Babbitt, R.S. Scotland, R. Hickey, F.J. Giordano & W.C. Sessa, (2003) Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo. *Nature medicine* **9**: 357-362.
- Greenberg, J.T. & N. Yao, (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology* **6**: 201-211.
- Guttman, C., G. Davidov, H. Shaked, S. Kolusheva, R. Bitton, A. Ganguly, J.F. Miller, J.H. Chill & R. Zarivach, (2013) Characterization of the N-terminal domain of BteA: a *Bordetella* type III secreted cytotoxic effector. *PLoS one* **8**: e55650.
- Guttman, D.S., B.A. Vinatzer, S.F. Sarkar, M.V. Ranall, G. Kettler & J.T. Greenberg, (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**: 1722-1726.
- Hartmann, N. & D. Büttner, (2013) The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* is involved in substrate docking during type III secretion. *Molecular plant-microbe interactions* : **MPMI in press**.
- Hartmann, N., S. Schulz, C. Lorenz, S. Fraas, G. Hause & D. Büttner, (2012) Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* **158**: 1334-1349.
- He, S.Y., K. Nomura & T.S. Whittam, (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et biophysica acta* **1694**: 181-206.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa & S. Aizawa, (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **176**: 5439-5449.
- Hodgkinson, J.L., A. Horsley, D. Stabat, M. Simon, S. Johnson, P.C. da Fonseca, E.P. Morris, J.S. Wall, S.M. Lea & A.J. Blocker, (2009) Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nature structural & molecular biology* **16**: 477-485.
- Hölzer, S.U., M.C. Schlumberger, D. Jackel & M. Hensel, (2009) Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunology* **77**: 5458-5470.
- Homma, M., K. Kutsukake, M. Hasebe, T. Iino & R.M. Macnab, (1990) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular biology* **211**: 465-477.
- Howard, S.P., C. Gebhart, G.R. Langen, G. Li & T.G. Strozen, (2006) Interactions between peptidoglycan and the ExeAB complex during assembly of the type II secretin of *Aeromonas hydrophila*. *Molecular microbiology* **59**: 1062-1072.
- Hu, W., J. Yuan, Q.L. Jin, P. Hart & S.Y. He, (2001) Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 234-241.
- Hueck, C.J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Huguet, E. & U. Bonas, (1997) *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 488-498.

- Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik & U. Bonas, (1998) *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Molecular microbiology* **29**: 1379-1390.
- Jackson, M.W. & G.V. Plano, (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS microbiology letters* **186**: 85-90.
- Jia, J., Y. Jin, T. Bian, D. Wu, L. Yang, N. Terada, W. Wu & S. Jin, (2014) Bacterial delivery of TALEN proteins for human genome editing. *PloS one* **9**: e91547.
- Jin, Q. & S.Y. He, (2001) Role of the Hrp Pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* **294**: 2556-2558.
- Johnson, D.L., C.B. Stone & J.B. Mahony, (2008) Interactions between CdsD, CdsQ, and CdsL, three putative *Chlamydophila pneumoniae* type III secretion proteins. *Journal of bacteriology* **190**: 2972-2980.
- Johnson, S. & A. Blocker, (2008) Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase. *FEMS microbiology letters* **286**: 274-278.
- Jones, J.B., G.H. Lacy, H. Bouzar, R.E. Stall & N.W. Schaad, (2004) Reclassification of the *xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**: 755-762.
- Jones, J.B., R.E. Stall & H. Bouzar, (1998) Diversity among *xanthomonads* pathogenic on pepper and tomato. *Annual review of phytopathology* **36**: 41-58.
- Jouihri, N., M.P. Sory, A.L. Page, P. Gounon, C. Parsot & A. Allaoui, (2003) MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Molecular microbiology* **49**: 755-767.
- Journet, L., C. Agrain, P. Broz & G.R. Cornelis, (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760.
- Juarez-Rodriguez, M.D., L.T. Arteaga-Cortes, R. Kader, R. Curtiss, 3rd & J.E. Clark-Curtiss, (2012) Live attenuated *Salmonella* vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* with antigen delivery via the type III secretion system. *Infection and immunity* **80**: 798-814.
- Kawamoto, A., Y.V. Morimoto, T. Miyata, T. Minamino, K.T. Hughes, T. Kato & K. Namba, (2013) Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body. *Scientific reports* **3**: 3369.
- Kay, S., S. Hahn, E. Marois, G. Hause & U. Bonas, (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648-651.
- Kay, S., S. Hahn, E. Marois, R. Wieduwild & U. Bonas, (2009) Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**: 859-871.
- Khan, I.H., T.S. Reese & S. Khan, (1992) The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5956-5960.
- Kimbrough, T.G. & S.I. Miller, (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11008-11013.
- Koebnik, R., A. Krüger, F. Thieme, A. Urban & U. Bonas, (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *Journal of bacteriology* **188**: 7652-7660.
- Koraimann, G., (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2371-2388.
- Korotkov, K.V., T. Gonen & W.G. Hol, (2011) Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends in Biochemical Sciences* **36**: 433-443.

- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G.R. Cornelis & J. Tommassen, (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Molecular microbiology* **26**: 789-797.
- Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, M.A. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop II & K.M. Peterson, (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krishnamurthy, M., A. Dugan, A. Nwokoye, Y.H. Fung, J.K. Lancia, C.Y. Majmudar & A.K. Mapp, (2011) Caught in the act: covalent cross-linking captures activator-coactivator interactions in vivo. *ACS chemical biology* **6**: 1321-1326.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J.E. Galan & S.I. Aizawa, (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kubori, T., A. Sukhan, S.I. Aizawa & J.E. Galan, (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10225-10230.
- Kubori, T., S. Yamaguchi & S. Aizawa, (1997) Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *Journal of bacteriology* **179**: 813-817.
- Kudryashev, M., M. Stenta, S. Schmelz, M. Amstutz, U. Wiesand, D. Castano-Diez, M.T. Degiacomi, S. Munnich, C.K. Bleck, J. Kowal, A. Diepold, D.W. Heinz, M. Dal Peraro, G.R. Cornelis & H. Stahlberg, (2013) *In situ* structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *eLife* **2**: e00792.
- Kutsukake, K., T. Minamino & T. Yokoseki, (1994) Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **176**: 7625-7629.
- Kvitko, B.H., A.R. Ramos, J.E. Morello, H.S. Oh & 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. *Journal of bacteriology* **189**: 8059-8072.
- Lakshmanan, M., Y. Kodama, T. Yoshizumi, K. Sudesh & K. Numata, (2013) Rapid and efficient gene delivery into plant cells using designed peptide carriers. *Biomacromolecules* **14**: 10-16.
- Lancia, J.K., A. Nwokoye, A. Dugan, C. Joiner, R. Pricer & A.K. Mapp, (2013) Sequence context and crosslinking mechanism affect the efficiency of in vivo capture of a protein-protein interaction. *Biopolymers* **4**: 391-397.
- Lara-Tejero, M., J. Kato, S. Wagner, X. Liu & J.E. Galan, (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**: 1188-1191.
- Lavander, M., L. Sundberg, P.J. Edqvist, S.A. Lloyd, H. Wolf-Watz & A. Forsberg, (2002) Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *Journal of bacteriology* **184**: 4500-4509.
- Lee, S.H. & J.E. Galan, (2004) *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Molecular microbiology* **51**: 483-495.
- Lefebvre, M.D. & J.E. Galan, (2014) The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a *Salmonella* type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 817-822.

- Letzelter, M., I. Sorg, L.J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut & G.R. Cornelis, (2006) The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *The EMBO journal* **25**: 3223-3233.
- Li, C.M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk & S. Taira, (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *The EMBO journal* **21**: 1909-1915.
- Li, H. & V. Sourjik, (2011) Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **80**: 886-899.
- Li, R.F., G.T. Lu, L. Li, H.Z. Su, G.F. Feng, Y. Chen, Y.Q. He, B.L. Jiang, D.J. Tang & J.L. Tang, (2013) Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the hrp genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environmental microbiology*.
- Li, Y.R., H.S. Zou, Y.Z. Che, Y.P. Cui, W. Guo, L.F. Zou, S. Chatterjee, E.M. Biddle, C.H. Yang & G.Y. Chen, (2011) A novel regulatory role of HrpD6 in regulating *hrp-hrc-hpa* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**: 1086-1101.
- Lilic, M., M. Vujanac & C.E. Stebbins, (2006) A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol Cell* **3**: 653-664.
- Liu, Z.Y., L.F. Zou, X.B. Xue, L.L. Cai, W.X. Ma, L. Xiong, Z.Y. Ji & G.Y. Chen, (2014) HrcT is a key component of the type III secretion system in *Xanthomonas* and also regulates the expression of the key hrp transcriptional activator HrpX. *Applied and environmental microbiology* **in press**.
- Lloyd, S.A., M. Norman, R. Rosqvist & H. Wolf-Watz, (2001) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Molecular microbiology* **39**: 520-532.
- Lohou, D., F. Lonjon, S. Genin & F. Vaillau, (2013) Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Frontiers in plant science* **4**: 435.
- Lorenz, C. & D. Büttner, (2009) Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* **191**: 1414-1428.
- Lorenz, C. & 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. *Molecular microbiology* **79**: 447-467.
- Lorenz, C., O. Kirchner, M. Egler, J. Stuttmann, U. Bonas & D. Büttner, (2008a) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Molecular microbiology* **69**: 344-360.
- Lorenz, C., S. Schulz, T. Wolsch, O. Rossier, U. Bonas & D. Büttner, (2008b) HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS pathogens* **4**: e1000094.
- Lountos, G.T., B.P. Austin, S. Nallamsetty & 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**: 467-474.
- Löwer, M. & G. Schneider, (2009) Prediction of type III secretion signals in genomes of gram-negative bacteria. *PloS one* **4**: e5917.
- Lux, R., N. Kar & S. Khan, (2000) Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes. *Journal of molecular biology* **298**: 577-583.
- Magdalena, J., A. Hachani, M. Chamekh, N. Jouihri, P. Gounon, A. Blocker & A. Allaoui, (2002) Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *Journal of bacteriology* **184**: 3433-3441.

- Majmudar, C.Y., L.W. Lee, J.K. Lancia, A. Nwokoye, Q. Wang, A.M. Wands, L. Wang & A.K. Mapp, (2009) Impact of nonnatural amino acid mutagenesis on the in vivo function and binding modes of a transcriptional activator. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 14240-14242.
- Manoil, C. & J. Beckwith, (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* **233**: 1403-1408.
- Marie, C., W.J. Deakin, V. Viprey, J. Kopcinska, W. Golinowski, H.B. Krishnan, X. Perret & W.J. Broughton, (2003) Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **16**: 743-751.
- Marlovits, T.C., T. Kubori, M. Lara-Tejero, D. Thomas, V.M. Unger & J.E. Galan, (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**: 637-640.
- Marlovits, T.C., T. Kubori, A. Sukhan, D.R. Thomas, J.E. Galan & V.M. Unger, (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**: 1040-1042.
- McDermott, J.E., A. Corrigan, E. Peterson, C. Oehmen, G. Niemann, E.D. Cambronne, D. Sharp, J.N. Adkins, R. Samudrala & F. Heffron, (2011) Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infection and immunity* **79**: 23-32.
- McDowell, M.A., S. Johnson, J.E. Deane, M. Cheung, A.D. Roehrich, A.J. Blocker, J.M. McDonnell & S.M. Lea, (2011) Structural and functional studies on the N-terminal domain of the *Shigella* type III secretion protein MxiG. *The Journal of biological chemistry* **286**: 30606-30614.
- McMurry, J.L., J.S. Van Arnem, M. Kihara & R.M. Macnab, (2004) Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery. *Journal of bacteriology* **186**: 7586-7592.
- Mergulhao, F.J., D.K. Summers & G.A. Monteiro, (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances* **23**: 177-202.
- Mew, T.W., A.M. Alvarez, J.E. Leach & J. Swings, (1993) Focus on bacterial blight of rice. *Plant Dis.* **77**: 5-12.
- Meyer, D., S. Cunnac, M. Gueneron, C. Declercq, F. Van Gijsegem, E. Lauber, C. Boucher & 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. *Journal of bacteriology* **188**: 4903-4917.
- Miao, E.A., D.P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C.G. Lorang, S.E. Warren, I.A. Leaf & A. Aderem, (2010) Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 3076-3080.
- Michiels, T. & G.R. Cornelis, (1991) Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *Journal of bacteriology* **173**: 1677-1685.
- Minamino, T., H.U. Ferris, N. Moriya, M. Kihara & 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. *Journal of molecular biology* **362**: 1148-1158.
- Minamino, T., K. Imada & K. Namba, (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**: 1105-1115.
- Minamino, T., M. Kinoshita, N. Hara, S. Takeuchi, A. Hida, S. Koya, H. Glenwright, K. Imada, P.D. Aldridge & K. Namba, (2012) Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Molecular microbiology* **83**: 775-788.

- Minamino, T. & R.M. Macnab, (2000a) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *Journal of bacteriology* **182**: 4906-4914.
- Minamino, T. & R.M. MacNab, (2000b) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Molecular microbiology* **35**: 1052-1064.
- Minamino, T., Y.V. Morimoto, N. Hara & K. Namba, (2011) An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nature communications* **2**: 475.
- Minamino, T. & K. Namba, (2008) Distinct roles of the ATPase FliI and proton motive force in bacterial flagellar export. *Nature* **451**: 485-488.
- Minamino, T., Y. Saijo-Hamano, Y. Furukawa, B. Gonzalez-Pedrajo, R.M. Macnab & K. Namba, (2004) Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *Journal of molecular biology* **341**: 491-502.
- Morello, J.E. & A. Collmer, (2009) *Pseudomonas syringae* HrpP is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate switching protein. *J Bact* **191**: 3120-3131.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama & C. Sasakawa, (2006) *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *The Journal of biological chemistry* **281**: 599-607.
- Morris, D.P., E.D. Roush, J.W. Thompson, M.A. Moseley, J.W. Murphy & J.L. McMurry, (2010) Kinetic characterization of *Salmonella* FliK-FlhB interactions demonstrates complexity of the type III secretion substrate-specificity switch. *Biochemistry* **49**: 6386-6393.
- Mota, L.J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain & G.R. Cornelis, (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Mueller, C.A., P. Broz & G.R. Cornelis, (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular microbiology* **68**: 1085-1095.
- Ni, Y. & R. Chen, (2009) Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* **31**: 1661-1670.
- Niemann, G.S., R.N. Brown, I.T. Mushamiri, N.T. Nguyen, R. Taiwo, A. Stufkens, R.D. Smith, J.N. Adkins, J.E. McDermott & F. Heffron, (2013) RNA type III secretion signals that require Hfq. *Journal of bacteriology* **195**: 2119-2125.
- Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner & U. Bonas, (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* **185**: 7092-7102.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel & U. Bonas, (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular microbiology* **41**: 1271-1281.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel & 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 & A. Abe, (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **188**: 2801-2811.
- Okazaki, S., T. Kaneko, S. Sato & K. Saeki, (2013) Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 17131-17136.
- Okazaki, S., S. Zehner, J. Hempel, K. Lang & M. Gottfert, (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS microbiology letters* **295**: 88-95.

- Olson, E.S., T.A. Aguilera, T. Jiang, L.G. Ellies, Q.T. Nguyen, E.H. Wong, L.A. Gross & R.Y. Tsien, (2009) In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **1**: 382-393.
- Paul, K. & D.F. Blair, (2006) Organization of FliN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **188**: 2502-2511.
- Payne, P.L. & S.C. Straley, (1999) YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. *Journal of bacteriology* **181**: 2852-2862.
- Petnicki-Ocwieja, T., K. van Dijk & J.R. Alfano, (2005) The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *Journal of bacteriology* **187**: 649-663.
- Picking, W.L., H. Nishioka, P.D. Hearn, M.A. Baxter, A.T. Harrington, A. Blocker & W.D. Picking, (2005) IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and Immunology* **73**: 1432-1440.
- Poyraz, O., H. Schmidt, K. Seidel, F. Delissen, C. Ader, H. Tenenboim, C. Goosmann, B. Laube, A.F. Thunemann, A. Zychlinsky, M. Baldus, A. Lange, C. Griesinger & M. Kolbe, (2010) Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nature structural & molecular biology* **17**: 788-792.
- Pucciarelli, M.G. & F. Garcia-del Portillo, (2003) Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. *Molecular microbiology* **48**: 573-585.
- Ramamurthi, K.S. & O. Schneewind, (2002) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the yopQ secretion signal. *Journal of bacteriology* **184**: 3321-3328.
- Reed, B. & R. Chen, (2013) Biotechnological applications of bacterial protein secretion: from therapeutics to biofuel production. *Research in microbiology* **164**: 675-682.
- Riordan, K.E. & O. Schneewind, (2008) YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Molecular microbiology* **68**: 1485-1501.
- Roine, E., W.S. Wei, J. Yuan, E.L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk & 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**: 3459-3464.
- Rossier, O., G. Van den Ackerveken & U. Bonas, (2000) HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular microbiology* **38**: 828-838.
- Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn & U. Bonas, (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9368-9373.
- Sal-Man, N., W. Deng & B.B. Finlay, (2012) EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* **442**: 119-125.
- Salgado-Pabon, W., C. Konradt, P.J. Sansonetti & A. Phalipon, (2014) New insights into the crosstalk between *Shigella* and T lymphocytes. *Trends in microbiology* **22**: 192-198.
- Samudrala, R., F. Heffron & J.E. McDermott, (2009) Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS pathogens* **5**: e1000375.
- Sani, M., A. Allaoui, F. Fusetti, G.T. Oostergetel, W. Keegstra & E.J. Boekema, (2007) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron* **38**: 291-301.

- Sato, H. & D.W. Frank, (2011) Multi-functional characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* type III needle-tip protein, PcrV; comparison to orthologs in other Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* **2**: 142.
- Schechter, L.M., K.A. Roberts, Y. Jamir, J.R. Alfano & A. Collmer, (2004) *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *Journal of bacteriology* **186**: 543-555.
- Schesser, K., E. Frithz-Lindsten & H. Wolf-Watz, (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *Journal of bacteriology* **178**: 7227-7233.
- Scheurwater, E.M. & L.L. Burrows, (2011) Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer. *FEMS microbiology letters* **318**: 1-9.
- Schlumberger, M.C. & W.D. Hardt, (2006) *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Current opinion in microbiology* **9**: 46-54.
- Schlumberger, M.C., A.J. Muller, K. Ehrbar, B. Winnen, I. Duss, B. Stecher & W.D. Hardt, (2005) Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12548-12553.
- Schraidt, O., M.D. Lefebvre, M.J. Brunner, W.H. Schmied, A. Schmidt, J. Radics, K. Mechtler, J.E. Galan & T.C. Marlovits, (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS pathogens* **6**: e1000824.
- Schraidt, O. & T.C. Marlovits, (2011) Three-dimensional model of *Salmonella's* needle complex at subnanometer resolution. *Science* **331**: 1192-1195.
- Schuch, R. & A.T. Maurelli, (2001) MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *Journal of bacteriology* **183**: 6991-6998.
- Schulte, R. & U. Bonas, (1992) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of bacteriology* **174**: 815-823.
- Schulz, S. & D. Büttner, (2011) Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas*. *Infect. Immun.* **79**: 2998-3011.
- Schulze, S., S. Kay, D. Büttner, M. Egler, L. Eschen-Lippold, G. Hause, A. Krüger, J. Lee, O. Müller, D. Scheel, R. Szczeny, F. Thieme & U. Bonas, (2012) Analyses of new type III effectors from *Xanthomonas* uncover XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* **195**: 894-911.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa & A. Abe, (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 11638-11643.
- Shen, D.K., N. Moriya, I. Martinez-Argudo & A.J. Blocker, (2012) Needle length control and the secretion substrate specificity switch are only loosely coupled in the type III secretion apparatus of *Shigella*. *Microbiology* **158**: 1884-1896.
- Singer, A.U., S. Schulze, T. Skarina, X. Xu, H. Cui, L. Eschen-Lippold, M. Egler, T. Srikumar, B. Raught, J. Lee, D. Scheel, A. Savchenko & U. Bonas, (2013) A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. *PLoS pathogens* **9**: e1003121.
- Smith, T.G., L. Pereira & T.R. Hoover, (2009) *Helicobacter pylori* FlhB processing-deficient variants affect flagellar assembly but not flagellar gene expression. *Microbiology* **155**: 1170-1180.

- Sohn, K.H., R. Lei, A. Nemri & J.D. Jones, (2007) The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 4077-4090.
- Sorg, I., S. Wagner, M. Amstutz, S.A. Muller, P. Broz, Y. Lussi, A. Engel & G.R. Cornelis, (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *The EMBO journal* **26**: 3015-3024.
- Sory, M.P., A. Boland, I. Lambermont & 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**: 11998-12002.
- Spaeth, K.E., Y.S. Chen & R.H. Valdivia, (2009) The *Chlamydia* type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex. *PLoS pathogens* **5**: e1000579.
- Stone, C.B., D.C. Bulir, J.D. Gilchrist, R.K. Toor & J.B. Mahony, (2010) Interactions between flagellar and type III secretion proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *BMC microbiology* **10**: 18.
- Sukhan, A., T. Kubori & J.E. Galan, (2003) Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. *Journal of bacteriology* **185**: 3480-3483.
- Suzuki, S., L. Franchi, Y. He, R. Munoz-Planillo, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa & G. Nunez, (2014) *Shigella* Type III Secretion Protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlrc4 Inflammasome Activation Independently of Pkcdelta. *PLoS pathogens* **10**: e1003926.
- Szczesny, R., M. Jordan, C. Schramm, S. Schulz, V. Cogeze, U. Bonas & D. Büttner, (2010) Functional characterization of the Xps and Xcs type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytologist* **187**: 983-1002.
- Szurek, B., O. Rossier, G. Hause & U. Bonas, (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular microbiology* **46**: 13-23.
- Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai & 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. *The EMBO journal* **19**: 3876-3887.
- Tamir-Ariel, D., N. Navon & S. Burdman, (2007) Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *Journal of bacteriology* **189**: 6359-6371.
- Taylor, K.W., J.G. Kim, X.B. Su, C.D. Aakre, J.A. Roden, C.M. Adams & M.B. Mudgett, (2012) Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS pathogens* **8**: e1002768.
- Teper, D., D. Salomon, S. Sunitha, J.G. Kim, M.B. Mudgett & G. Sessa, (2013) *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **77**: 297-309.
- Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Buttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D.H. Nies, U. Niesbach-Klosgen, T. Patschkowski, C. Ruckert, O. Rupp, S. Schneiker, S.C. Schuster, F.J. Vorholter, E. Weber, A. Puhler, U. Bonas, D. Bartels & O. Kaiser, (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of bacteriology* **187**: 7254-7266.

- Thieme, F., R. Szczeny, A. Urban, O. Kirchner, G. Hause & U. Bonas, (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 1250-1261.
- Thomas, D.R., N.R. Francis, C. Xu & D.J. DeRosier, (2006) The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **188**: 7039-7048.
- Thomas, N.A., W. Deng, N.T. Baker, J.L. Puente & B.B. Finlay, (2007) Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **282**: 29634-29645.
- Thomas, N.A., W. Deng, J.L. Puente, E.A. Frey, C.K. Yip, N.C. Strynadka & B.B. Finlay, (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **57**: 1762-1779.
- Thomas, W.J., C.A. Thireault, J.A. Kimbrel & J.H. Chang, (2009) Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrc cluster into the genome of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60**: 919-928.
- Thomassin, J.L., X. He & N.A. Thomas, (2011) Role of EscU auto-cleavage in promoting type III effector translocation into host cells by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *BMC microbiology* **11**: 205.
- Tosi, T., A. Pflug, K.F. Discola, D. Neves & A. Dessen, (2013) Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. *Research in microbiology* **164**: 605-619.
- Upadhyaya, N.M., R. Mago, B.J. Staskawicz, M.A. Ayliffe, J.G. Ellis & P.N. Dodds, (2014) A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **27**: 255-264.
- Ustun, S., V. Bartetzko & F. Bornke, (2013) The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. *PLoS pathogens* **9**: e1003427.
- van Asselt, E.J., A.-M.-W.-H.-. Thunnissen & B.W. Dijkstra, (1999) High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J Mol Biol* **291**: 877-898.
- Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello & C. Boucher, (1995) The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular microbiology* **15**: 1095-1114.
- Van Gijsegem, F., J. Vasse, J.C. Camus, M. Marena & C. Boucher, (2000) *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Molecular microbiology* **36**: 249-260.
- Wagner, S., L. Konigsmair, M. Lara-Tejero, M. Lefebvre, T.C. Marlovits & J.E. Galan, (2010) Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 17745-17750.
- Wang, Y., M. Sun, H. Bao, Q. Zhang & D. Guo, (2013) Effective identification of bacterial type III secretion signals using joint element features. *PloS one* **8**: e59754.
- Weber, E., C. Berger, U. Bonas & R. Koebnik, (2007) Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrpD and hrpE operon structure. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 559-567.

- Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T.K. Korhonen, U. Bonas & R. Koebnik, (2005) The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *Journal of bacteriology* **187**: 2458-2468.
- Wengelnik, K. & U. Bonas, (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* **178**: 3462-3469.
- Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel & U. Bonas, (1996a) Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *Journal of bacteriology* **178**: 1061-1069.
- Wengelnik, K., O. Rossier & U. Bonas, (1999) Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *Journal of bacteriology* **181**: 6828-6831.
- Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken & U. Bonas, (1996b) HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 704-712.
- West, N.P., P. Sansonetti, J. Mounier, R.M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M.C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, M. Tanguy & C.M. Tang, (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* **307**: 1313-1317.
- Widmaier, D.M., D. Tullman-Ercek, E.A. Mirsky, R. Hill, S. Govindarajan, J. Minshull & C.A. Voigt, (2009) Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers. *Molecular systems biology* **5**: 309.
- Wiesand, U., I. Sorg, M. Amstutz, S. Wagner, J. van den Heuvel, T. Luhrs, G.R. Cornelis & D.W. Heinz, (2009) Structure of the type III secretion recognition protein YscU from *Yersinia enterocolitica*. *Journal of molecular biology* **385**: 854-866.
- Williams, A.W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S.I. Aizawa, I. Kawagishi & R.M. Macnab, (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **178**: 2960-2970.
- Wilson, J.W., C. Coleman & C.A. Nickerson, (2007) Cloning and transfer of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system for studies of a range of gram-negative genera. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5911-5918.
- Wilson, J.W. & C.A. Nickerson, (2006) Cloning of a functional *Salmonella* SPI-1 type III secretion system and development of a method to create mutations and epitope fusions in the cloned genes. *Journal of biotechnology* **122**: 147-160.
- Winnen, B., M.C. Schlumberger, A. Sturm, K. Schubach, S. Siebenmann, P. Jenny & W.D. Hardt, (2008) Hierarchical effector protein transport by the *Salmonella Typhimurium* SPI-1 type III secretion system. *PLoS one* **3**: e2178.
- Wood, S., J. Jin & 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. *Journal of bacteriology* **190**: 4252-4262.
- Yang, H., Y. Tan, T. Zhang, L. Tang, J. Wang, Y. Ke, Z. Guo, X. Yang, R. Yang & Z. Du, (2013a) Identification of novel protein-protein interactions of *Yersinia pestis* type III secretion system by yeast two hybrid system. *PLoS one* **8**: e54121.
- Yang, X., Y. Guo, J. Luo, X. Pu & M. Li, (2013b) Effective identification of Gram-negative bacterial type III secreted effectors using position-specific residue conservation profiles. *PLoS one* **8**: e84439.
- 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 & N.C. Strynadka, (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**: 702-707.

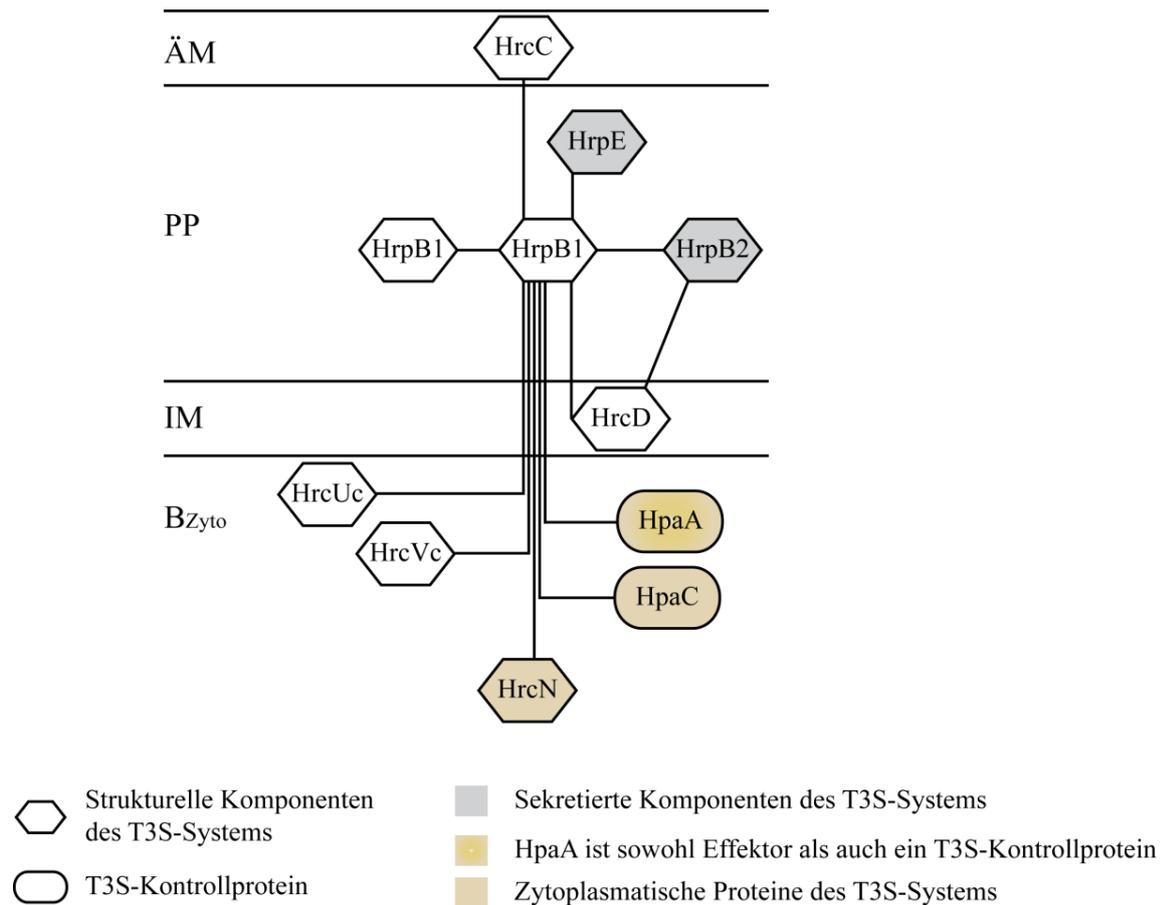
- Yoshida, Y., T. Miki, S. Ono, T. Haneda, M. Ito & N. Okada, (2014) Functional Characterization of the Type III Secretion ATPase SsaN Encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *PloS one* **9**: e94347.
- Yu, X.J., M. Liu, S. Matthews & D.W. Holden, (2011) Tandem translation generates a chaperone for the *Salmonella* type III secretion system protein SsaQ. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 36098-36107.
- Zarivach, R., W. Deng, M. Vuckovic, H.B. Felise, H.V. Nguyen, S.I. Miller, B.B. Finlay & N.C. Strynadka, (2008) Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature* **453**: 124-127.
- Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo & R.M. Macnab, (2002) Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochemistry* **41**: 9516-9524.

## 5. Anhang

Tabelle 5: Ausgewählte Komponenten von Translokations-assoziierten und Flagellum-assoziierten T3S-Systemen.<sup>1</sup>

Translokations-assoziierte T3S-Systeme						Flagellum-assoziiertes T3S-System aus <i>Salmonella</i> spp.		Lokalisation <sup>4</sup>
Tierpathogene Bakterien			Pflanzenpathogene Bakterien					
<i>Yersinia</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. <sup>2</sup>	<i>S. flexneri</i>	EPEC	<i>Xcv</i> <sup>3</sup>	<i>P. syringae</i>	Mögliche Funktion		
YscC	InvG	MxiD	EscC	HrcC	HrcC	-	Sekretin, Kanal in der ÄM	ÄM
YscJ	PrgK	MxiJ	EscJ	HrcJ	HrcJ	FliF	Ausbildung IM-Ring	PP
YscD	PrgH	MxiG	EscD	HrcD	HrpQ	-	Ausbildung IM-Ring	IM
YscR	InvL	Spa24	EscR	HrcR	HrcR	FliP	Beteiligt an Assemblierung des T3S-Systems	IM
YscS	SpaQ	Spa9	EscS	HrcS	HrcS	FliQ	Beteiligt an Assemblierung des T3S-Systems	IM
YscT	InvN	Spa29	EscT	HrcT	HrcT	FliR	Beteiligt an Assemblierung des T3S-Systems	IM
YscU	SpaS	Spa40	EscU	HrcU	HrcU	FliB	Beteiligung am Substratwechsel	IM
YscV	InvA	MxiA	EscV	HrcV	HrcV	FliA	Beteiligung an der Substratbindung	IM
YscN	InvC	Spa47	EscN	HrcN	HrcN	FliI	ATPase, Rekrutierung von T3S-Substraten	Zyt
YscL	-	MxiN	EscL	HrcL	HrpE	FliH	Regulator der ATPase	Zyt
YscQ	SpaO	Spa33	EscQ	HrcQ	HrcQ <sub>A+B</sub>	FliM, FliN, FliG	C-Ring, Rekrutierung von T3S-Substraten	Zyt
YscI	PrgJ	MxiI	EscI	HrpB2	HrpB	FlgB, FlgC, FlgF, FlgG	vorhergesagter „inner rod“	PP
YscF	PrgI	MxiH	EscF	HrpE	HrpA	-	Ausbildung der Nadel bzw. des Pilus	EK
LcrV	SipD	IpaD	-	-	-	-	„tip“-Protein	EK
YopB, YopD	SipB, SipC	IpaB, IpaC	EspB, EspD	HrpF, XopA	HrpK	-	Translokon	EK

<sup>1</sup> Verändert nach (Diepold & Wagner, 2014).<sup>2</sup> Angaben beziehen sich auf das SPI-1 T3S-System von *Salmonella* spp.<sup>3</sup> *Xcv*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.<sup>4</sup> Lokalisation, subzelluläre Lokalisation; ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran; Zyt, Zytoplasma; PP, Periplasma; EK, extrazelluläre Komponente.



**Abbildung 5: HrpB1 interagiert mit verschiedenen Komponenten des Translokations-assoziierten T3S-Systems aus *Xcv*.** (A) Schematische Darstellung der HrpB1-Interaktionen. HrpB1 interagiert mit der ÄM-Ringkomponente HrcC, der IM-Ringkomponente HrcD, den C-terminalen zytoplasmatischen Domänen der IM-Komponenten HrcU (HrcU<sub>C</sub>) und HrcV (HrcV<sub>C</sub>) sowie mit sekretierten Komponenten des T3S-Systems (HrpE, HrpB2) und zytoplasmatischen Proteinen (HpaC, HpaA, HrcN). Die Interaktionen sind durch Striche dargestellt. Das Schema zeigt nicht alle bekannten Interaktionen zwischen den T3S-Komponenten. ÄM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; B<sub>Zyto</sub>, bakterielles Zytoplasma.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. D. Büttner, für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, der Überlassung des interessanten Themas und für die Anfertigung des ersten Gutachtens. Ohne die stetigen Anregungen, konstruktiven Gespräche und das Vertrauen, welches sie mir stets entgegengebracht hat, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. R. B. Klösgen und Prof. Dr. M. Göttfert, für die Anfertigung des zweiten und externen Gutachtens.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. U. Bonas, für die Möglichkeit meine Arbeit in ihrer Abteilung anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei allen Kollegen der Abteilung Pflanzengenetik, die mit ihrer Unterstützung und wertvollen Ratschlägen ebenso zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein ganz besonderer Dank gilt Normen, Ulrike und Felix - ohne die die Zeit im Labor nicht so angenehm gewesen wäre.

Ein sehr herzliches Dankeschön möchte ich an meine Familie, insbesondere an meine Eltern und meine Schwiegermutter richten, die mich in der Zeit meines Studiums und meiner Promotion unterstützt haben.

Großer Dank gebührt schließlich auch meiner Ehefrau, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Geduld während meiner gesamten akademischen Laufbahn.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Hausner  
Vorname: Jens  
Geburtsdatum / -ort: 11.11.1984, in Halle (Saale)  
Geschlecht: Männlich  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: BRD

### Angaben zum Bildungsgang

08/1995 - 07/2004 KGS Wilhelm-von-Humboldt, Halle (Saale)  
Abschluss: Abitur

07/2004 - 04/2005 Grundwehrdienst im Sanitätsregiment 32

10/2005 - 10/2006 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)  
Studium der medizinischen Physik

10/2006 - 07/2011 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)  
Studium der Biologie, Diplomarbeit zum Thema:  
„Charakterisierung von HrcU, einer konservierten Komponente  
des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv.  
*vesicatoria*“  
Abschluss: Diplom Biologe

08/2011- Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)  
Promotionsarbeit zum Thema: „Funktionsanalyse von  
Komponenten des Typ III-Sekretionssystems aus *Xanthomonas*  
*campestris* pv. *vesicatoria*“

**Publikationsliste**

Morbitzer, R., J. Elsaesser, J. Hausner & T. Lahaye, (2011) Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res* **39**: 5790-5799.

Lorenz, C., J. Hausner & D. Büttner, (2012) HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. *PLoS one* **7**: e51063.

Hausner, J., N. Hartmann, C. Lorenz & D. Büttner, (2013) The Periplasmic HrpB1 Protein from *Xanthomonas* spp. Binds to Peptidoglycan and to Components of the Type III Secretion System. *Applied and environmental microbiology* **79**: 6312-6324.

Hausner, J. & D. Büttner, (2014) The YscU/FlhB homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates. *Microbiology* **160**: 576-588.

**Erklärung**

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

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

Halle (Saale), den 21.05.2014

Jens Hausner