

**Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems**

**von**

***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Carolin Berger

geb. am: 15.10.1973

in: Gütersloh

Gutachter/in:

1. PD Dr. Ralf Koebnik

2. Prof. Dr. Michael Göttfert

Halle (Saale), 08.04.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008282**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008282>]

## Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate und einer der Modellorganismen zum Studium bakterieller Pflanzenpathogene. Das *hrp* („hypersensitive response and pathogenicity“-) Gencluster von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* kodiert ein Typ III-Sekretionssystem, das die Proteinsekretion in das extrazelluläre Medium sowie die Translokation von Effektorproteinen in die pflanzliche Wirtszelle ermöglicht. Unter den annähernd 20 Proteinen, die in die Typ III-Sekretion involviert sind, sind neun von ihnen zwischen pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und bilden wahrscheinlich die Kernkomponente eines funktionellen Sekretionsapparates. Unter Zuhilfenahme eines *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems wurden die Interaktionen der konservierten Proteine des Sekretionsapparates näher charakterisiert. Hierbei konnten Homo- und Heterodimerisierungen zwischen der ATPase HrcN und dem regulatorischen Protein HrcL gezeigt werden. Auch war es möglich, Interaktionen zwischen den löslichen zytoplasmatischen Domänen der integralen Membranproteine HrcU und HrcV aufzuzeigen.

Der Proteinkomplex des Typ III-Sekretionssystems in der inneren bakteriellen Membran wird sehr wahrscheinlich von sechs integralen Membranproteinen aufgebaut, die bis auf HrpD5 homolog zu Komponenten des Flagellumbasalkörpers sind. Mittels des mini-Tn5-Derivates *Tnpholac1* wurde die Topologie (also die Anzahl transmembraner Segmente und ihrer Orientierung in der Membran) bestimmt und zu allen sechs Proteinen ein Topologiemodell erstellt.

Um genauere Aussagen über die Organisation der Operone *hrpD* und *hrpE* von *Xcv* zu erlangen, wurde der Transkriptionsstart von *hrpD5* mittels 5'-RACE bestimmt. Eine His<sub>6</sub>-Epitop-markierte HrpD5-Variante wurde erstellt und gereinigt, um die N-terminale Sequenz des Proteins zu bestimmen.

## Summary

The Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is the causal agent of the bacterial spot disease in pepper and tomato and serves a model organism to study bacterial plant pathogens. The *hrp* („hypersensitive response and pathogenicity“) gene cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a type III secretion system which mediates protein secretion into the extracellular medium as well as the translocation of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. Among the approximately 20 proteins that are involved in type III secretion nine are conserved between different bacterial species and most likely constitute for the core components of the secretion apparatus. Protein-protein interactions between these conserved proteins were characterized using a *lexA*-based bacterial two-hybrid system. Heterologous and homologous interactions were found between the ATPase HrcN and the regulatory component HrcL. Furthermore, interactions between the soluble domains of the integral membrane proteins HrcU and HrcV were discovered. The type III secretion apparatus in the inner bacterial membrane consists of six integral membrane proteins most of with exception of HrpD5, are homologous to components of the flagellar basal body. Membrane topologies of all six proteins were investigated using the mini-Tn5 transposon derivative Tn*pholac1* and topology models were established for each protein. To achieve more information about the organisation of the *hrpD-hrpE* operons of *Xcv* the transcriptional start site of *hrpD5* was determined. A His<sub>6</sub>-epitope-tagged version of HrpD5 was used to determine the translational start site.

---

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VIII
Liste der Abkürzungen.....	X
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteinsekretionssysteme Gram-negativer Bakterien .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Einlagerung der Proteine in die Membran .....	4
<b>1.2. Das Typ III-Sekretionssystem bei pflanzenpathogenen Bakterien.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> als Modellsystem.....	6
1.2.2. Das Typ III-Sekretionssystem von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	8
1.2.2.1. Die Organisation und Regulation des <i>hrp</i> -Genclusters .....	8
1.2.2.2. Der Aufbau des Typ III-Sekretionssystems in <i>Xcv</i> .....	11
<b>1.3. Zielstellung .....</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Medien und Kulturbedingungen .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Antibiotika.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Puffer .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Antikörper .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Bakterienstämme und Plasmide .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. Oligonukleotide .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7. Pflanzenmaterial .....</b>	<b>21</b>
<b>2.8. Inokulation von Pflanzen .....</b>	<b>22</b>
<b>2.9. Polymerase-Kettenreaktion: Amplifizierung von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>22</b>
2.9.1. Kolonie-PCR.....	22
<b>2.10. Präparation von Plasmid-DNA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.11. Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....</b>	<b>23</b>
2.11.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	23
<b>2.12. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....</b>	<b>23</b>
<b>2.13. Ligation von DNA-Fragmenten .....</b>	<b>24</b>
<b>2.14. Klonierung von DNA-Fragmenten .....</b>	<b>24</b>

---

<b>2.15. DNA-Sequenzierung</b> .....	<b>24</b>
<b>2.16. Herstellung transformationskompetenter Zellen</b> .....	<b>25</b>
2.16.1. Chemisch kompetente Zellen nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode .....	25
2.16.2. Elektrokompente Zellen .....	25
<b>2.17. Transfer von DNA in <i>E. coli</i>- und <i>Xanthomonas</i>-Stämme</b> .....	<b>26</b>
2.17.1. Elektroporation .....	26
2.17.2. Transformation mittels CaCl <sub>2</sub> .....	26
2.17.3. Triparentale Konjugation von <i>Xanthomonas</i> .....	26
<b>2.18. Bestimmung der <math>\beta</math>-Glucuronidase(GUS)-Aktivität</b> .....	<b>27</b>
<b>2.19. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</b> .....	<b>28</b>
<b>2.20. Western Blot-Analyse</b> .....	<b>28</b>
2.20.1. Elektroblothing von Proteinen für die Proteinsequenzierung .....	29
<b>2.21. <i>In vitro</i>-Sekretionstest</b> .....	<b>29</b>
<b>2.22. Konstruktion eines Plasmids mit induzierbarem Promotor in <i>Xcv</i></b> .....	<b>30</b>
2.22.1. Untersuchungen eines Arabinose-induzierbaren Promotors .....	30
2.22.2. Versuche zur Konstruktion eines kupferinduzierbaren Expressionsplasmids .....	31
<b>2.23. Herstellung einer <i>lon</i>-Mutante in <i>Xcv</i></b> .....	<b>31</b>
2.23.1. Einführung einer Deletion in <i>Xcv</i> mittels homologer Rekombination .....	31
2.23.2. Protokoll zum Genaustausch mittels homologer Rekombination in <i>Xcv</i> .....	33
2.23.3. Physiologische Charakterisierung der <i>lon</i> -Mutante .....	34
2.23.3.1. UV-Sensitivitätstest .....	34
2.23.3.2. Morphologische Charakterisierung .....	34
<b>2.24. Nutzung eines <i>lexA</i>-basierenden bakteriellen Dihybridsystems</b> .....	<b>35</b>
2.24.1. Interaktionsstudien zwischen Hrc-Proteinen .....	35
2.24.2. Modifizierung der LexA-Vektoren pMS604 und pDP604: Generierung der Vektoren pMSspe und pDPspe .....	36
<b>2.25. Topologiestudien</b> .....	<b>37</b>
2.25.1. Computergestützte Topologievorhersage von Membranproteinen .....	37
2.25.2. Topologiestudien der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5 .....	37
2.25.3. Experimentelles System .....	37
2.25.4. Herstellung von <i>hrc/hrp</i> -Expressionsplasmiden .....	38
2.25.5. <i>In vitro</i> -Transposition .....	38
2.25.6. Bestimmung der Enzymaktivität der Transposon-Mutanten .....	38
2.25.7. Konstruktion eines neuen Topologie-Reporterplasmids .....	39
<b>2.26. Reinigung des Proteins HrpD5</b> .....	<b>39</b>
2.26.1. Zellernte und Gesamtzellaufschluss .....	39
2.26.2. Reinigung des Fusionsproteins HrpD5-His <sub>6</sub> .....	40
<b>2.27. Bestimmung der Transkriptionsstarts von <i>hrpD5</i> mittels 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR</b> .....	<b>40</b>
2.27.1. RNA-Isolierung aus <i>Xcv</i> .....	40
2.27.2. cDNA-Synthese und 5'-RACE .....	40

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Etablierung eines induzierbaren und regulierbaren Expressionssystems in <i>Xcv</i>.....</b>	<b>42</b>
3.1.1. Expressionsstudien in <i>Xcv</i> : Untersuchung eines Arabinose-induzierbaren Promotors .....	44
3.1.2. Konstruktion eines Kupfer-induzierbaren Expressionsplasmids.....	45
<b>3.2. Konstruktion einer Lon-Protease-Mutante in <i>Xcv</i>.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Deletion des <i>lon</i> -Gens.....	49
3.2.2. Physiologische Charakterisierung der <i>lon</i> -Mutante .....	50
3.2.2.1. UV-Test.....	50
3.2.2.2. Morphologische Charakterisierung .....	51
3.2.3. Einfluss der <i>lon</i> -Mutation auf die Interaktion von <i>Xcv</i> mit resistenten Wirtspflanzen.....	51
3.2.4. Einfluss der <i>lon</i> -Mutation auf die Typ III-Sekretion von Proteinen.....	53
<b>3.3. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine mit Hilfe des <i>lexA</i>-basierenden bakteriellen Dihybridsystems.....</b>	<b>55</b>
3.3.1. Kurze Einführung in das bakterielle Dihybridsystem .....	55
3.3.2. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine .....	57
3.3.3. Modifizierung der Vektoren pMS604 und pDP804 .....	63
<b>3.4. Topologiestudien der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine des Typ III- Sekretionssystems .....</b>	<b>65</b>
3.4.1. Hauptmerkmale der vorhergesagten inneren Membranproteine des Typ III-Sekretionssystems	65
3.4.2. Computergestützte Topologievorhersagen.....	66
3.4.3. Das duale Reportersystem.....	67
3.4.4. Isolierung und Charakterisierung der <i>in vitro</i> -Tn <i>pholac1</i> -Fusionskonstrukte .....	69
3.4.5. Konstruktion und Anwendung des Topologievektors pDT.....	70
3.4.6. Topologieuntersuchungen .....	70
3.4.6.1. HrcR.....	70
3.4.6.2. HrcS.....	72
3.4.6.3. HrcT .....	74
3.4.6.4. HrcU.....	75
3.4.6.5. HrcV.....	77
3.4.6.6. HrpD5.....	78
<b>3.5. Bestimmung des Transkriptions- und Translationsstarts von HrpD5.....</b>	<b>80</b>
3.5.1. Herstellung einer Hexahistidin-Epitop (His <sub>6</sub> )-markierten HrpD5-Variante .....	81
3.5.2. Komplementationstest.....	81
3.5.3. Detektion des His <sub>6</sub> -Epitop-Fusionsproteins .....	82
3.5.4. Reinigung des His <sub>6</sub> -markierten-Fusionsproteins HrpD5.....	83
3.5.5. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von HrpD5.....	84
3.5.6. Bestimmung des transkriptionellen Starts von <i>hrpD5</i> .....	86
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine unter Zuhilfenahme eines <i>lexA</i>-basierenden bakteriellen Dihybridsystems.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2. Topologiestudien .....</b>	<b>95</b>
4.2.1. HrcR.....	97
4.2.2. HrcS .....	100
4.2.3. HrcT.....	101
4.2.4. HrcU.....	102
4.2.5. HrcV.....	103
4.2.6. HrpD5 .....	105

---

<b>4.3. Bestimmung des Transkriptions- und Translationsstarts von HrpD5.....</b>	<b>106</b>
<b>4.4. Etablierung eines in <i>Xcv</i> induzierbaren und vollständig reprimierbaren Vektorsystems.....</b>	<b>111</b>
<b>4.5. Konstruktion einer Lon-Protease-Mutante in <i>Xcv</i>.....</b>	<b>114</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>117</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>130</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> im Interzellularraum der Pflanze.....	7
Abbildung 2: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate, ausgelöst durch <i>Xcv</i> .....	8
Abbildung 3: Modell der hrp-Genregulation (A) und Typ III-Sekretion (B) in <i>Xcv</i> .....	12
Abbildung 4: Klonierungsstrategie zur Generierung des Plasmids pOK $\Delta lon$ .....	33
Abbildung 5: Vektorsystem zur Suche eines positiven Regulators in <i>Xcv</i> .....	42
Abbildung 6: Expression von pBBad22K- <i>hrcN</i> in <i>Xanthomonas</i> 85-10::B35.....	44
Abbildung 7: Einfluss von Glukose auf die Expression von HrcN .....	45
Abbildung 8: GUS-Aktivität des <i>Xcv</i> -Stamms 85-10(pCOP::GUS) .....	46
Abbildung 9: GUS-Aktivität des <i>Xcv</i> -Stamms 85-10(pCOP::GUS), kultiviert in MA-Medium mit und ohne Casamino-säuren .....	47
Abbildung 10: GUS-Aktivität des <i>Xcv</i> -Stamms 85-10(pCOP::GUS), kultiviert in MA-Medium mit Chelex-100 .....	48
Abbildung 11: Mutation des <i>lon</i> -Gens im Chromosom von <i>Xcv</i> .....	50
Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der 85-10 $\Delta lon$ -Mutante (A) und des <i>Xcv</i> -Wildtypstamms 85E (B).....	51
Abbildung 13: Reaktion von Paprika ECW-10R nach Inokulation mit den <i>Xcv</i> -Stämmen 85-10, 85-10 $\Delta lon$ (A) und 85*, 82* $\Delta lon$ (B) und von ECW-30R nach Inokulation mit den <i>Xcv</i> -Stämmen 82* und 82* $\Delta lon$ (C).....	52
Abbildung 14: Western Blot-Analyse der <i>in vitro</i> -Sekretionsanalysen von 85* $\Delta lon$ und 82* $\Delta lon$ .....	54
Abbildung 15: Schematische Darstellung des bakteriellen Dihybridsystems im Reporterstamm SU202.....	56
Abbildung 16: Expression der B2H-pMS- und pDP-Derivate im <i>E. coli</i> -Stamm SU202 .....	61
Abbildung 17: Das Fusionsprotein HrcN-LexA, exprimiert von den Vektoren pMSspe und pDPspe .....	64
Abbildung 18: Struktur des Transposons <i>Tnpholac1</i> im Vektor pM .....	68
Abbildung 19: Ausfärbung der Kolonien auf dualen Indikatorplatten .....	69
Abbildung 20: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcR .....	72
Abbildung 21: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcS .....	73
Abbildung 22: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcT in Anlehnung an die Vorhersagen .....	75
Abbildung 23: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcU.....	76
Abbildung 24: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcV.....	78
Abbildung 25: Zweidimensionales Topologiemodell von HrpD5 .....	80
Abbildung 26: Komplementation einer <i>hrpD5</i> -Deletionsmutante durch eine His <sub>6</sub> -Epitop-markierte Version von HrpD5 auf ECW-10R .....	82
Abbildung 27: HrpD5-His <sub>6</sub> konnte mit einem $\alpha$ -Penta-His-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden .....	83
Abbildung 28: SDS-PAGE (10 %-ig) der Reinigungsfraktionen 10-39.....	84
Abbildung 29: PVDF-Membran der konzentrierten Fraktionen 17-32 des gereinigten HrpD5-His <sub>6</sub> -Proteins.....	86



Abbildung 30: Bestimmung des Transkriptionsstart von <i>hrpD5</i> mittels 5'-RACE.....	87
Abbildung 31: Schematische Darstellung des bakteriellen flagellaren Typ III-Exportapparates mit möglichen Interaktionspartnern.....	93
Abbildung 32: Zweidimensionale Topologiemodelle der sechs untersuchten inneren Membranproteine des TTSS von <i>Xcv</i> .....	96
Abbildung 33: Sequenzvergleich des HrcR-Proteins aus <i>Xcv</i> mit YscR aus <i>Y. pestis</i> ...	99
Abbildung 34: Sequenzvergleich des HrcS-Proteins aus <i>Xcv</i> mit HrpU aus <i>R. solanacearum</i> .....	101
Abbildung 35: Sequenzvergleich des HrcU-Proteins aus <i>Xcv</i> mit YscU aus <i>Y. pestis</i> .	103
Abbildung 36: Sequenzvergleich des HrcV-Proteins aus <i>Xcv</i> mit YscV aus <i>Y. pestis</i> .	105
Abbildung 37: Zweidimensionales Topologiemodell von (A) HrpD5 und (B) des N-terminal verkürzten HrpD5-Proteins .....	108
Abbildung 38: Ausschnitt des Aminosäure-Alignments homologer HrpD5-Proteine fünf verschiedener Xanthomonaden.....	110
Abbildung 39: Ausschnitt des Alignments der Nukleotidsequenz homologer <i>hrpD5</i> -Gene fünf verschiedener Xanthomonaden.....	110

### Tabellen:

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide .....	21
Tabelle 2: Test der Proteine (exprimiert vom Vektor pMS604) auf Homodimerisierung .....	58
Tabelle 3: Test der Proteine (exprimiert von den Vektoren pMS604 und pDP804) auf Heterodimerisierung .....	60
Tabelle 4: Auswertung der Western Blot-Analysen.....	62
Tabelle 5: Hauptmerkmale der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	66
Tabelle 6: Vorhersagen fünf unterschiedlicher Computerprogramme zur Topologie von Membranproteinen.....	67
Tabelle 7: Vorhersage der Topologie von HrcR.....	71
Tabelle 8: Vorhersage der Topologie von HrcS.....	72
Tabelle 9: Vorhersage der Topologie von HrcT.....	74
Tabelle 10: Vorhersage der Topologie von HrcU .....	75
Tabelle 11: Vorhersage der Topologie von HrcV .....	77
Tabelle 12: Vorhersage der Topologie von HrpD5 .....	79
Tabelle 13: Vorhersage der Topologie von HrpD5 und HrpD5 (verkürzt) .....	109

---

## Liste der Abkürzungen

Ap:	Ampicillin
AS:	Aminosäure
<i>avr</i> , Avr:	Avirulenz
bp:	Basenpaare
cfu:	„colony forming units“, Einzelklone
$\beta$ -Gal:	$\beta$ -Galaktosidase
C-Terminus:	Carboxy-Ende
CW:	Zellwand
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleotid
DTT:	Dithiothreitol
ECW:	„Early Californian Wonder“
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
Gm:	Gentamycin
GUS:	$\beta$ -Glucuronidase
<i>hpa</i> , Hpa:	„hrp associated“
HR:	hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i> , Hrc:	„hrp conserved“
<i>hrp</i> , Hrp:	„hypersensitive response and pathogenicity“
IM:	innere Membran
kb:	Kilobasen
kDa:	Kilodalton
Km:	Kanamycin
min:	Minute
N-Terminus:	Amino-Ende
OD <sub>600</sub> :	optische Dichte, bei einer Wellenlänge von 600 nm
OM:	äußere Membran
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR:	„polymerase chain reaction“
PhoA:	alkalische Phosphatase
PIP:	„plant inducible promoter“
PM:	Plasmamembran.
pv.:	Pathovar
Rf:	Rifampicin
RNA:	Ribonukleinsäure
s:	Sekunde
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
spp.:	Subspecies
Tc:	Tetracyclin
TMS:	transmembranes Segment
TTSS:	„type III secretion system“
U:	Unit
WT:	Wildtyp
w/v:	„weight per volume“, Gewichtsprozent
(v/v):	„volume per volume“, Volumenprozent

Xop: „*Xanthomonas* outer protein”  
Yop: „*Yersinia* outer protein”

### Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

## 1. Einleitung

Tier- und pflanzenpathogene Bakterien haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um ihre Wirtsorganismen zu infizieren. Essentiell für die Pathogenität vieler Gram-negativer Bakterien ist ein Typ III-Sekretionssystem, welches Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert und diese dann zum Vorteil des Pathogens modifiziert. Hierbei beschreibt die Translokation den Transport eines Proteins durch eine biologische Membran. Der Begriff Sekretion dagegen definiert den Transport eines Proteins aus der Zelle hinaus. Der Export wiederum meint den Transport eines Proteins vom Zytoplasma in den periplasmatischen Raum eines Gram-negativen Bakteriums oder im Falle Gram-positiver Bakterien in das Medium.

### 1.1. Proteinsekretionssysteme Gram-negativer Bakterien

In Gram-negativen Bakterien gibt es sechs Hauptgruppen von Sekretionssystemen, die Proteine über die innere und äußere Bakterienmembran transportieren.

Hierunter fallen vier Systeme, die Proteine zunächst mit Hilfe des Sec-Systems durch die innere Membran exportieren. Das Sec-System erkennt zu transportierende Proteine an einer kurzen, hydrophoben N-terminalen Signalsequenz. Dieses Signal ist beim Proteintransport behilflich und wird durch eine periplasmatische Signalpeptidase abgespalten, sobald das Protein das Periplasma erreicht hat (Driessen *et al.*, 1998; Hueck, 1998).

Zu den vier direkt Sec-abhängigen Systemen gehören Autotransporter, das „Chaperon/usher“-, das Typ II- und das Typ IV-Sekretionssystem.

Autotransporter (Henderson *et al.*, 1998) gelangen über das Sec-System in das Periplasma. Für den Transport durch die äußere Membran enthalten sie selbst eine Domäne, die den Transportkanal aufbaut. Diese befindet sich C-terminal und bildet eine  $\beta$ -Fass-Struktur aus. Der Rest des Proteins, die N-terminale sogenannte „Passagier“-Domäne, wird vermutlich durch den Kanal geschleust und oft durch Proteolyse freigesetzt. Dieser Vorgang benötigt keine Energie. Eine Variation dieses Transportweges stellt das „two partner secretion system“ (TPS-System) dar (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001), das die Funktion des Autotransporters auf zwei Proteine

---

aufteilt. Die Mitglieder der TpsA-Proteinfamilie besitzen hierbei eine N-terminale Sekretionsdomäne, wohingegen Mitglieder der TpsB-Proteinfamilie über eine kanalbildende  $\beta$ -Domäne verfügen. Das zur TpsB-Familie gehörende Protein bildet einen Kanal in der äußeren Membran. Der zugehörige TpsA-Partner wird anhand seiner N-terminalen Sekretionsdomäne erkannt und durch die gebildete Pore sekretiert. Die Gene für Exoprotein und Transporter sind gewöhnlich in einem Operon lokalisiert.

Das „Chaperon/usher“-Sekretionssystem (Thanassi *et al.*, 1998) besteht aus einem Protein in der äußeren Membran („usher“), das einen Transportapparat ausbildet, und einem periplasmatischen Chaperon. Die Untereinheiten des P-Pilus von *E. coli* werden durch dieses System transportiert und zusammengebaut. Der Pilus besteht aus mehreren Untereinheiten, die jeweils über das Sec-System ins Periplasma transportiert werden. Damit die Untereinheiten nicht schon im Periplasma assoziieren, bindet das Chaperon an die C-terminale Dimerisierungsdomäne und geleitet die Untereinheiten zum Transportkanal. Der „usher“ erlaubt somit den Transport von einzelnen aufeinander folgenden Untereinheiten, die erst an der Oberfläche ihre super-helikale Endstruktur einnehmen.

Das komplexer aufgebaute Typ II-Sekretionssystem sekretiert bei Gram-negativen Bakterien extrazelluläre Abbauenzyme und transportiert diese durch einen Kanalkomplex in der äußeren Membran, der von einem Protein der Sekretin-Familie gebildet wird (Sandkvist, 2001). Der Transport über diesen Sekretionsweg erfolgt in zwei Schritten. Die Proteine verfügen über ein N-terminales Signalpeptid, das nach dem Transport durch die innere Membran proteolytisch abgespalten wird. Die Faltung und auch andere Modifikationen der Proteine erfolgen im Periplasma. Wie am Beispiel von *Klebsiella oxytoca* erforscht wurde, besitzt die Pore eine Größe, die den Transport von gefalteten Proteinen ermöglicht (Pugsley *et al.*, 1997).

Im Falle der Typ II-Sekretion ist ein Beispiel beschrieben, bei dem die Translokation über die Plasmamembran nicht Sec-abhängig erfolgt: Bei *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass zwei Phospholipasen nicht mittels des Sec-Systems, sondern des TAT („twin arginine translocation“)-Systems transloziert werden (Voulhoux *et al.*, 2001).

---

Das Typ IV-Sekretionssystem kann sowohl Sec-abhängig als auch Sec-unabhängig Proteine sekretieren (Burns, 2003; Christie, 2001; Fischer *et al.*, 2002). Der Komplex des Sekretionssystems erstreckt sich von der zytoplasmatischen Membran über das Periplasma bis zur äußeren Membran.

Ein alternativer Transport über beide Membranen besteht durch zwei vom Sec-System unabhängige Sekretionssysteme. Proteinen, die durch das Typ I-Sekretionssystem sekretiert werden, fehlt die klassische N-terminale Signalsequenz. Diese Exoproteine benötigen drei Proteine (eine Traffic-ATPase, ein so genanntes Membranfusionsprotein und einen Außenmembranfaktor der TolC-Familie), die einen kontinuierlichen Transportkanal durch die Membran bilden, um sekretiert zu werden. Bei Proteinen, die durch dieses System sekretiert werden, handelt es sich beispielsweise um Toxine, Proteasen oder Lipasen (Andersen, 2003; Binet *et al.*, 1997).

Auch die Substrate des Typ III-Sekretionssystems (TTSS) besitzen keine abspaltbare N-terminale Signalsequenz und werden unabhängig vom Sec-System ins extrazelluläre Medium sekretiert und teilweise sogar über die Wirtszellmembran transloziert (Hueck, 1998). Unter den annähernd 20 Proteinen, die an der Sekretion beteiligt sind, befinden sich mindestens neun Proteine, die zwischen den verschiedenen Bakterienspezies konserviert sind und wahrscheinlich die Kernkomponenten des Sekretionsapparates bilden (He, 1998; Hueck, 1998). In der äußeren bakteriellen Membran befindet sich ein kanalbildendes Protein, das ebenfalls zur Familie der Sekretine gehört, d.h. homolog ist zum äußeren Membranprotein des Typ II-Sekretionssystems (Sandkvist, 2001). Die Proteine der inneren Membran sind homolog zu Komponenten des Flagellumexportapparates (Aizawa, 2001; Hueck, 1998; Macnab, 1999; Young und Young, 2002). Die funktionell nahe Verwandtschaft dieser beiden Systeme konnte durch Sekretion eines Virulenzproteins, der Phospholipase YplA aus *Y. enterocolitica*, mittels des Flagellumexportapparates gezeigt werden (Young und Young, 2002; Young *et al.*, 1999). Außerdem besitzen die TTSS von *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* und *E. coli* auffallende Ähnlichkeiten zu den Flagellumbasalkörpern (Blocker *et al.*, 2001; Kubori *et al.*, 1998; Sekiya *et al.*, 2001; Tamano *et al.*, 2000).

Das TTSS, das erstmals in tierpathogenen Yersinien beschrieben wurde (Michiels *et al.*, 1990), ist beispielsweise verantwortlich für die Sekretion von Yops („*Yersinia outer*

---

proteins“) verschiedener *Yersinia*-Arten (Wattiau *et al.*, 1996) und von Virulenzfaktoren von *Salmonella* und *Shigella* (Allaoui *et al.*, 1992; 1993).

### 1.1.1. Einlagerung der Proteine in die Membran

Der Aufbau eines Sekretionssystems in der inneren Membran erfordert die korrekte Insertion und Faltung der Proteine in die Membran, um einen funktionsfähigen Proteinkomplex zu bilden.

Der Insertionsprozess der einzelnen Proteine entscheidet über die Anzahl und gleichzeitig die Orientierung der transmembranen Segmente, also der Bereiche der Polypeptidkette, die in die Membran eingebettet werden. Während oder kurz nach ihrer Synthese werden die Membranproteine über ein Translokon in die Membran inseriert. Dieser Vorgang wird durch topogene Sequenzen gesteuert, die spezifisch die Insertion des Proteins in die Membran und somit ihre Topologie festlegen.

Der Mechanismus dieser vom N- zum C-Terminus gerichteten Insertion der transmembranen Segmente kann mit der Signal Anchor (SA)-Stop Transfer (ST)-Hypothese erklärt werden (Dalbey *et al.*, 2000; van Geest und Lolkema, 2000). Die SA- und ST-Sequenzen stellen topogene Signale dar, die in der Polypeptidkette polytopischer Membranproteine alternierend auftreten (van Geest und Lolkema, 2000). Sie agieren unabhängig voneinander und in Richtung vom N- zum C-Terminus. Als SA-Sequenz wird hierbei die Orientierung des transmembranen Segments vom Zytoplasma ins Periplasma ( $N_{in}$ - $C_{out}$ ) definiert und als ST-Sequenz dessen Orientierung vom Periplasma ins Zytoplasma ( $N_{out}$ - $C_{in}$ ). Befindet sich die erste hydrophobe Sequenz im Translokon, dient sie als SA-Sequenz und bewirkt die Translokation der nachfolgenden hydrophilen Region ins Periplasma. Das nächste hydrophobe Segment wird als ST-Sequenz erkannt und als transmembranes Segment in die Membran inseriert; der Exportprozess der dazwischenliegenden hydrophilen Region ist somit abgeschlossen (van Geest und Lolkema, 2000).

Neben den hydrophoben Regionen eines Membranproteins dienen noch weitere Merkmale als topogene Signale (Prinz *et al.*, 1998). Positiv geladene Aminosäuren (Lysin und Arginin) in hydrophilen Bereichen können eine Lokalisierung dieses Segmentes im Zytoplasma bewirken. Diese „positive inside“-Regel wurde von Gunnar

---

von Heijne aufgrund statistischer Analysen über die Verteilung geladener Aminosäuren innerhalb zytoplasmatischer und periplasmatischer Segmente in bakteriellen Membranproteinen aufgestellt (von Heijne, 1986; 1992). Dass positive Reste einen Einfluss auf die Topologie ausüben, konnte auch anhand von Mutagenesestudien gezeigt werden (Nilsson und von Heijne, 1990). Einen Einfluss auf die Orientierung des transmembranen Segments in der Membran haben insbesondere positive Reste, die vor oder nach einem Segment auftreten (Yamane *et al.*, 1990). Die Einführung oder Deletion der positiven Aminosäure Lysin ist ausreichend, um die Topologie eines Proteins zu verändern. Die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat scheinen keine grundlegende Bedeutung für die Topologie zu besitzen. Sie kommen in etwa gleich häufig in den unterschiedlichen Bereichen der Polypeptidkette vor (von Heijne, 1986; von Heijne und Gavel, 1988). Sie scheinen nur einen signifikanten Einfluss auszuüben, wenn sie, artifiziell eingeführt, in entsprechend hoher Anzahl und im Cluster auftreten (Nilsson und von Heijne, 1990). Allerdings konnte eine andere Studie zeigen, dass eine negative Aminosäure an der richtigen Position, nämlich angrenzend an eine transmembrane Domäne, sehr wohl einen Einfluss auf die Topologie haben kann (Rutz *et al.*, 1999). Auch konnte festgestellt werden, dass amphipathische Helices in hydrophilen Segmenten zur Verankerung dieser Bereiche im Zytoplasma beitragen können (Seligman und Manoil, 1994).

Ziele einer Topologiebestimmung sind die Ermittlung der Anzahl transmembraner Segmente und ihrer Orientierung in der Membran. Diese strukturellen Informationen sind von großer Bedeutung für die Aufstellung dreidimensionaler Strukturmodelle. Auch für die Planung und Durchführung von Interaktionsstudien und für die daraus ableitbaren Modelle der Suprastruktur eines Membranproteinkomplexes können Topologiestudien wichtige Hinweise liefern.

Die Faltung der Membranproteine kann anhand des „Zwei-Stufen-Modells“ in zwei kinetisch voneinander unterscheidbare Stufen eingeteilt werden (Popot und Engelman, 1990): In der ersten Stufe werden unabhängige, stabile  $\alpha$ -Helices in die Membran eingelagert; in der zweiten Stufe interagieren diese Helices miteinander, um ein funktionelles Membranprotein zu bilden. Ausgelöst und stabilisiert werden die Interaktionen durch van-der-Waals-Kräfte, polare Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen (Popot und



---

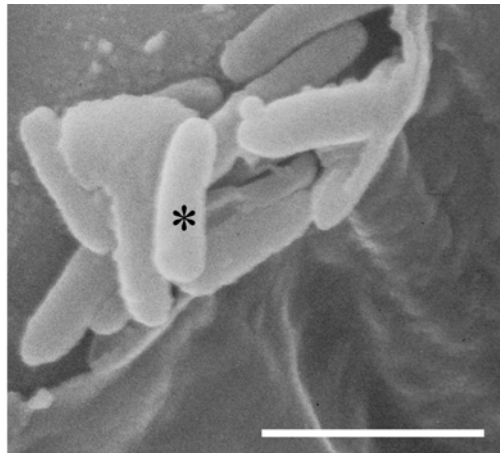
Engelman, 2000). In einer möglichen dritten Stufe wird postuliert, dass bereits in die Membran eingelagerte Helixkomplexe erst die notwendige Umgebung schaffen, um weitere Faltungsschritte und die Ausbildung der Quartärstruktur zu ermöglichen (Engelman *et al.*, 2003).

## **1.2. Das Typ III-Sekretionssystem bei pflanzenpathogenen Bakterien**

Die meisten Gram-negativen pflanzenpathogenen Bakterien verfügen, mit Ausnahme von *Agrobacterium tumefaciens* (Cornelis und Van Gijsegem, 2000) und *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000), über ein Typ III-Sekretionssystem (TTSS). Es wurde bisher unter anderem in *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* und mehreren *Xanthomonas*-Arten beschrieben. Allerdings ist das TTSS nicht nur für die bakterielle Pathogenität verantwortlich, sondern spielt auch bei der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen eine Rolle (Viprey *et al.*, 1998).

### **1.2.1. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* als Modellsystem**

Das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) dient als Modellsystem zum Studium der Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogen. *Xcv* gehört zur Gattung *Xanthomonas*, deren Vertreter ein breites Wirtsspektrum aufweisen. Die Wirtsspezifität spiegelt sich in den Namen der einzelnen Arten oder Pathovaren wider.

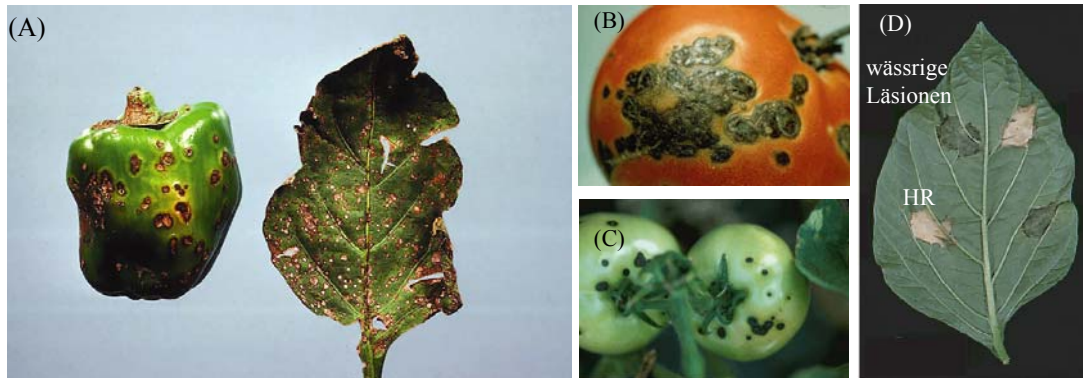


**Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* im Interzellularraum der Pflanze.** Der weiße Balken markiert eine Größe von 2  $\mu\text{m}$ ; \*: markiert ein einzelnes Bakterium der Mikrokolonie; (Foto: Gerd Hause, Biozentrum Halle).

*Xcv* (Abbildung 1) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit in Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Diese Krankheit besitzt vor allem in Klimazonen mit einer feucht-warmen Witterung eine große ökonomische Bedeutung und ist nur schwer zu kontrollieren, da viele Bakterienstämme resistent gegenüber den eingesetzten kupferhaltigen Bakteriziden sind (Stall *et al.*, 1986). Die Bakterien gelangen über Wassertropfen durch natürliche Öffnungen oder Verletzungen in den Interzellularraum der Pflanze (Abbildung 1). Dort können sich die Bakterien, wenn die Pflanze suszeptibel (also anfällig) ist, vermehren, und es kommt zur Ausbildung typischer Krankheitssymptome, den wässrigen Läsionen, die im weiteren Verlauf nekrotisch werden. Abbildung 2(A)-(C) zeigt die äußerlich sichtbaren Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Früchten und Blättern befallener Pflanzen.

Ist die Pflanze resistent, führt die Erkennung des Bakteriums zur Induktion spezifischer Abwehrreaktionen, was zu einem Absterben der Zellen an der Infektionsstelle führt. Das Pathogen wird dadurch an einer weiteren Vermehrung gehindert und bleibt lokal begrenzt. Dieser Vorgang hinterlässt eine Nekrose des pflanzlichen Gewebes, die als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird. Die HR ist unter natürlichen Bedingungen makroskopisch nicht sichtbar. Abbildung 2(D) zeigt den unter

Laborbedingungen entstandenen Phänotyp dieser Krankheit. Hierzu wurden Bakteriensuspensionen hoher Zelldichte in den Interzellularräumen der Pflanzen infiltriert.



**Abbildung 2: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate, ausgelöst durch *Xcv*.** (A) Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Frucht und Blatt einer befallenen Paprikapflanze mit deutlichen nekrotischen Läsionen. (B) und (C) Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Früchten einer befallenen Tomatenpflanze mit deutlichen nekrotischen Läsionen. (D) zeigt eine pflanzliche Reaktion unter Laborbedingungen, die durch Injektion bakterieller Suspensionen hoher Dichte in die Interzellularräume voll entwickelter Blätter hervorgerufen wurde. Angezeigt sind die durch einen virulenten Bakterienstamm verursachte wässrige Läsion und die durch einen avirulenten Stamm induzierte HR.

### 1.2.2. Das Typ III-Sekretionssystem von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

#### 1.2.2.1. Die Organisation und Regulation des *hrp*-Genclusters

In *Xcv* wird das TTSS von einer 23 kb großen chromosomalen Genregion, dem *hrp*-Gencluster (*hrp* für „hypersensitive response and pathogenicity“), kodiert (Rossier *et al.*, 1999). Dieses Gencluster kodiert 22 Gene, die in sechs Transkriptionseinheiten, den Operonen *hrpA* bis *hrpF* (Bonas *et al.*, 1991), organisiert sind (Abbildung 3A).

In diesem Cluster konnten durch DNA-Sequenzanalysen und phänotypische Merkmalsausprägungen nicht-polarer Mutanten drei Genklassen identifiziert werden. Zum einen gibt es die Klasse der *hrp*-Gene, die nicht in allen bakteriellen Pflanzenpathogenen vorkommen, aber essentiell für die Pathogenität des jeweiligen Organismus sind. Eine zweite Klasse beinhaltet die konservierten *hrc*-Gene (*hrc* für

„*hrp* conserved“); in dieser Klasse befinden sich Gene, die zwischen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konserviert sind und deshalb in *hrc*-Gene umbenannt wurden, gefolgt von der Bezeichnung des homologen Gens in Yersinien (Bogdanove *et al.*, 1996). Die dritte Klasse umfasst die *hpa*-Gene (*hpa* für „*hrp* associated“); diese Klasse ist nicht unbedingt notwendig für die Interaktion mit der Wirtspflanze, scheint aber einen modulierenden Einfluss auf die Pathogenität zu haben (Büttner *et al.*, 2004; Huguet *et al.*, 1998). Mutanten in *hrp*- und *hrc*-Genen lösen keine Krankheitssymptome auf suszeptiblen Pflanzen aus und induzieren keine hypersensitive Reaktion (HR) auf resistenten Pflanzen, wohingegen Mutationen in *hpa*-Genen nicht zum vollständigen Verlust der Virulenz führen (Huguet *et al.*, 1998).

Die Sekretion von Proteinen durch das TTSS ist kein konstitutiver Prozess, da die Expression der Gene durch exogene Signale ausgelöst wird. Der Reiz (in Abbildung 3A durch einen Blitz dargestellt) besteht vermutlich im Kontakt des Bakteriums mit der Pflanzenzelle, allerdings konnten noch keine pflanzlichen Moleküle, die diese Aktivierung induzieren, isoliert werden (Marenda *et al.*, 1998). Auch verschiedene Umweltfaktoren wie pH-Wert, Umgebungstemperatur oder Magnesium-Konzentration können zu einer Induktion der Gene führen (Francis *et al.*, 2002). In *Xcv* ist die Induktion des *hrp*-Genclusters *in vitro* durch die Kultivierung der Bakterien in einem definierten Minimalmedium, dem XVM2-Medium, möglich (Wengelnik *et al.*, 1996). Dieses Medium ermöglicht eine effiziente Induktion der *hrp*-Gene und zeigt, dass pflanzliche Moleküle nicht zwingend für die Induktion benötigt werden.

Für die Regulation der *hrp*-Gene sind die Gene *hrpX* und *hrpG*, die sich außerhalb des Clusters befinden, verantwortlich (Abbildung 3A) (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996). HrpG ist ein Transkriptionsaktivator, gehört zur OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Regulatoren (Brito *et al.*, 1999) und dient als positiver Regulator von *hrpA* und *hrpX*. Ein postulierter Sensor, der ein pflanzenspezifisches Signal registriert und HrpG phosphorylieren könnte, konnte noch nicht gefunden werden. Bei HrpX handelt es sich um einen Regulator der AraC/XylS-Familie, der unter anderem die Transkription der Operone *hrpB* bis *hrpF* und einiger *xop*-Gene („*Xanthomonas* *outer proteins*“) (Noël *et al.*, 2001; 2002) aktiviert.

In *Xcv* konnte *hrpG\**, eine mutante Form des *hrp*-Regulators *hrpG*, generiert werden. *hrpG\** ermöglicht eine konstitutive Expression der *hrp*-Gene und unterscheidet sich nur

durch einen einzelnen Aminosäureaustausch (E44K) vom Wildtyp (Rossier *et al.*, 1999; Wengelnik *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die E44K-Mutation im N-Terminus von HrpG den vermuteten phosphorylierten Zustand des Proteins nachahmt (Wengelnik *et al.*, 1999). Viele HrpX-regulierte Gene besitzen im Promotorbereich eine so genannte PIP-Box (“Plant Inducible Promoter“). Es handelt sich um ein konserviertes Promotorelement mit der Konsensussequenz TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC, das möglicherweise eine Bindestelle für HrpX darstellt (Fenselau und Bonas, 1995; Noël *et al.*, 2002; Wengelnik und Bonas, 1996). Sequenzen, die der PIP-Box ähneln, wurden neben *Xcv* auch in anderen Xanthomonaden gefunden (da Silva *et al.*, 2002; Fenselau und Bonas, 1995; Salanoubat *et al.*, 2002). Allerdings wurden bei *Xcv* auch einige durch HrpX kontrollierte *xop*-Gene entdeckt, die keine PIP-Box tragen (Noël *et al.*, 2002). Es scheint also noch mindestens einen weiteren Faktor zu geben, der für deren Aktivierung notwendig ist. Trotzdem wird das Modell der HrpX-Bindung an die PIP-Box weiterhin favorisiert. Dies bestätigen auch neue Erkenntnisse über das HrpX-Homolog HrpB in *R. solanacearum*. Durch Sequenzanalysen von HrpB-regulierten Genen wurde ein der PIP-Box sehr ähnliches Motiv gefunden, die *hrpII*-Box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) (Cunnac *et al.*, 2004).

Bezüglich der Organisation und Regulation des *hrp*-Genclusters lassen sich pflanzenpathogene Bakterien in zwei Gruppen einteilen: Gruppe I beinhaltet die Pathogene *Pseudomonas syringae* und *Erwinia amylovora*, Gruppe II *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas* spp. (Alfano und Collmer, 1997). Die Regulation des *hrp*-Genclusters erfolgt in beiden Bakterien auf unterschiedliche Weise. Während die Regulation in *R. solanacearum* der von *Xanthomonas* zu gleichen scheint (HrpG und HrpX besitzen eine hohe Ähnlichkeit zu den *hrp*-Aktivatoren HrpG und HrpB von *R. solanacearum*), erfolgt die Regulation in Bakterien der Gruppe I über HrpL, einen alternativen Sigma-Faktor der ECF-Familie. Die Expression von *hrpL* wird in *P. syringae* durch HrpR und HrpS, Mitglieder der NtrC-Familie transkriptioneller Aktivatoren, sowie RpoN, einem alternativen Sigma-Faktor, kontrolliert (Hendrickson *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001). In *E. amylovora* wird die Expression von *hrpL* durch eine regulatorische Kaskade kontrolliert. Diese besteht aus HrpS sowie HrpX und HrpY, dem Sensor und Aktivator eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems (Wei *et al.*, 2000).

---

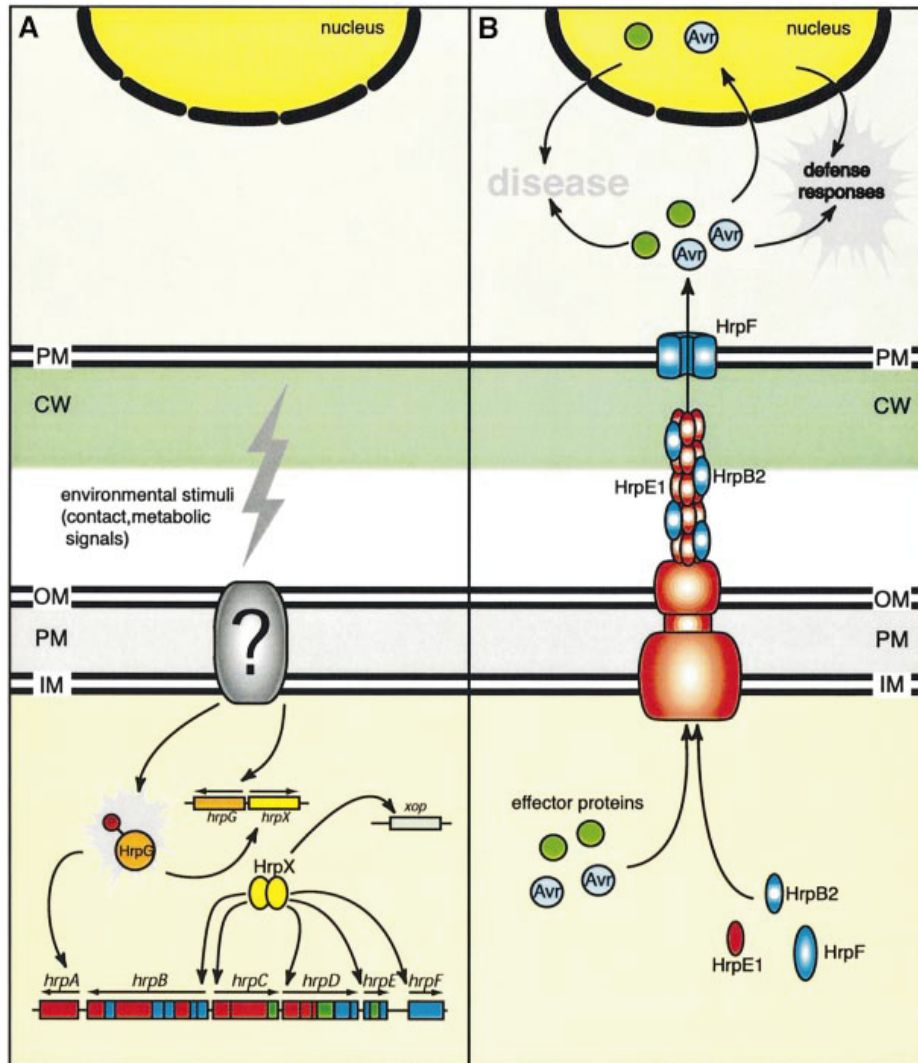
Zusätzlich wird die Expression der *hrp*-regulierenden Gene und die Typ III-Sekretion in *P. syringae* negativ durch die ATP-abhängige Lon-Protease kontrolliert, die durch Proteolyse das HrpR-Level reguliert (Bretz *et al.*, 2002). *lon*-Mutanten zeigen daher einen sich sehr schnell entwickelnden Krankheitsverlauf auf der Pflanze und sekretieren verstärkt das Avirulenzprotein AvrPto und andere Effektorproteine. Wie der durch Lon vermittelte Abbau von HrpR reguliert wird, konnte noch nicht geklärt werden, aber die Protease spielt eine signifikante Rolle in der Regulation der Pathogenese und des TTSS in *P. syringae*.

Für die tierpathogenen *S. enterica*-Stämme wird angenommen, dass die Lon-Protease an der Regulation der Flagellumsynthese beteiligt ist, da in Mutanten eine Überproduktion des Flagellumproteins vorliegt (Tomoyasu *et al.*, 2002). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Lon-Protease die Invasion epithaler Zellen und die Expression von Invasionsgenen negativ beeinflusst (Boddicker und Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2002).

Bei *Y. pestis* dagegen wird in Lon-Mutanten kein funktionelles TTSS ausgebildet. Zu einem Aufbau des TTSS kommt es erst nach dem temperatursensitiven Abbau des Proteins YmoA. In Lon-Mutanten ist YmoA dagegen auch bei höheren Temperaturen stabil und wird nicht abgebaut. Auch die Sekretion der Effektorproteine nahm in den Lon-Mutanten ab und nicht wie in den vorhergehenden Beispielen zu (Jackson *et al.*, 2004).

#### **1.2.2.2. Der Aufbau des Typ III-Sekretionssystems in *Xcv***

Unter den annähernd 20 Proteinen, die in die Typ III-Sekretion involviert sind, sind neun von ihnen innerhalb der pflanzenpathogenen Bakterien konserviert und bilden wahrscheinlich die Kernkomponente eines funktionellen Sekretionsapparates (He, 1998; Hueck, 1998), wie er in Abbildung 3(B) dargestellt ist.



**Abbildung 3: Modell der hrp-Genregulation (A) und Typ III-Sekretion (B) in *Xcv* (Büttner und Bonas, 2002).** (A) Durch einen bislang unbekanntem Reiz (durch einen Blitz gekennzeichnet) wird wahrscheinlich ein bislang unbekanntes Signaltransduktionssystem (Fragezeichen) aktiviert, das das Signal an HrpG weiterleitet. HrpG aktiviert die Expression von *hrpA* und *hrpX*, HrpX wiederum die Expression der Operone *hrpB-hrpF* sowie einiger *xop*-Gene („*Xanthomonas outer proteins*“). Das *hrp*-Cluster besteht aus *hrp*-, *hrc*-, und *hpa*-Genen (dargestellt jeweils in blau, rot und grün).

(B) Die Expression der *hrp*-Gene ist essentiell für die Bildung des Typ III-Apparates, der beide bakteriellen Membranen durchspannt und die Sekretion bestimmter *hrp*- und Effektorproteine vermittelt. Der Typ III-Apparat ist vermutlich assoziiert mit dem Hrp-Pilus, der die pflanzliche Zellwand durchspannt (Hu *et al.*, 2001). Die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus ist HrpE. Die Translokation der Effektorproteine durch die pflanzliche Plasmamembran wird durch HrpF ermöglicht, das wahrscheinlich eine Pore in der Wirtszellmembran formt. Die Effektorproteine modifizieren zelluläre Prozesse des Wirts, die dann zur Ausbildung der typischen Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen führen. In resistenten Pflanzen können bestimmte Effektorproteine (sogenannte Avr-Proteine) erkannt werden und lösen die Abwehrreaktion der Pflanze aus. CW: Zellwand; IM: innere Membran; OM: äußere Membran; PM: Plasmamembran.

Bei *Xcv* wird davon ausgegangen, dass in der inneren Membran ein aus mehreren verschiedenen Hrc-Proteinen zusammengesetzter multimerer Komplex gebildet wird (Rossier *et al.*, 2000). Zu den Kernkomponenten des Sekretionsapparates gehören die vorhergesagten inneren Membranproteine HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5. Die Proteine HrcL, HrcN und HrcQ stellen laut bioinformatischer Analyse zytoplasmatische Proteine dar. Weiterhin sind HrcJ, ein mutmaßliches Lipoprotein, sowie das außenmembranständige Sekretinprotein HrcC am Aufbau des TTSS beteiligt. HrcR/S/T zählen zu Proteinen der YscR/S/T-Familie. Diese Proteine entsprechen in ihrer Homologie den Flagellumproteinen FlhP/Q/R, die vermutlich in der inneren bakteriellen Membran den zentralen Kanal im Exportapparat bilden (Aizawa, 2001).

Mitglieder der YscU- und YscV-Familien zeichnen sich untereinander durch sehr hohe Sequenzähnlichkeiten aus und gehören daher zu den am stärksten konservierten Proteinen des Apparates. Beide Proteinfamilien sind an der Bildung des Proteinkomplexes in der inneren Membran beteiligt (Tampakaki *et al.*, 2004).

Das zu HrcU homologe Flagellumprotein FlhB ist möglicherweise für den spezifischen Wechsel verantwortlich, der bestimmt, in welcher Reihenfolge die Substrate vom TTSS sekretiert werden (Williams *et al.*, 1996). FlhB wird proteolytisch an einem konservierten Aminosäuresequenzmotiv (N/P-T-H) gespalten. Dieses Motiv ist in allen FlhB/YscU-Homologen konserviert (Minamino und Macnab, 2000). Bei YscU aus *Yersinia* wurde dokumentiert, dass die durch proteolytische Spaltung entstehenden unterschiedlichen Domänen die Expression und Sekretion von Yops beeinflussen (Edqvist *et al.*, 2003; Lavander *et al.*, 2002).

Zur YscV-Familie gehört neben dem „low calcium response protein“ LcrD (YscV, (Cornelis und Van Gijsegem, 2000)) von *Y. pestis* auch das Invasionsprotein InvA von *S. typhimurium*. Das Flagellumprotein FlhA, das in die Flagellumbiogenese von *E. coli*, aber nicht in die Sekretion von Virulenzkomponenten involviert ist, gehört trotz unterschiedlicher Funktion ebenso zu dieser Familie (Cornelis und Van Gijsegem, 2000; Galan *et al.*, 1992; Plano *et al.*, 1991). Eine spezifische Funktion konnte diesem Protein des Sekretionsapparates allerdings noch nicht zugeordnet werden. Für das FlhA-Protein von *S. typhimurium* konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Sequenzmotiv im N-terminalen Bereich für die Funktion des Proteins erforderlich ist. Es wird vermutet, dass dieses Motiv zwischen zwei transmembranen Domänen im Zytoplasma lokalisiert ist und somit für Interaktionen verantwortlich sein könnte (McMurry *et al.*, 2004). Dieses



Motiv ist unter den Mitgliedern der YscV-Familie konserviert und konnte auch bei HrcV von *Xcv* gefunden werden.

Das *Xcv*-Protein HrpD5 gehört auch zu den inneren Membranproteinen des Sekretionsapparates. Dieses Protein wird trotz der sehr geringen Ähnlichkeit der YscD-Familie, zu der auch HrpW von *R. solanacearum* gehört (Van Gijsegem *et al.*, 2002), zugeordnet. Die Funktion dieser Proteinfamilie ist noch ungeklärt, allerdings sind sie für die Sekretion essentiell (Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 2000; Van Gijsegem *et al.*, 2002).

Die Vertreter der YscL-, YscN- und YscQ-Familien sind zytoplasmatische Proteine. Zu den Mitgliedern der YscN-Familie gehören ATPasen, die ähnlich der  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase ein ATP-Bindemotiv (Walker-Boxen A und B) besitzen. ATP-Hydrolyse-Aktivität konnte für einige Familienmitglieder gezeigt werden; sie scheint an den Oligomerisationsstatus des Proteins gekoppelt zu sein (Akedo und Galan, 2004; Claret *et al.*, 2003; Pozidis *et al.*, 2003)

Das YscL-homologe Protein FliH des Flagellumapparates formt mit FliI, dem YscN-Homolog, einen löslichen Komplex. Durch diese Interaktion wird die ATPase-Aktivität von FliI reduziert, was FliH eine regulatorische Rolle zukommen lässt (Minamino und MacNab, 2000).

In der äußeren Membran wird vermutlich ein oligomerer Komplex durch das Sekretin HrcC gebildet. Es wird angenommen, dass die Komplexe der inneren und äußeren Membran durch das Lipoprotein HrcJ miteinander verbunden werden (Rossier *et al.*, 2000). Ob es sich dabei um eine permanente oder temporäre Kopplung handelt, ist unbekannt.

Mit dem in der bakteriellen Zellhülle befindlichen Komplex ist sehr wahrscheinlich ein sogenannter Hrp-Pilus assoziiert, der sich unter *hrp*-induzierenden Bedingungen ausbildet. Hrp-Pili von *Xcv* haben einen Durchmesser von 8-10 nm und können eine Länge von mehr als 2  $\mu$ m erreichen. Das HrpE-Protein konnte als Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus in *Xcv* identifiziert werden; das Vorhandensein von HrpE ist essentiell für die Typ III-Sekretion (Weber *et al.*, 2004).

So aufgebaut ermöglicht dieses TTSS die Sekretion von Proteinen aus der bakteriellen Zelle heraus. Die Translokation der Proteine in der eukaryotischen Wirtszelle wird durch einen als Translokon bezeichneten Transmembrankanal in der Wirtszelle vermittelt. Für *Xcv* wird angenommen, dass HrpF die Rolle des Translokons übernimmt;

---

es konnte gezeigt werden, dass HrpF in der Lage ist, eine Pore in einer künstlichen Membran zu bilden (Büttner *et al.*, 2002).

### 1.3. Zielstellung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Unter Zuhilfenahme eines *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems (Dmitrova *et al.*, 1998) sollten Interaktionen der konservierten Proteine des Sekretionsapparates untereinander näher charakterisiert werden, um genauere Aussagen über den Aufbau dieses Multiproteinkomplexes zu erhalten.

Außerdem sollten die vorausgesagten integralen Membranproteine (HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5) mit Hilfe des mini-Tn5-Transposonderivates *Tnpholac1* (Alexeyev und Winkler, 2002) hinsichtlich ihrer Membrantopologie untersucht werden. HrpD5 besitzt signifikante Homologien nur zu anderen pflanzenpathogenen Bakterien, hierbei im Besonderen zu *R. solanacearum*. Obwohl es nicht zu den stark konservierten Proteinen des Typ III-Sekretionssystems gehört, ist es essentiell für die Pathogenität von *Xcv* (Huguet *et al.*, 1998). Da durch Untersuchungen des *hrpE*-Operons (E. Weber, unveröffentlichte Daten) Unstimmigkeiten in der Operonstruktur von *hrpD* und *hrpE* zu Tage getreten waren, sollten der Transkriptions- und der Translationsstart von *hrpD5* untersucht werden.

In einem weiteren Projekt sollte für unterschiedliche Untersuchungen ein in *Xcv* induzierbarer und regulierbarer Promotor gefunden werden. Hierfür wurden ein schon in *X. campestris* pv. *phaseoli* etablierter Arabinose-induzierbarer Promotor und ein Kupfer-induzierbarer Promotor für den Test in *Xcv* ausgewählt.

In dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* fungiert die Lon-Protease als negativer Regulator der Typ III-Proteinsekretion. *lon*-Mutanten in *P. syringae* zeigen eine erheblich stärkere Sekretion von Effektor-Proteinen und induzieren schnellere Abwehrreaktionen in resistenten Pflanzen (Bretz *et al.*, 2002). Auch in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte eine negative Regulation der Expressionen von Genen beobachtet werden, die in die Typ III-Sekretion involviert sind (Boddicker und

---

Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2002). Daher sollte der Einfluss der Lon-Protease auf die Aktivität der Typ III-Sekretion in *Xcv* untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Medien und Kulturbedingungen

*Escherichia coli*-Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium (Bertani, 1951) angezogen. *E. coli*-Stämme des bakteriellen Dihybridsystems wurden auf MacConkey-Agarplatten bei 37°C inkubiert (Dmitrova *et al.*, 1998). Die Untersuchungen zur Topologiestudie wurden auf dualen Indikatorplatten durchgeführt (Alexeyev und Winkler, 2002). Den Indikatorplatten wurde zur Phosphatreprimierung der endogenen bakteriellen alkalischen Phosphatase 80 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugefügt.

*Xanthomonas*-Stämme wurden in NYG-Medium (Nutrient/Yeast/Glycerol) (Daniels *et al.*, 1984) oder in MA-Medium (Minimalmedium A) (Ausubel *et al.*, 1996) bei 30°C angezogen.

Die *Xanthomonas*- und *E. coli*-Stämme wurden generell als 7 % (v/v) Dimethylsulfoxid-Stammproben bei -80°C gelagert.

Zur Blau-Weiß-Selektion auf rekombinante Klone mit Hilfe des  $\alpha$ -Komplementationssystems des *lacZ*-Gens (im Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-Topo<sup>®</sup>) wurde den Agarplatten IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosid) und X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid) zugesetzt.

Die Zusammensetzungen der hier genannten Medien können im Anhang 1 eingesehen werden. Für feste Medien wurden 1,5 % Agar zugesetzt, bzw. 1 % für Konjugationsexperimente.

### 2.2. Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung von Bakterien wurden den Medien nach dem Autoklavieren die jeweils benötigten Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt.

Ampicillin (Ap)	100 $\mu$ g/ml in festen Medien 50 $\mu$ g/ml in flüssigen Medien
Gentamycin (Gm)	15 $\mu$ g/ml
Kanamycin (Km)	50 $\mu$ g/ml

---

Rifampicin (Rf)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	10 µg/ml

### 2.3. Puffer

Die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Puffer für molekularbiologische und biochemische Arbeiten sind im Anhang 2 aufgeführt. Alle anderen Puffer wurden von kommerziellen Anbietern mitgeliefert.

### 2.4. Antikörper

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und ihre jeweils eingesetzte Konzentration angegeben:

<b>Antikörper</b>	<b>eingesetzte Verdünnung</b>	<b>Firma/Referenz</b>
$\alpha$ -penta-His	1:2000	Qiagen, Hilden
$\alpha$ -HrcN	1:2000	(Rossier <i>et al.</i> , 1999)
$\alpha$ -HrpF	1:5000	(Büttner <i>et al.</i> , 2002)
$\alpha$ -AvrBs3 („star7“)	1:5000	(Knoop <i>et al.</i> , 1991)
$\alpha$ -LexA	1:5000	Invitrogen

### 2.5. Bakterienstämme und Plasmide

Die nachfolgenden Tabellen führen die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide auf.

Stamm	Beschreibung	Resistenz	Bezugsquelle /Referenz
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>			
85-10	Paprikarasse 2; Gruppe A; Wildtyp	Rif	(Bonas <i>et al.</i> , 1989)
85*	Derivat von 85-10, trägt mutierte, konstitutiv aktive Version von <i>hrpG</i>	Rif	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1999)
85E	<i>gumG</i> ::Tn3- <i>gusA</i> -Insertionsmutante, Derivat von 85-10, <i>hrp</i> <sup>+</sup> , EPS <sup>-</sup>	Rif, Km	(Wengelnik <i>et al.</i> , 1996)
85E*	Derivat von Stamm 85E; trägt chromosomal mutierte, konstitutiv aktive Form von <i>hrpG</i>	Rif, Km	(O. Rossier und U. Bonas; unveröffentlicht)
85-10::B35	Tn3- <i>gus</i> -Insertionsmutante von 85-10; polare Mutation in <i>hrcN</i>	Rif, Km	(Schulte und Bonas, 1992)
85E*Δ <i>hrpD5</i>	Derivat von 85E*; <i>hrpD5</i> -Deletionsmutante, pOKΔ <i>hrpD5</i> ( <i>hrpD5</i> besitzt die ersten und die letzten 400bp des Gens; Deletion von 146 AS)	Rif	E. Weber, (Huguet <i>et al.</i> , 1998)
85-10 Δ <i>lon</i>	Derivat von 85-10; <i>lon</i> -Deletionsmutante	Rif	diese Arbeit
85* Δ <i>lon</i>	Derivat von 85*; <i>lon</i> -Deletionsmutante	Rif	diese Arbeit
82* Δ <i>lon</i>	Derivat von 82*; <i>lon</i> -Deletionsmutante	Rif	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>			
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mcr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Sm	Invitrogen
DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i> )Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galU galK λrpsL nupG</i>	Sm	Bethesda Research Laboratories (MD, USA)
DH5αλpir	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17</i> (r <sub>K-</sub> , m <sub>K+</sub> ) Φ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15[λpir]	-	(Menard <i>et al.</i> , 1993)
SU101	Derivat von JL1434, chromosomales <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Wildtyp-Operators, <i>sulA</i> -Promotor	Km, Cm	(Dmitrova <i>et al.</i> , 1998)
SU202	Derivat von JL1434; chromosomales <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Hybridoperators, <i>sulA</i> -Promotor	Km, Cm	(Dmitrova <i>et al.</i> , 1998)

Plasmid	Beschreibung Relevante Eigenschaften	Resistenz	Bezugsquelle / Referenz
pRK2013	ColE1-Replicon TraRK2 <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> ; Helferplasmid für Konjugation	Km	(Figurski und Helinski, 1979)
pOK1	<i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i>	Spec	(Huguet <i>et al.</i> , 1998)
pCR <sup>®</sup> 2.1- TOPO <sup>®</sup>	LacZ $\alpha$ -Fragment, <i>fl</i> origin, pUC origin	Km, Ap	Invitrogen
pBBR1-MCS5	broad-host-range-Vektor, pBluescript II KS- <i>lacZ</i> $\alpha$ -Polylinker, P <sub>lacZ</sub>	Gm	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pCOP	pB BR1-MCS5 $\Delta$ P <sub>lacZ</sub> ; trägt P <sub>COP</sub> des <i>copA</i> -Gens aus <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ap	diese Arbeit
pBBAD22K	P <sub>BAD</sub> -Promotor, broad-host-range- Vektor; pBR1MCS-4	Km	(Sukchawalit <i>et al.</i> , 1999)
pMS604	LexA <sub>1-87</sub> WT-Fos-Zipper Fusion, ColE1 Replikon	Tc	(Porte <i>et al.</i> , 1995)
pMS-hrcJ	pMS604, <i>hrcJ</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcL	pMS604, <i>hrcL</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcN	pMS604, <i>hrcN</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcQ	pMS604, <i>hrcQ</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcR	pMS604, <i>hrcR</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcR <sub>73-155</sub>	pMS604, <i>hrcR</i> <sub>73-155</sub>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcS	pMS604, <i>hrcS</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcT	pMS604, <i>hrcT</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcU	pMS604, <i>hrcU</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcU <sub>CN</sub>	pMS604, <i>hrcU</i> $\Delta$ <sub>1-205</sub>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcU <sub>CC</sub>	pMS604, <i>hrcU</i> $\Delta$ <sub>1-264</sub>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcV	pMS604, <i>hrcV</i>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrcV <sub>C</sub>	pMS604, <i>hrcV</i> $\Delta$ <sub>1-326</sub>	Tc	diese Arbeit
pMS-hrpD5	pMS604, <i>hrpD5</i>	Tc	diese Arbeit
pDP804	LexA <sub>1-87</sub> 408-Jun-Zipper Fusion, P15A Replikon	Ap	(Porte <i>et al.</i> , 1995)
pDP-hrcJ	pDP804, <i>hrcJ</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcL	pDP804, <i>hrcL</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcN	pDP804, <i>hrcN</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcQ	pDP804, <i>hrcQ</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcR	pDP804, <i>hrRQ</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcR <sub>73-155</sub>	pDP804, <i>hrcR</i> <sub>73-155</sub>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcS	pDP804, <i>hrcS</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcT	pDP804, <i>hrcT</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcU	pDP804, <i>hrcU</i>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcU <sub>CN</sub>	pDP804, <i>hrcU</i> $\Delta$ <sub>1-205</sub>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcU <sub>CC</sub>	pDP804, <i>hrcU</i> $\Delta$ <sub>1-264</sub>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrcV	pDP804, <i>hrcV</i>	Ap	diese Arbeit

pDP-hrcV <sub>C</sub>	pDP804, <i>hrcV</i> <sub>Δ1-326</sub>	Ap	diese Arbeit
pDP-hrpD5	pDP804, <i>hrpD5</i>	Ap	diese Arbeit
pMA814	pKNOCK, trägt mini- <i>Tn5</i> -Transposonderivat <i>Tnpholac1</i>	Tc	(Alexeyev und Winkler, 2002)
pBAD24	pBAD-Promotor des Arabinoseoperons, pBR-backbone, MCS3	Ap	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD-hrcT	pBAD24, <i>hrcT</i>	Ap	diese Arbeit
pBAD-hrcU	pBAD24, <i>hrcU</i>	Ap	diese Arbeit
pBAD-hrcV	pBAD24, <i>hrcV</i>	Ap	diese Arbeit
pBAD-hrcR	pBAD24, <i>hrcR</i>	Ap	diese Arbeit
pBAD-hrcS	pBAD24, <i>HrcS</i>	Ap	diese Arbeit
pBAD-hrpD5	pBAD24, <i>hrpD5</i>	Ap	diese Arbeit
pDT	pBAD24, trägt <i>Tnpholac1</i> ΔKm	Ap	diese Arbeit
pIC1	Suizid-Vektor, trägt ein dreifaches <i>c-myc</i> -Epitop gefolgt von einem promotorlosen <i>uidA</i> -Gen (GUS-Gen),	Tc	(Noël <i>et al.</i> , 2001)

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.** Ap: Ampicilin, Gm: Gentamycin; Km: Kanamycin; Spec: Spectinomycin; Tc: Tetracyclin; Rif: Rifampicin; Sm: Streptomycin.

## 2.6. Oligonukleotide

Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang 3.

## 2.7. Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) der Kultivare ECW (Early Californian Wonder)-30R und ECW-10R verwendet.

Die Anzucht der verwendeten Paprikapflanzen erfolgte unter folgenden Bedingungen im Gewächshaus: 60% (Tag) bzw. 40% (Nacht) relative Luftfeuchte, 16h/8h Tag/Nacht-Rhythmus bei einer Temperatur von 25°C. Paprikapflanzen wurden nach der Inokulation in eine Phytokammer (Series 101, Percival Scientific, Perry, Iowa) überführt, in der folgende Bedingungen vorherrschten: 80% relative Luftfeuchte, 16h/8h Tag/Nacht-Rhythmus und eine Temperatur von 28°C (Tag) bzw. 26°C (Nacht).



## 2.8. Inokulation von Pflanzen

Die Inokulationen von sechs bis zehn Wochen alten Pflanzen wurden wie bei Bonas (Bonas *et al.*, 1991) beschrieben durchgeführt. Die zu inokulierenden *Xanthomonas*-Stämme wurden in 1mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 (entspricht ca.  $4 \times 10^8$  Zellen/ml) eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mittels einer 1 ml-Einwegspritze ohne Kanüle in die Unterseite von vollständig entwickelten Blättern infiltriert. Die Reaktionen der Pflanzen auf die Infiltration wurden nach ein bis vier Tagen ausgewertet.

Durch Bleichen der Blätter wird die Unterscheidung von wässrigen Läsionen, partieller HR und HR erleichtert. Dazu wurden die Blätter über Nacht bei 60°C in Ethanol inkubiert, anschließend getrocknet und gescannt.

## 2.9. Polymerase-Kettenreaktion: Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die PCR ("polymerase chain reaction"; (Saiki *et al.*, 1985)) ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen begrenzt werden. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten (PTC-225 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) mit Heizdeckel durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach Standardprotokollen zusammengesetzt. Bei der Amplifizierung von Fragmenten, die anschließend kloniert werden sollten, wurde *Pfu*-Polymerase und der zugehörige *Pfu*-Puffer (Anhang 2) verwendet, um PCR-Fehler zu minimieren. Für diese Reaktion war die Zugabe von 5 % DMSO notwendig.

### 2.9.1. Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung von Bakterienklonen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurde der komplette Reaktionsansatz der PCR (20 µl) vorgelegt. Von der Einzelkolonie wurde mit sterilen Pipettenspitzen ein kleiner Teil abgenommen und in den PCR-Reaktionsansatz überführt. *E. coli*-Zellen können direkt für die Kolonie-PCR verwendet werden. Bei *Xanthomonas* musste zuerst das Xanthan entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden entweder 500 µl von einer *Xanthomonas*-Flüssigkultur genommen oder die auf Agaroseplatten gewachsenen Xanthomonaden wurden in 500 µl 1mM

MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einer kurzen Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit und der Entfernung des Überstandes wurden die Bakterien in 500 µl 1mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und 10 min gekocht. Durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5 bis 10 min wurden Zellbruchstücke und das Xanthan abgetrennt. In Abhängigkeit von der Menge des Zellmaterials wurden 2 bis 5 µl des Überstandes für eine 20 µl-PCR eingesetzt.

## **2.10. Präparation von Plasmid-DNA**

Die Plasmidpräparation erfolgte von 3 ml Kulturvolumen mittels alkalischer Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Zu diesem Zweck wurde das „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) bzw. das „GFX™ Micro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) benutzt. Die Präparation erfolgte nach Herstellerprotokoll.

## **2.11. Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Dazu wurde als Laufpuffer 1xTAE-Puffer (Anhang 2) und als Separationsmatrix in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden DNA 1-2 %-ige (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer mit 0,03 ng Ethidiumbromid/100ml verwendet. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (Image Master VDS, Amersham Pharmacia Biotech). Als Standard wurde ein 1-kb-DNA-Längenstandard von Gibco-BRL (Karlsruhe) verwendet.

### **2.11.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll benutzt.

## **2.12. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen unter Pufferbedingungen nach Herstellerangaben (NEB, Frankfurt; Fermentas, St. Leon-Rot) geschnitten.

### **2.13. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 1U T4-DNA-Ligase für "sticky ends" bzw. mit 5U T4-DNA-Ligase für "blunt ends" und Ligasepuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) über Nacht bei 16°C nach Herstellerangaben. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte 10 min bei 65°C.

### **2.14. Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die Plasmid- und Insert-DNA wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Wenn erforderlich, wurde die DNA danach im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment ausgeschnitten. Für die Ligation wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die nach der Transformation erhaltenen Klone in kompetenten Zellen wurden mittels Kolonie-PCR getestet. Die Plasmid-DNA von positiven Klonen wurde anschließend präpariert, zur nochmaligen Kontrolle mit Restriktionsendonukleasen verdaut und der Verdau auf einem Agarosegel aufgetrennt. In einigen Fällen wurden PCR-amplifizierte Fragmente zunächst in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 des TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Diese Klonierungen erfolgten nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurde das betreffende Fragment mit Restriktionsendonukleasen aus diesen Vektoren ausgeschnitten, über ein Agarosegel gereinigt (wenn notwendig) und in den Zielvektor kloniert.

### **2.15. DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Sequenzreaktion erfolgte im PCR-Thermoblock unter Verwendung des "Big Dye Kit" (PE Applied Biosystems, Warrington, GB) und wurde durch einen arbeitsgruppeninternen Service mit dem ABI 377-Sequenzierautomat (PE Biosystems) ausgewertet. Die so erhaltenen Daten wurden mit der Sequencher<sup>®</sup>-Software (Gene Codes Corporation) analysiert. Der Reaktionsansatz enthielt 2 µl Plasmid-DNA, 2 µl Big Dye Mix und 2 pmol Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 10 µl.

---

Sequenzierprogramm:	1. 94°C 50 s
	2. 94°C 20 s
	3. 55°C 20 s
	4. 60°C 4 min
	5. go to 2, 30x
	6. 10°C

## **2.16. Herstellung transformationskompetenter Zellen**

### **2.16.1. Chemisch kompetente Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode**

Zur Gewinnung chemisch kompetenter Zellen wurde zuerst eine Übernachtskultur des Stammes angesetzt. Von diesem Stamm wurden dann 5 ml LB-Flüssigmedium 1:50 inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 – 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend zehn Minuten auf Eis gekühlt und weitere zehn Minuten zentrifugiert (2500 rpm, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde dann in 1/3 des Ausgangsvolumens in eiskaltem 100mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Danach ruhten die Bakterien eine Stunde auf Eis und wurden anschließend wiederum zehn Minuten zentrifugiert (2500 rpm, 4°C). Das Pellet wurde dann in 1/10 des Ausgangsvolumens in eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis können die Zellen für die Transformation eingesetzt werden.

### **2.16.2. Elektrokompente Zellen**

Als Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie des jeweiligen Bakterienstammes inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 Liter LB-Medium ohne NaCl angeimpft und bei 37°C und mäßigem Schütteln (200-300 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 15 min auf Eis gekühlt und dann 20 min bei 2°C zentrifugiert (Sorvall RC26 Plus, Rotor SLA-3000; 4200 rpm). Der Überstand wurde sofort abgegossen und das Pellet wurde zunächst in 10 ml eiskaltem Bdest resuspendiert, dann wieder auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, beim letzten Mal wurde das Pellet resuspendiert. Die Zellsuspension wurde

dann mit ca. 100 ml 10 %-igem Glycerin gemischt und 10 min (2°C, 4200 rpm) zentrifugiert. Danach wurde das Pelletvolumen geschätzt; hierzu wurden gleiche Volumina von eiskaltem 10%-igem Glycerin dazugegeben. Die Zellen wurden schließlich in 200 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## **2.17. Transfer von DNA in *E. coli*- und *Xanthomonas*-Stämme**

### **2.17.1. Elektroporation**

Plasmide wurden durch Elektroporation in *E. coli* eingeführt. Hierzu wurden in eisgekühlte 2-mm-Elektroporationsküvetten 2,5 µl Ligationsansatz pipettiert, mit 50 µl der kompetenten Zellen gemischt und kurz auf Eis inkubiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls ( $U = 2500 \text{ V}$ ,  $c = 25 \text{ mF}$ ,  $R = 200$  und  $t = 5 \text{ ms}$ ) wurden 250 µl 37°C warmes SOC-Medium (Anhang 1) hinzupipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit selektiven Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.17.2. Transformation mittels $\text{CaCl}_2$**

2,5 µl Ligationsansatz wurden mit 100 µl chemisch kompetenten Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (75 Sekunden) bei 42°C im Wasserbad. Das Gemisch ruhte zehn Minuten auf Eis, wurde dann mit 400 µl SOC-Medium gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. 100 µl wurden anschließend auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.17.3. Triparentale Konjugation von *Xanthomonas***

Plasmide wurden durch Konjugation in *Xanthomonas* eingeführt (Bonas *et al.*, 1989). Hierbei wurde das gewünschte Plasmid aus *E. coli* in *Xanthomonas* übertragen. Das Plasmid pRK2013 im Stamm MM294 dient als Helferplasmid, da es die notwendige Tra-Region für den Transfer trägt. Die drei Stämme wurden auf entsprechenden Nährmedien

angezogen. Von jedem Stamm wurden ca. 5 x 10 mm Bakterienrasen von der Platte abgenommen, in 500 µl NYG-Medium (Anhang 1) resuspendiert und wie folgt gemischt: 50 µl Rezipient, 10 µl Donor und 10 µl Helfer. 50 µl von diesem Mix wurden auf eine NYG-Platte (1% Agar) aufgetropft und unter einer Sterilbank leicht getrocknet. Die Platte wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterien wurden wiederum von der Platte abgenommen und in 500 µl NYG-Medium resuspendiert. Hiervon wurden 50 µl abgenommen und auf selektivem NYG-Medium ausplattiert. Einzelklone von Konjuganden wurden nach zwei bis drei Tagen ausgewertet.

### **2.18. Bestimmung der $\beta$ -Glucuronidase(GUS)-Aktivität**

Das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) katalysiert die Spaltung der  $\beta$ -glycosidischen Bindung des Substrats 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG). Dabei wird das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (4-MU) freigesetzt, dessen Menge mittels fluorimetrischer Messung gegen einen Standard ermittelt werden kann (Jefferson *et al.*, 1987). Für die Bestimmung der GUS-Aktivität wurden Xanthomonaden verwendet, die in Vollmedium angezogen wurden und die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Von den Übernachtskulturen wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg). Danach wurden pro Stamm zweimal 200 µl abzentrifugiert. Nach der Resuspendierung der Pellets in 25 µl MUG-Puffer (mit 1 mM MUG-Substrat) wurden die Reaktionsansätze 45 min bis 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 20 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und 180 µl Stopp-Puffer (GUS) zugegeben. Bei der fluorimetrischen Messung (Spectrafluor Plus und easyWIN screening 6.0a software, TECAN, Männedorf, Schweiz) wurden 200 µl 4-MUG-Standard (10 mM 4-MU) in einer Verdünnung 1:10000 eingesetzt. Die GUS-Aktivität wurde nach den unten aufgeführten Formeln berechnet. Eine GUS-Einheit (U) ist definiert als 1 nmol produziertes 4-Methylumbelliferon pro Minute und pro Bakterium.

$$GA = A\% \times 250 / OD_{600} \times t$$

$$A\% = (WP - WH) / (WS - WH)$$

GA: GUS-Aktivität in Units/10<sup>10</sup> cfu

A%: Prozent Aktivität verglichen mit dem GUS-Standard

WP: Fluoreszenzwert der Probe

WH: Fluoreszenzwert des Plattenhintergrundes

WS: Fluoreszenzwert des Standards

t: Reaktionszeit in Minuten

OD<sub>600</sub>: OD der Probe

## 2.19. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinanalyse wurden die Proben nach ihrer Aufbereitung in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen, auf ein 10-15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgeladen und im Laufpuffer mit 80–120 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt, um Aufschluss über die Beladung des Gels zu erhalten, oder in einer Western Blot-Analyse eingesetzt. Als Molekulargewichtsstandard diente ein vorgefärbter Standard (BenchMark™ Pre Stained Protein Ladder, Invitrogen). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang 2 aufgelistet.

## 2.20. Western Blot-Analyse

Für den Western Blot wurden die Proteine nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE in einer Transferkammer (Modell TE22, Amersham Pharmacia Biotech) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran® 0,22 µm, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) überführt. Der Transfer erfolgte im CAPS-Puffer für 1 h bei 250 mA und anschließend 30 min bei 300 mA bei jeweils 4°C.

Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu reduzieren, wurden die Membranen anschließend für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3 % Milchpulver-Lösung (Roth, Karlsruhe) in 1x TBST-Puffer blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Vor der Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur) wurden die Membranen 2 x 10 min in 1x TBST gewaschen.

Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Membranen 3 x 10 min in 1x TBST gewaschen. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich stets um das entsprechende Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, dessen Detektion nach der Inkubation der Membran mit der ECL-Lösung für eine Minute möglich wurde. Die Belichtung eines Films (Biomax light 1- Film, Eastman Kodak, Rochester) erfolgte durch Photonenemission. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösung und Puffer ist im Anhang 2 aufgeführt.

### **2.20.1. Elektroblothing von Proteinen für die Proteinsequenzierung**

Die Proteine wurden wie oben beschrieben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Der Transfer erfolgte auf eine vorbehandelte PVDF-Membran (Trans-Blot® Transfer Medium) für 1 h bei 250 mA und 30 min bei 300 mA bei jeweils 4°C. Die Membran wurde vor dem Transfer 3 x 10 s mit Methanol („gradient grade“) gewaschen und anschließend 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Als Transferpuffer wurde CAPS-Puffer verwendet. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit Coomassie-Lösung für 2-5 s gefärbt, anschließend in einer Lösung (40 % Methanol („gradient grade“), 10 % Essigsäure (pA), 50 % Wasser) entfärbt und getrocknet. Für die Herstellung des CAPS-Puffers und der Coomassie-Lösung wurde Methanol („gradient grade“) der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Für die N-terminale Sequenzierung wurde die komplette Membran eingesandt.

### **2.21. *In vitro*-Sekretionstest**

Der Sekretionstest (Rossier *et al.*, 1999) ermöglicht die Detektion der *hrp*-abhängigen Sekretion von Proteinen durch *Xanthomonas*-Stämme, welche die *hrp*-Gene konstitutiv exprimieren (*hrpG*\*-Stämme). Die von Rossier *et al.* definierten Bedingungen wurden mit Ausnahme der Absenkung des pH-Werts des Sekretionsmediums von pH 5,4 auf pH 5,2 kaum modifiziert. In Minimalmedium (MA) pH 7,0 mit halber Antibiotikakonzentration bei 30°C über Nacht angezogene *Xanthomonaden* wurden in MA-Medium (pH 5,2) überimpft (ohne Antibiotika), das 50 µg/ml BSA (New England Biolabs, Beverly, MA) enthielt. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 0,15 eingestellt. Im Anschluss an eine dreistündige Inkubation bei 30°C wurden 0,5 ml Gesamtkultur sowie 2 ml zellfrei



filtrierter Überstand mit 1/10 Volumen Trichloressigsäure für mindestens 30 min auf Eis gefällt. Die Filtration erfolgte mit einem 0,45 µm-Filter (niedrige Protein-Bindekapazität; HT Tuffryn, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 rpm in einer Minizentrifuge (Eppendorf) wurden Präzipitat und Überstand voneinander getrennt. Nach dem Waschen der Pellets mit –20°C kaltem Ethanol und erneuter Zentrifugation wurde die Gesamtkultur (d.h. der Totalextrakt) in 50 µl und der Überstand in 20 µl 2xLaemmli-Puffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Von diesen Proben wurden jeweils 10 µl des Totalextraktes und 16 µl des Überstandes auf ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Um lysierte Zellen im Überstand auszuschließen, werden die nachfolgenden Western Blot-Analysen auch mit einem HrcN-spezifischen Antikörper behandelt. Die ATPase HrcN ist ein zytoplasmatisches Protein, das nicht sekretiert wird.

## **2.22. Konstruktion eines Plasmids mit induzierbarem Promotor in *Xcv***

### **2.22.1. Untersuchungen eines Arabinose-induzierbaren Promotors**

Der Expressionsvektor pBBAD22K (Sukchawalit *et al.*, 1999) sollte genutzt werden, um mittels Induktion mit L-Arabinose gezielt ein Gen in *Xanthomonas* exprimieren zu können. Das Plasmid trägt den P<sub>BAD</sub>-Promotor des Arabinoseoperons und das regulatorische Gen *araC*. Als Kontrolle wurde *hrcN* (Primerkombination pBBAD22K-hrpB6-5'- pBBAD22K-hrpB6-3') aus genomischer DNA des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert, in pBAD22K kloniert (Schnittstellen XbaI-HindII) und in den *Xanthomonas*-Stamm 85-10::B35, eine polare *hrcN*-Mutante (Schulte und Bonas, 1992), konjugiert. Es folgten Induktionen mit unterschiedlichen Arabinose- und Glukosekonzentrationen. Hierzu wurden jeweils 5 ml Flüssigkulturen mit 1 % Glukose aus Übernachtskulturen (mit NYG-Medium gewaschen) frisch inokuliert (OD<sub>600</sub> 0,1). Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3 wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, mit NYG-Medium gewaschen, resuspendiert und mit folgenden Konzentrationen induziert: Arabinose 0 %, 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %; Glukose 0 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 %. Die Kulturen wurden nach ca. 3 h geerntet, in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt. Daran anschließend erfolgte eine SDS-PAGE und Western Blot-

Analyse mit dem primären Antikörper  $\alpha$ -HrcN. Als sekundärer Antikörper diente anti-rabbit (1:10000).

### **2.22.2. Versuche zur Konstruktion eines kupferinduzierbaren Expressionsplasmids**

Mit Hilfe der Primer copper-promoter-5' und copper-promoter-3' wurden ca. 500 bp stromaufwärts des Kupferresistenzgens *copA* aus genomischer DNA des *Xanthomonas*-Stammes 85-10 amplifiziert, wobei in das 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Fragments eine *VspI*- bzw. *KpnI*-Schnittstelle eingeführt wurde. Der Bereich wurde nach einem Sequenzvergleich mit verschiedenen Xanthomonaden und anhand einer Sequenzanalyse von *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Lee *et al.*, 1994) ausgewählt.

Für diesen Versuch wurde der broad-host-range-Vektor pBBR1-MCS5 (Gm<sup>R</sup>) (Kovach *et al.*, 1995) verwendet. Der ursprüngliche Promotor P<sub>lac</sub> wurde mittels der Restriktionsenzyme *VspI* und *KpnI* vollständig entfernt. Das amplifizierte Promotorfragment P<sub>cop</sub> des *copA*-Gens wurde ebenfalls mit *VspI* und *KpnI* verdaut und anstelle des *lac*-Promotors kloniert. Im Anhang 5 ist die Vektorkarte des neu entstandenen Plasmids pCOP dargestellt.

Um die Aktivität und Induzierbarkeit des Promotors zu kontrollieren, wurde das *uidA*(GUS)-Gen in den Vektor pCOP kloniert. Das Gen wurde hierfür aus dem Vektor pIC1 mit Hilfe der Primer GUS(aus pIC1)-5' und GUS(aus pIC1)-3' amplifiziert, dabei wurde in das 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Fragments eine *KpnI*- bzw. *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Das Vektorkonstrukt pCOP-GUS wurde mittels triparentaler Konjugation in den *Xanthomonas*-Stamm 85-10 konjugiert.

## **2.23. Herstellung einer *lon*-Mutante in *Xcv***

### **2.23.1. Einführung einer Deletion in *Xcv* mittels homologer Rekombination**

In den *Xanthomonas*-Stämmen 85-10, 85\* und 82\* sollte jeweils das *lon*-Gen deletiert werden. Das *lon*-Gen wurde hierfür mit Hilfe des Suizidvektors pOK1 (Huguet *et al.*, 1998) durch homologe Rekombination gegen eine mutierte Version ausgetauscht.

Der Vektor pOK1 enthält zum einen ein Gen, das für die Spectinomycin-Resistenz kodiert, zum anderen das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*.

Um das Gen im Chromosom von *Xanthomonas* zu deletieren, wurden 1048 bp stromauf- und 1025 bp stromabwärts des *lon*-Gens mittels der Primerkombinationen *lon*-delta-right-5'-*lon*-delta-right-3' und *lon*-delta-left-5'-*lon*-delta-left-3' amplifiziert (Abbildung 4).

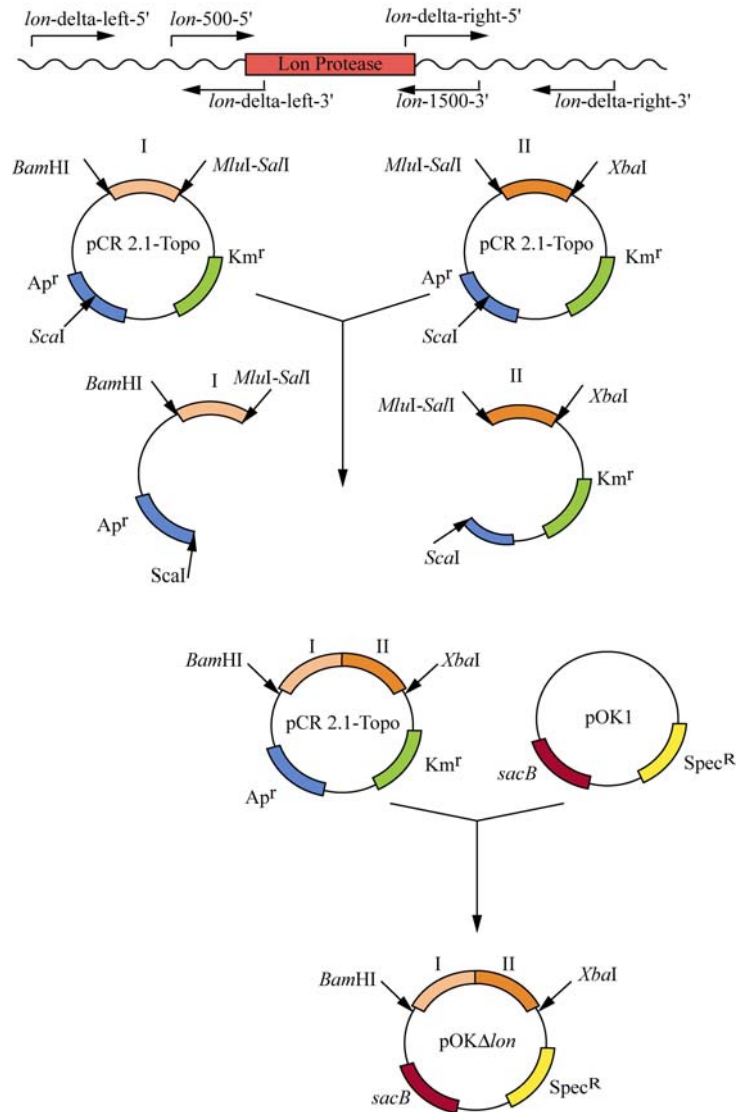
Die beiden amplifizierten Fragmente wurden dann jeweils in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Die daraus resultierenden Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *SacI* verdaut. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden dann wieder zu einem vollständigen pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor ligiert. Der offene Leserahmen des *lon*-Gens ist somit bis auf 66 bp im 5'- und 111 bp im 3'-Bereich deletiert. Nach der Präparation der Plasmid-DNA wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Xba*I verdauten Suizidvektor pOK1 kloniert.

Das Plasmid pOK $\Delta$ *lon* wurde dann jeweils in die *Xanthomonas*-Stämme 85-10, 85\* und 82\* konjugiert. Das mutierte Gen wurde durch homologe Rekombination in zwei Schritten in das Chromosom von *Xanthomonas* integriert.

*Xanthomonas*-Stämme, in denen die erste homologe Rekombination erfolgreich war, wurden auf Spectinomycin-Resistenz und Saccharosesensitivität selektiert, da sich bei diesem Schritt das pOK-Plasmid in das Chromosom des Rezipienten integriert.

Danach wuchsen die Bakterien in NYG-Medium ohne Selektionsdruck, um die Möglichkeit für ein zweites „crossing over“ zu schaffen. Hierbei wurde in ca. 50% der Nachkommen das Wildtypgen durch die mutierte Version ersetzt und das *sacB*-Gen und das Spectinomycin-Resistenzgen, welches durch die erste Rekombination in das Chromosom inseriert wurde, wieder entfernt. Die Bakterien waren damit nicht länger resistent gegenüber Spectinomycin und in der Lage, auf einem Medium mit 5 % Saccharose zu wachsen.

Die korrekte Deletion des *lon*-Gens wurde mittels PCR festgestellt. Hierzu wurden die Primer *lon*-500-5' und *lon*-1500-3' in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Der 5'-Primer befand sich 500 bp stromaufwärts, der 3'-Primer 500 bp stromabwärts des *lon*-Gens. Bei einer Deletion des Gens wurde somit ein 1000 bp großes Fragment amplifiziert.



**Abbildung 4: Klonierungsstrategie zur Generierung des Plasmids pOK $\Delta$ lon.**

### 2.23.2. Protokoll zum Genaustausch mittels homologer Rekombination in *Xcv*

Die Einschleusung einer Mutation ins Chromosom erfolgte nach dem Prinzip der homologen Rekombination. Nach der Inkubation des Gemisches über Nacht bei 30°C wurden die Zellen von der Platte abgenommen und mit 400  $\mu$ l NYG-Rifampicin-Medium gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in 100  $\mu$ l NYG-Rifampicin-Medium resuspendiert. Hiervon wurden 50  $\mu$ l auf eine NYG-Platte mit Rifampicin und Spectinomycin ausplattiert. Nach einer Inkubation von zwei bis drei Tagen bei 30°C wurden 16 Einzelklone parallel auf NYG-Rif-Spec-Saccharose (5%-ig)- und NYG-Rif-

Spec-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Hiervon wurden dann 12 Klone, die jeweils spectinomycinresistent, aber saccharosesensitiv sind, miteinander in 500 µl NYG-Rifampicin-Medium vermischt. 50 µl dieses Gemisches wurden dann auf NYG-Rifampicin-Medium ausplattiert und wiederum 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Mit 5 ml NYG-Rifampicin-Medium wurden alle Klone von der Platte resuspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Zellen wurden auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  cfu/ml verdünnt, davon wurden 50 µl auf NYG-Rifampicin-Saccharose-Platten ausgestrichen. Nach zwei bis drei Tagen bei 30°C wurden 16 Klone parallel auf NYG-Rif-Spec-Platten und NYG-Rif-Saccharose-Platten ausgestrichen. Klone, die gegenüber Spectinomycin sensitiv, aber saccharoseresistent wären, wurden mittels Kolonie-PCR überprüft.

### **2.23.3. Physiologische Charakterisierung der *lon*-Mutante**

#### **2.23.3.1. UV-Sensitivitätstest**

Um die UV-Sensitivität der jeweiligen Bakterienkulturen zu testen, wurden die Stämme 85-10, 85\*, 82\* und die  $\Delta lon$ -Stämme 85-10 $\Delta lon$  #1, 85\* $\Delta lon$  #2 und 85\* $\Delta lon$  #1 auf NYG-Platten zwei Tage lang bei 30°C inkubiert, mit einem Spatel von der Platte abgenommen, in NYG-Medium resuspendiert und durch OD<sub>600</sub>-Messung auf  $10^4$  cfu/ml eingestellt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine OD<sub>600</sub> von  $0,4 \times 10^8$  cfu/ml entspricht. Von jeder Bakteriensuspension wurden jeweils 250 µl auf NYG-Platten - in dreifacher Ausfertigung - ausplattiert. Die erste Platte jedes Stammes zählte als Kontrolle und wurde nicht bestrahlt. Die zweite Plattenreihe wurde mit 0,001, die dritte mit 0,002 J/cm<sup>2</sup> für 30 s auf einem UV-Tisch (Vilber Lourmat FIX-35E) bestrahlt, zwei Tage bei 30°C inkubiert und dann ausgezählt. Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt.

#### **2.23.3.2. Morphologische Charakterisierung**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Ernst Weber durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien auf einem EM-Grid nach modifiziertem Protokoll durchgeführt (Brown *et al.*, 2001). Die Bakterienkulturen wurden 24 Stunden in NYG-Flüssigkultur in einem Schikanekolben bei 30°C angezogen. Die Bakterien wurden dann zweimal mit 1mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, in Minimalmedium

resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Hiervon wurden 15 µl auf ein 300-mesh EM-Goldgrid (Sigma, Taufkirchen) aufgetropft und mit 1% Formvar überschichtet (Polyvinyl 1595E; Serva, Heidelberg). Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Grids in einer Petrischale auf feuchtem Filterpapier aufbewahrt, mit Parafilm verschlossen und vier bis sechs Stunde bei 30°C inkubiert. Um die Bakterien auf dem Grid zu fixieren, wurde das Grid zweimal für 20 min in einen 20 µl-Tropfen, bestehend aus 2 %-igen Formaldehyd und 0,5 %-igem Glutaraldehyd in 50mM Natriumcacodylat-Puffer (pH 7.2), getaucht. Die Bakterien wurden dann für 10 s mit 2 %-iger Phosphotungsten-Säure negativ gefärbt und an der Luft getrocknet.

## 2.24. Nutzung eines *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems

### 2.24.1. Interaktionsstudien zwischen Hrc-Proteinen

Im bakteriellen Dihybridsystem sollten homo- und heterodimere Interaktionen der konservierten Hrc-Proteine HrcJ, HrcL, HrcN, HrcU, HrcV, HrcQ, HrcR und HrcS untersucht werden.

Anstelle der beiden Sequenzen der interagierenden Proteine Jun (in pDP804) und Fos (in pMS604) wurden die zu untersuchenden *hrc*-Proteine jeweils in die Vektoren kloniert. Das *jun*- und *fos*-Gen wurde per Restriktionsverdau aus dem jeweiligen Plasmid herausgeschnitten und die Vektorfragmente wurden über ein Agarosegel gereinigt.

Die Gene der zu untersuchenden Proteine wurden per PCR aus genomischer DNA des *Xanthomonas*-Stammes 85-10 amplifiziert. Die zum jeweiligen Gen gehörenden Primerkombinationen, eingeführten Schnittstellen und Verdaumuster sind im Anhang 4 aufgelistet. Die amplifizierten Fragmente wurden nach Verdau und Reinigung aus dem Gel in die jeweiligen Vektoren ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH10B transformiert. Einzelkolonien wurden mittels Kolonie-PCR überprüft und positive Klone über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium mit Selektivantibiotikum inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse. Zur Kontrolle wurden die klonierten Fragmente sequenziert.

Zur Untersuchung von Selbstinteraktionen wurden pMS-*hrcJ*, pMS-*hrcL*, pMS-*hrcN*, pMS-*hrcU*, pMS-*hrcU*<sub>Δ1-205</sub>, pMS-*hrcU*<sub>Δ1-264</sub>, pMS-*hrcV*, pMS-*hrcV*<sub>Δ1-326</sub>, pMS-*hrcQ*, pMS-*hrcR*, pMS-*hrcR*<sub>73-155</sub>, pMS-*hrcS* und pMS-*hrpD5* in den Stamm SU101

transformiert. Um heterodimere Interaktionen zwischen den Proteinen zu testen, wurden die pMS-Derivate zusammen mit den pDP-Derivaten (pDP-*hrcJ*, pDP-*hrcL*, pDP-*hrcN*, pDP-*hrcU*, pMS-*hrcU*<sub>Δ1-205</sub>, pMS-*hrcU*<sub>Δ1-264</sub>, pMS-*hrcV*, pMS-*hrcV*<sub>Δ1-326</sub>, pMS-*hrcQ*, pMS-*hrcR*, pDP-*hrcR*<sub>73-155</sub>, pDP-*hrcS* und pDP-*hrpD5*) in den Stamm SU202 transformiert.

Auf diese Art und Weise wurden alle zu untersuchenden Proteine gegeneinander auf Interaktionen getestet. Von jedem Ansatz wurden fünf Transformanten auf MacConkey-Indikator-Platten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und schließlich ausgewertet.

### **2.24.2. Modifizierung der LexA-Vektoren pMS604 und pDP604: Generierung der Vektoren pMSspe und pDPspe**

In den Vektoren pMS604 und pDP804 befindet sich die DNA-bindende Domäne von LexA jeweils N-terminal zu den fusionierten Proteinen. Dieses System sollte so verändert werden, dass die LexA-DNA-Bindedomäne an den C-Terminus des zu untersuchenden Proteins fusioniert wird.

Hierzu wurde pMS604 mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *XhoI* verdaut und pDP804 mit *XhoI* und *BglII*. Die Jun- und Fos-Leucin-Zipper wurden somit entfernt. Um ein Stoppcodon in LexA einzuführen, wurden die Oligonukleotide pMS-*AgeI*-Stopp und pMS-*XhoI*-Stopp bzw. pDP-*XhoI*-Stopp und pDP-*BglII*-Stopp miteinander hybridisiert und in pMS604 bzw. pDP804 ligiert. Die daraus resultierenden Vektoren wurden pMSstop und pDPstop genannt.

Um eine Klonierung der *hrc*-Gene zu ermöglichen, wurde eine *SpeI*-Schnittstelle in die multiple Klonierungsstelle (N-terminal zu LexA) der beiden Plasmide eingeführt. Dies erfolgte mittels PCR mit den Vektoren pMSstop und pDPstop unter Verwendung der Primer B2H-lexA-forward und B2H-lexA-reverse. Das Amplifikationsprodukt wurde dann mit dem Restriktionsenzym *SpeI* verdaut, Gel-gereinigt und religiert. Es entstanden die Plasmide pMSspe und pDPspe. Die zugehörigen Vektorkarten befinden sich im Anhang 7 und 8.

Die erforderlichen *hrc*-Gene wurden mittels PCR amplifiziert, mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und in die neu erhaltenen Vektoren kloniert.

## 2.25. Topologiestudien

### 2.25.1. Computergestützte Topologievorhersage von Membranproteinen

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden fünf Vorhersagemethoden genutzt: TMHMM (Krogh *et al.*, 2001), HMMTOP (Tusnady und Simon, 2001), MEMSAT (Jones *et al.*, 1994), TOPPRED (von Heijne, 1992) und PHD (Rost *et al.*, 1996). Die Proteine wurden als übersetzte Aminosäuresequenzen jeweils einzeln von den Programmen analysiert. Die Programme wurden in der jeweiligen Web-Version genutzt und können unter folgenden Adressen angewandt werden:

TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>
HMMTOP	<a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/">http://www.enzim.hu/hmmtop/</a>
MEMSAT	<a href="http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html">http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html</a>
TOPPRED	<a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html</a>
PHD	<a href="http://cubic.bioc.columbia.edu/">http://cubic.bioc.columbia.edu/</a>

### 2.25.2. Topologiestudien der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5

Die Methode zur Untersuchung der Topologie von inneren Membranproteinen beruht auf der lokalisationspezifischen Enzymaktivität zweier Reporterproteine, der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ; aktiv im Zytoplasma) und der alkalischen Phosphatase (PhoA, aktiv im Periplasma). Translationale Fusionen zu diesen Reporterproteinen können mittels eines neuen Transposon-Systems, dem *mini-Tn5*-Derivat *Tnpholac1*, generiert werden (Alexeyev und Winkler, 2002).

### 2.25.3. Experimentelles System

Das Transposon *Tnpholac1* besteht aus zwei Genen, einem dualen *pho-lac*-Reporter und einem Resistenzgen für Kanamycin, flankiert von 19 bp invertierten Sequenzwiederholungen. Der Leserahmen des Reporters ist so konstruiert, dass das Transposon hinter ein Basentriplet inserieren muss, damit ein offener Leserahmen



entsteht. Der Vektor pMA814 trägt das Transposon *Tnpholac1* (Alexeyev und Winkler, 2002).

#### **2.25.4. Herstellung von *hrc/hrp*-Expressionsplasmiden**

Die Gene der sechs vorhergesagten Membranproteine wurden aus genomischer DNA des *Xanthomonas*-Stammes 85-10 mittels PCR und den im Anhang 2 angegebenen Primerkombinationen amplifiziert und in den Vektor pCR®2.1-TOPO® kloniert. Nach Sequenzierung wurden die Fragmente in den Vektor pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995) kloniert. Dies ergab die Derivate pBAD-*hrcR*, pBAD-*hrcS*, pBAD-*hrcT*, pBAD-*hrcU*, pBAD-*hrcV* und pBAD-*hrpD5*. Der Vektor pBAD24 enthält den Promotor P<sub>BAD</sub> des Arabinoseoperons und das regulatorische *araC*-Gen. Dieser Promotor kann mit 0,2 % L-Arabinose induziert werden.

#### **2.25.5. *In vitro*-Transposition**

Die *in vitro*-Transposition wurde mit Hilfe von EZ::TN-Transposase (Epicentre Technologies) durchgeführt. Hierzu wurden gleiche Mengen vom Transposon-Donor-Plasmid pMA814 und den jeweiligen Ziel-Plasmiden (pBAD-*hrcR*, pBAD-*hrcS*, pBAD-*hrcT*, pBAD-*hrcU*, pBAD-*hrcV* und pBAD-*hrpD5*) in EZ::TN-Reaktionspuffer und 1 µl EZ::TN-Transposase gemischt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl EZ::TN 10x Stop-Solution (10 min bei 70°C) abgestoppt.

Hiervon wurde jeweils 1 µl in die Elektroporation von TOP10-Zellen eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Die Transformanden wurden auf dualen Indikatorplatten (Anhang 1) ausplattiert, bei 37°C für 24 Stunden inkubiert und ausgewertet. Den Indikatorplatten wurde zur Phosphatreprimierung der endogenen bakteriellen alkalischen Phosphatase 80 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugefügt.

#### **2.25.6. Bestimmung der Enzymaktivität der Transposon-Mutanten**

Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C zeigten die Transformanden durch die dem Medium zugegebenen Enzymsubstrate eine deutliche Farbausprägung. Die Einzelkolonien wurden farblich getrennt in eine Kolonie-PCR eingesetzt, auf einem 2-2,5

%-igen Agarosegel ausgewertet und anschließend nach Größe sortiert. Geeignete Klone wurden ausgesucht und die Plasmid-DNA wurde isoliert. Mit dem Primer Seq-Tn*pholac*1-3', der sich 68 bp vom Ende des *phoA*-Gens entfernt anlagert, wurde die Plasmid-DNA sequenziert und die exakte Insertionsstelle lokalisiert.

### **2.25.7. Konstruktion eines neuen Topologie-Reporterplasmids**

Da es in einigen Fällen nicht möglich war, genügend Insertionen pro Gen zu erhalten, um eine zweifelsfreie Topologie zu erstellen, wurde ein neues Reporterplasmid konstruiert. Das Transposon Tn*pholac*1 wurde durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Pst*I aus dem Plasmid pMA814 ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Pst*I verdauten Vektor pBAD24 kloniert. Durch einen *Not*I-Verdau und Religation wurde das Kanamycinresistenzgen aus Tn*pholac*1 entfernt, um die Anzahl der möglichen Restriktionsstellen zu erhöhen. Das dadurch erhaltene Plasmid pDT ist so konstruiert, dass die ursprüngliche multiple Klonierungsstelle des Plasmids pBAD24 erhalten blieb. Eine Plasmidkarte von pDT ist im Anhang 6 dargestellt.

## **2.26. Reinigung des Proteins HrpD5**

### **2.26.1. Zellernte und Gesamtzellaufschluss**

Aus einer Übernachtskultur wurden 3 l NYG-Medium mit dem Stamm 85E\* $\Delta$ hrpD5 (pBBR::*hrpD5*<sub>His6</sub>) 1:10 angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geerntet. Hierfür wurde die Kultur in einen 450 ml fassenden Polycarbonat-Zentrifugenbecher überführt und mittels Zentrifugation (Sorvall RC26 Plus, Rotor SLA-3000) bei 4000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Das Pellet wurde in 50 ml Lysispuffer aufgenommen und langsam auf Eis aufgetaut.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels French<sup>®</sup> Press (Thermo IEC). Hierfür wurde die Zellsuspension durch zwei- bis dreimaligen Durchlauf mit einem Druck von 1000 psi in einer eisgekühlten Zelle aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und unaufgeschlossenen Zellen wurden bei 9000 rpm und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Um kleinere Zelltrümmer und Schwebeteilchen zu entfernen, wurde der Überstand (ca. 40 ml) durch einen Sterilfilter (0,22  $\mu$ m, Stericup<sup>®</sup>/Steritop<sup>®</sup> Filter Unit, Millipore) passiert.

### 2.26.2. Reinigung des Fusionsproteins HrpD5-His<sub>6</sub>

Die Reinigung des His<sub>6</sub>-tag-Fusionsproteins erfolgte in Anlehnung an das Handbuch „The QIAexpressionist™“ von Qiagen.

Die Reinigung erfolgte mittels einer HisTrap™HP -Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg), die in die Chromatographie-Apparatur (Gradi Frac, Amersham Pharmacia Freiburg) eingespannt wurde. Die Säule wurde mit ca. 15 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Dann wurde das Lysat mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit ca. 15 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde in einem Gradienten von 1-250 mM Imidazol eluiert (Elutionspuffer) und 500 µl-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analyse auf Reinheit und Identität des Zielproteins getestet.

Die Zusammensetzungen der hier verwendeten Puffer sind im Anhang 2 aufgelistet.

## 2.27. Bestimmung der Transkriptionsstarts von *hrpD5* mittels 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR

### 2.27.1. RNA-Isolierung aus *Xcv*

Die Isolierung der RNA aus dem *Xanthomonas*-Stamm 85E\* erfolgte mit dem Qiagen RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) und dem Protokoll für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien nach Herstellerangaben. Die Präparation ergab eine RNA-Menge von ca. 12 µg/ml und wurde in einer Verdünnung von 1:50 in die 5'-RACE-PCR eingesetzt.

### 2.27.2. cDNA-Synthese und 5'-RACE

Um das 5'-Ende des *hrpD5*-mRNA-Transkripts zu bestimmen, wurde unter Verwendung des BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) eine 5'-RACE-PCR durchgeführt.

Die Erststrang-Synthese wurde mit dem spezifischen *hrpD5*-Primer *hrpD5*-256-3' durchgeführt. Dieser bindet 256 Nukleotide stromabwärts des ursprünglich vorhergesagten Translationsstarts bzw. 238 Nukleotide einer konservierten PIP-Box.

---

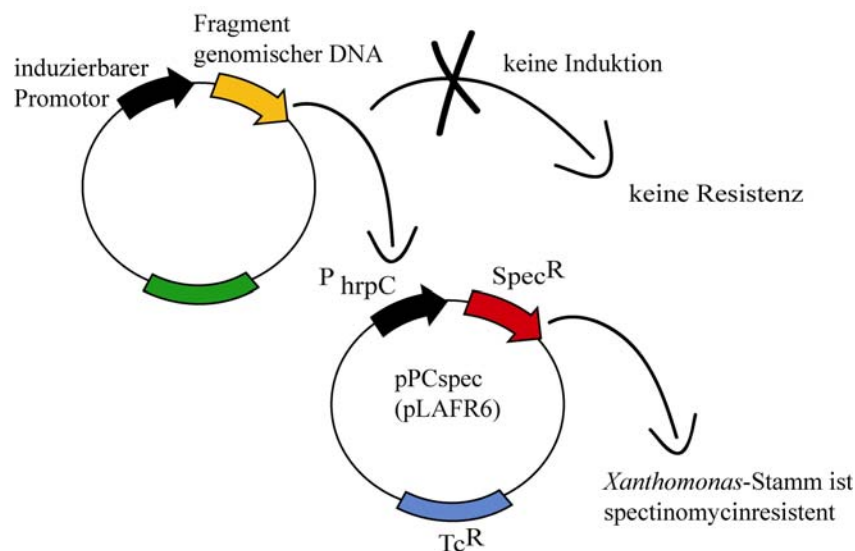
Hierbei wurde nach dem Herstellerprotokoll des SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit verfahren. Diese cDNA wurde direkt in die 5'-RACE-PCR eingesetzt. Die genspezifische Synthese erfolgte mit dem spezifischen *hrpD5*-Primer (*hrpD5*-186-3') und einem Universalprimer des Kits. Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO kloniert und mit M13-Primern sequenziert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung eines induzierbaren und regulierbaren Expressionssystems in *Xcv*

Gesucht wurde ein Expressionssystem, das in *Xcv* eine ausreichende und regulierbare Genexpression ermöglicht. Dieses sollte in den nachstehenden kurz erläuterten Folgeprojekten eingesetzt werden.

Zunächst sollte die Regulation des *hrp*-Genclusters unter Zuhilfenahme eines schon bestehenden Vektorsystems untersucht werden. Der Vektor pPCspec (Wengelnik *et al.*, 1999) trägt stromabwärts vom *hrpC*-Promotor ein promotorloses *aadA*-Gen, welches die Resistenz gegenüber Spectinomycin kodiert. Der *hrpC*-Promotor wird in *Xcv* durch HrpG reguliert. Ein weiterer Vektor sollte einen in *Xcv* induzierbaren Promotor und stromabwärts eine Bibliothek aus genomischer DNA des Stammes 85-10 tragen (Abbildung 5). Würde ein kloniertes Fragment der genomischen DNA die Funktion eines positiven Regulators einnehmen, würde der *hrpC*-Promotor im Vektor pPCspec induziert werden. Der vektortragende *Xanthomonas*-Stamm wäre dann unter induzierenden Bedingungen resistent gegenüber Spectinomycin.



**Abbildung 5: Vektorsystem zur Suche eines positiven Regulators in *Xcv*.** Tc: Tetracyclin, Spec: Spectinomycin.

---

In einem weiteren Projekt sollte das Wachstum der Pilusstruktur des TTSS geklärt werden. Es stellte sich die Frage, ob das Pilusprotein HrpE in *Xcv* durch den Pilus bis zur Spitze transportiert wird und diesen dort verlängert oder ob der Pilus an der Basis wächst und aus dem Bakterium hinausgeschoben wird. Um eine Epitop-markierte Variante von HrpE unabhängig vom Rest des TTSS exprimieren und in seiner natürlichen Umgebung untersuchen zu können, sollte es unter die Kontrolle eines streng regulierbaren Promotors gestellt werden. Somit könnte vor der Induktion des TTSS erst das Pilusprotein induziert und untersucht werden. In *P. syringae* pv. *tomato* konnte mit Hilfe eines Quecksilber-induzierbaren Promotors gezeigt werden, dass das Pilusprotein HrpA an der Spitze des wachsenden Pilus hinzugefügt wird (Li *et al.*, 2002) und Effektorproteine durch diesen Pilus hinaus in das umgebende Medium abgegeben werden (Jin und He, 2001; Li *et al.*, 2002).

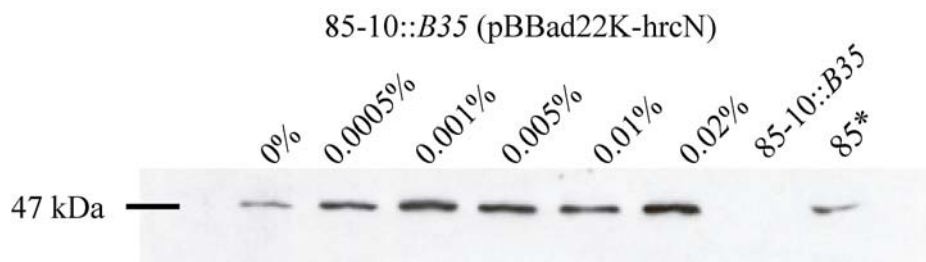
Mittels DFI („Differential Fluorescence Induction“) sollten *in vivo* - d.h. *in planta* - aktivierte Gene identifiziert werden. DFI ist eine Methode zur positiven Selektion von *in vivo* induzierten Genen während der Infektion von kultivierten Zellen. Diese Methode wurde zuerst an *S. typhimurium* angewendet (Valdivia und Falkow, 1997; Valdivia *et al.*, 1996). Mittels FACS („Flow Cytometry and Fluorescence Activated Cell Sorting“) können dann einzelne bakterielle Zellen, die eine induzierbare GFP („Green Fluorescent Protein“) - Genfusion tragen, isoliert werden (Valdivia und Falkow, 1998). Um DFI und FACS in *Xcv* zu etablieren, sollte zuerst untersucht werden, ob es überhaupt möglich ist, *Xcv*-Zellen durch FACS isolieren zu können. Hierfür sollte zunächst ein induzierbarer und regulierbarer Promotor gefunden werden, der außerdem noch eine ausreichende Expression ermöglicht.

Für diese geplanten Untersuchungen ist ein vollständig reprimierbarer Promotor unverzichtbar, der sich signifikant induzieren lässt. Für die Untersuchungen in *Xcv* wurden daher ein schon in *Xanthomonas* etablierter und ein neu geschaffener Vektor getestet. Die Untersuchungsergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

### 3.1.1. Expressionsstudien in *Xcv*: Untersuchung eines Arabinose-induzierbaren Promotors

Mit Hilfe eines Vektors aus der pBBad-Reihe (Sukchawalit *et al.*, 1999) wurde das *hrcN*-Gen gezielt in *Xcv* exprimiert. Die pBBad-Vektoren wurden für eine induzierbare Expression von Zielgenen in ausreichender Menge in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* konstruiert (Sukchawalit *et al.*, 1999). Der pBBad22K-Vektor besitzt eine Shine-Dalgarno-Sequenz und ein Startcodon unmittelbar vor Beginn der multiplen Klonierungsstelle. Der Promotor kann mit L-Arabinose induziert werden.

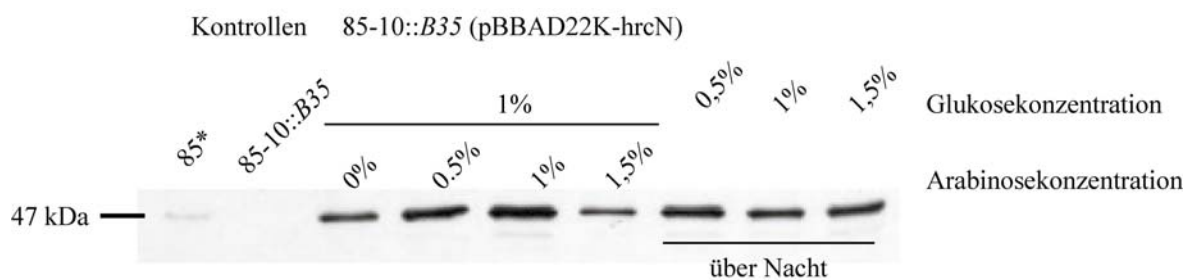
Um die unterschiedlichen Expressionsstärken eines Gens aus *Xanthomonas* verfolgen zu können, wurde als Reporter das Gen *hrcN* in den Vektor pBBad22K kloniert und in den *Xcv*-Stamm 85-10::B35 (Bonas *et al.*, 1991) konjugiert. Der Stamm 85-10::B35 trägt eine Transposoninsertion im *hrcN*-Gen.



**Abbildung 6: Expression von pBBad22K-*hrcN* in *Xanthomonas* 85-10::B35.** Immunoblotanalyse des *Xcv*-Stammes 85-10::B35(pBBad22K-*hrcN*), angezogen in NYG-Medium, 1 h induziert mit unterschiedlichen Arabinosekonzentrationen. Als negative Kontrolle diente *Xcv*-Stamm 85-10::B35; die positive Kontrolle wurde mit 85\* durchgeführt. HrcN besitzt eine molekulare Größe von 47,7 kDa.

Abbildung 6 zeigt die Immunoblotanalyse von pBBad22K-*hrcN* in 85-10::B35, induziert mit unterschiedlichen Arabinosekonzentrationen. Die Western Blot-Analysen mit dem Antikörper  $\alpha$ -HrcN zeigen, dass eine leichte Expressionssteigerung von HrcN zwischen induzierter und nicht induzierter Probe besteht. Da der Promotor allerdings auch bei Nichtinduktion eine Expression des Gens zulässt, ist er für diesen Versuchsansatz nicht geeignet. Es ist nicht möglich, die Expression gezielt zu steuern und im gewünschten Maße zu steigern.

In einer weiteren Analyse wurde daher versucht, die Expression des Gens durch Repression mit Glukose zu unterdrücken. Hierzu wurden Kulturen des Stamms 85-10::B35 (pBBad22K-hrcN) über Nacht in NYG-Medium mit 1% Glukose angezogen, frisch inokuliert und mit 0%, 0,5%, 1% und 1,5% L-Arabinose für 3 h induziert. Drei weitere Kulturen wurden über Nacht mit 0,5%, 1% und 1,5% Glukose angezogen. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, ist es selbst bei sehr hohen Glukosekonzentrationen von 1,5 % nicht möglich gewesen, die Repression des Promotors zu erreichen und somit die Expression des Gens vollständig zu unterdrücken.



**Abbildung 7: Einfluss von Glukose auf die Expression von HrcN.** Immunoblotanalysen des Stammes 85-10::B35(pBBAD22K-hrcN); Glukose-induzierte Übernachtkulturen. Als negative Kontrolle diente Stamm *Xcv* 85-10::B35; die positive Kontrolle wurde mit 85\* durchgeführt. Es wurden immer gleiche Proteinmengen, kontrolliert durch OD<sub>600</sub>-Bestimmung, aufgetragen. HrcN besitzt eine molekulare Größe von 47,7 kDa.

### 3.1.2. Konstruktion eines Kupfer-induzierbaren Expressionsplasmids

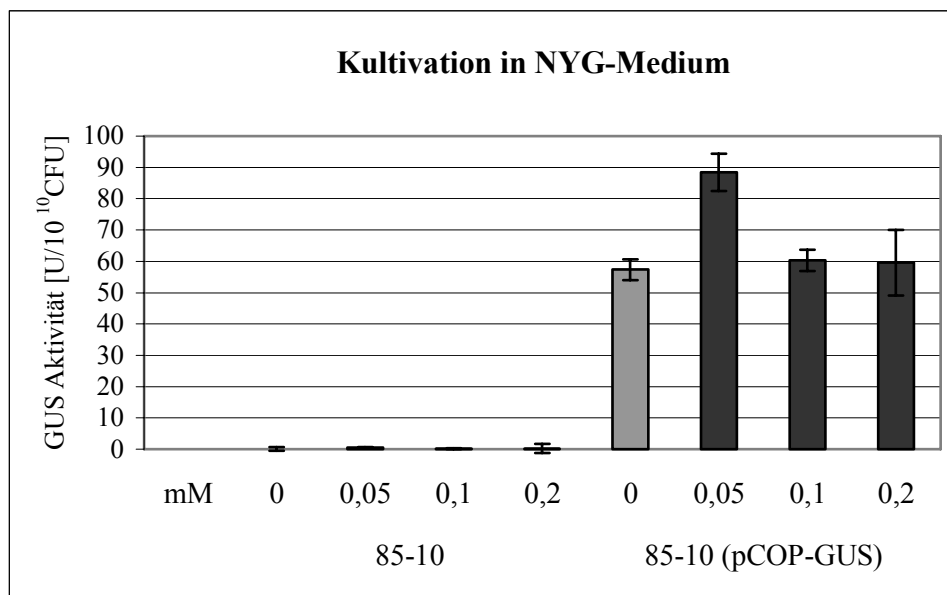
Der durch L-Arabinose induzierbare Promotor im Vektor pBBAD22K brachte nicht das gewünschte Ergebnis einer regulierbaren Genexpression. Um einen in *Xanthomonas* induzierbaren Promotor zu erhalten, sollte dieser aus dem Bakterium selbst kommen. *Xanthomonas* besitzt das *cop*-Operon (*copA-D*), das für die Resistenz gegenüber Kupfer verantwortlich ist. Vor allem die Gene *copA* und *copB* scheinen essentiell für diese Resistenz zu sein (Lee *et al.*, 1994). Die Lage des Operons im Chromosom von *Xanthomonas* ist bekannt und die Sequenz wurde durch einen Sequenzvergleich mit anderen *Xanthomonaden* verifiziert. Hierbei wurden sehr hohe Ähnlichkeiten festgestellt. So besitzt dieser Bereich zu *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 91%



Sequenzidentität. Zu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* beträgt der Wert 82% und zu *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* 65%.

Der Promotorbereich von *copA* wurde aus genomischer DNS des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert und in den promotorlosen Vektor pBBR1-MCS5 $\Delta$ P<sub>lac</sub> kloniert; es entstand der Vektor pCOP. Als Reporter wurde das *uidA*-Gen verwendet, welches das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert. Dessen Expression kann mit einer GUS-Aktivitätsbestimmung (Kapitel 2.18.) nachgewiesen werden.

Für die GUS-Aktivitätsbestimmung wurden die Bakterien in vier verschiedenen Medien angezogen. Hierzu wurden Stamm 85-10 (als Negativkontrolle) und zwei Konjuganden des Stamms 85-10(pCOP::GUS) aus einer Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 frisch inokuliert und mit 0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM CuSO<sub>4</sub> induziert. Bei höheren CuSO<sub>4</sub>-Konzentrationen wuchsen die Bakterien nur noch schwach. Außerdem verfärbte sich das Medium nach kurzer Zeit braun. Die Proben wurden nach vier Stunden Induktion aufbereitet und die GUS-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Die angegebenen Werte sind jeweils aus zwei Versuchsansätzen gemittelt.

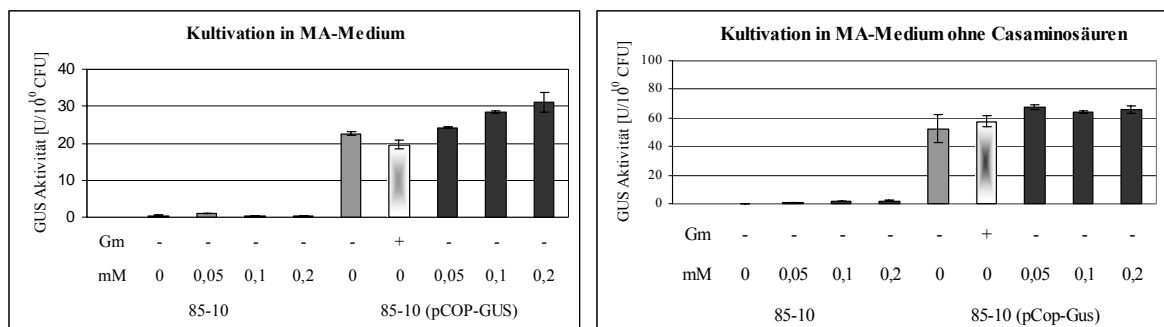


**Abbildung 8: GUS-Aktivität des *Xcv*-Stamms 85-10(pCOP::GUS).** Die Bakterien wurden in NYG-Medium kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit 0, 0,05, 0,1 und 0,2 mM CuSO<sub>4</sub> induziert.

Abbildung 8 zeigt die Auswertung der GUS-Aktivitätsmessung nach der Kultivierung der Bakterien in NYG-Medium. Es ist zu erkennen, dass zwischen den uninduzierten (0

mM) und induzierten Proben kein signifikanter Unterschied besteht. Der Promotor scheint in diesem Medium nicht durch die  $\text{CuSO}_4$ -Induktion steuerbar zu sein. Eine Möglichkeit wäre, dass durch Spuren von  $\text{CuSO}_4$  im verwendeten Medium eine konstitutive Expression vorliegt.

Um den Einfluss des Mediums zu reduzieren, wurde daher das Minimalmedium MA verwendet. Die Bakterien wurden in diesem Medium ohne das Antibiotikum Gentamycin angezogen, da auch nicht ausgeschlossen ist, dass Kupfer in Spuren vorhanden sein kann. Die uninduzierten Proben beider Klone wurden sowohl mit als auch ohne Gentamycin inkubiert. Dem MA-Medium wurden, wenn auch nur in geringen Mengen, Casaminosäuren zugesetzt; auch insoweit kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die Chemikalien frei von Kupfer sind. Daher wurde noch eine zweite Versuchsreihe angelegt, in der *Xcv* in einem MA-Medium ohne Casaminosäuren kultiviert wurde. Die Auswertung der GUS-Aktivitäten ist in Abbildung 9 dargestellt.



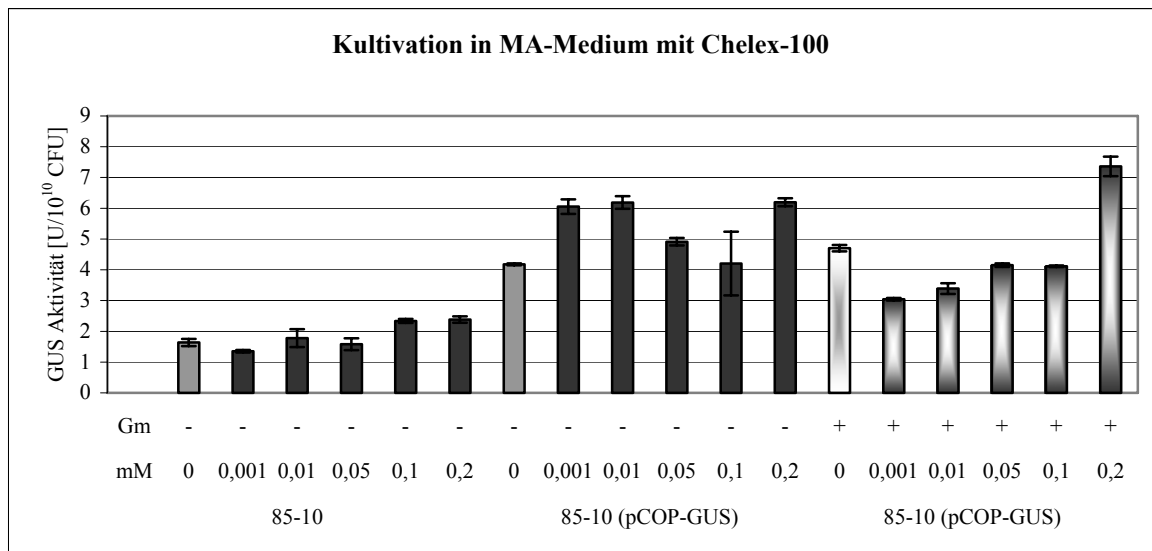
**Abbildung 9: GUS-Aktivität des *Xcv*-Stamms 85-10(pCOP::GUS), kultiviert in MA-Medium mit und ohne Casaminosäuren. Gm - Gentamycin**

Die *Xcv*-Kulturen wurden bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 mit denen in der Abbildung 9 angegebenen  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen vier Stunden lang induziert. Das Wachstum der Bakterien im nährstoffarmen MA-Medium beeinflusst auch die GUS-Aktivitätswerte, die geringer ausfallen als im reicheren NYG-Medium. Ein Unterschied zwischen induzierten und uninduzierten Proben war weder bei der Kultivierung der Bakterien im MA-Medium noch im MA-Medium ohne Casaminosäuren zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den uninduzierten Proben mit und ohne Gentamycin war nicht festzustellen. Die Zugabe des Antibiotikums hat damit keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Auffällig ist hier allerdings, dass die GUS-Aktivitätswerte der Bakterien, die im MA-Medium ohne Casaminosäuren kultiviert wurden, höher ausfielen

als die der Vergleichsgruppe, die im verhältnismäßig reicheren MA-Medium kultiviert wurden.

Als letzter Versuch wurde dem MA-Medium Chelex-100 zugesetzt, ein Ionenaustauscher mit hoher Präferenz für zweiwertige Kationen. Es sollten somit sämtliche Verunreinigungen durch Kupfer, die den Promotor beeinflussen könnten, aus dem Medium entfernt werden. Der Versuch wurde diesmal leicht abgeändert: Die Induktion mit  $\text{CuSO}_4$  erfolgte in kleineren Konzentrationsschritten, da der Promotor bei Beseitigung störender Verunreinigungen spezifischer reagieren sollte. Es wurden zwei Versuchsreihen angelegt, in denen die Bakterien mit und ohne das Antibiotikum Gentamycin kultiviert wurden.

Anhand der Abbildung 10 erkennt man zunächst, dass die GUS-Aktivitäten sehr gering sind. Die geringen Aktivitätswerte könnten aber auch durch den Nährstoffmangel im Medium erklärt werden, da durch Chelex-100 sämtliche zweiwertige Ionen entfernt wurden. Dieser Mangel könnte eventuell die Transkriptions- und Translationsaktivität generell reduziert haben.



**Abbildung 10: GUS-Aktivität des *Xcv*-Stamms 85-10(pCOP::GUS), kultiviert in MA-Medium mit Chelex-100. Gm- Gentamycin**

Ein signifikanter Unterschied der GUS-Aktivitäten bei Zugabe unterschiedlicher  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen zum Medium konnte nicht festgestellt werden.

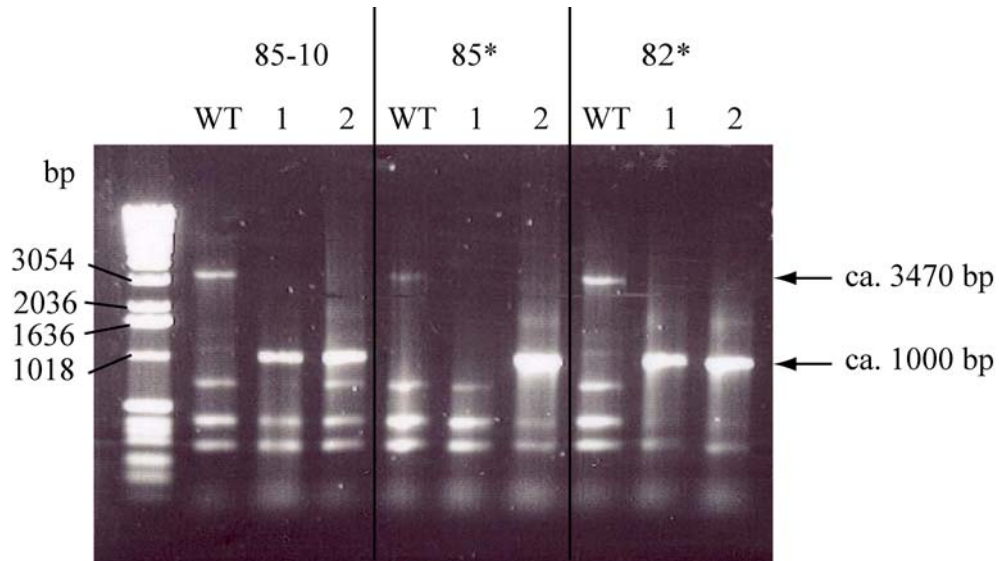
Da diese ersten Analysen wenig Erfolg versprechend waren, wurden die Versuche eingestellt.

## 3.2. Konstruktion einer Lon-Protease-Mutante in *Xcv*

In *Pseudomonas syringae* reguliert die Lon-Protease durch den Abbau von HrpR (Kapitel 1.2.2.1.) die Expression der *hrp*-regulierenden Gene und somit der Typ III-Sekretion. *lon*-Mutanten in *P. syringae* zeigen eine erheblich höhere Sekretion von Effektoren und induzieren schnellere Abwehrreaktionen in resistenten Pflanzen (Bretz *et al.*, 2002). Auch in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte in *lon*-Mutanten eine geringere Expression von Invasionsgenen beobachtet werden (Boddicker und Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2002). Der Einfluss auf die Regulation und die Sekretion von Effektorproteinen in *Xanthomonas* wurde noch nicht untersucht. Es bestand aber die Möglichkeit, dass durch das Fehlen der Lon-Protease bei einer Induktion des *hrp*-Clusters vermehrt Proteine des Typ III-Sekretionssystems angesammelt werden könnten. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollte das *lon*-Gen in den *Xcv*-Stämmen 85-10, 85\* und 82\* deletiert werden.

### 3.2.1. Deletion des *lon*-Gens

Die Deletion des *lon*-Gens erfolgte durch homologe Rekombination (Kapitel 2.23.1.) in den Stämmen 85-10, 85\* und 82\*. Hierbei wurde das *lon*-Gen bis auf sehr kurze N- und C-terminale Bereiche aus dem Chromosom deletiert. Die Deletion wurde durch Kolonie-PCR bestätigt. Hierzu wurden Primer gewählt, die 500 bp stromaufwärts und 500 bp stromabwärts des *lon*-Gens liegen (Primer Lon-5'-500 - Lon-3'-1500). Bei einer  $\Delta lon$ -Mutante müsste ein ca. 1000 bp großes Fragment amplifiziert werden. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass bei den Stämmen 85-10, 85\* und 82\* das intakte *lon*-Gen (2471 bp + 1000 bp) und bei den mutierten Kandidaten – bis auf eine Ausnahme – ein 1000 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Bis auf Kandidat 85\* $\Delta lon$  #1 wurde daher von der Korrektheit der Mutanten ausgegangen.



**Abbildung 11: Mutation des *lon*-Gens im Chromosom von *Xcv*.** Amplifizierung der *lon*-Region mit den Primern *lon*-5'-500 (500 bp stromaufwärts des *lon*-Gens) und *lon*-3'-1500 (500 bp stromabwärts des *lon*-Gens). Ist das *lon*-Gen deletiert, erfolgt die Amplifizierung eines ca. 1000 bp, ansonsten eines ca. 3470 bp großen Fragments. Als Template dienten die Wildtyp-Stämme 85-10, 85\* und 82\* (Negativkontrolle; WT) und jeweils zwei mutierte Kandidaten.

### 3.2.2. Physiologische Charakterisierung der *lon*-Mutante

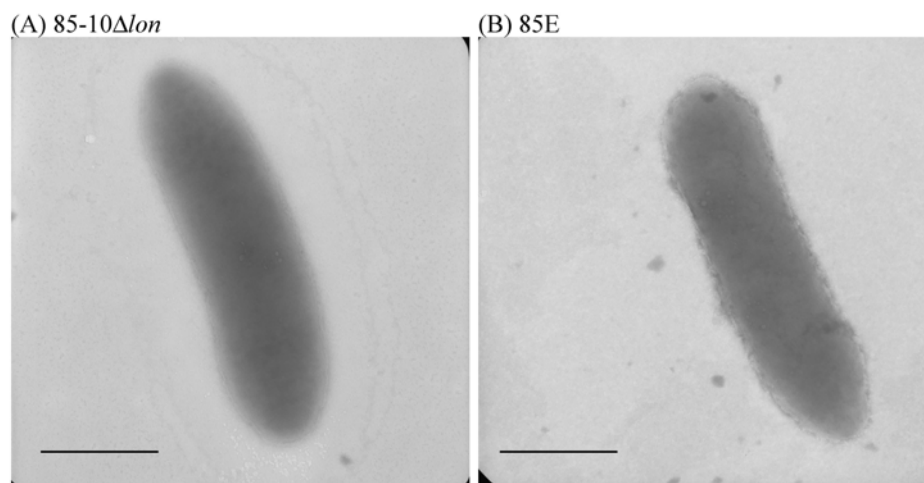
#### 3.2.2.1. UV-Test

Im tierpathogenen Bakterium *S. enterica* (Takaya *et al.*, 2003) und im pflanzenpathogenen Bakterium *P. syringae* (Bretz *et al.*, 2002) wurde gezeigt, dass der jeweilige  $\Delta lon$ -Stamm extrem sensitiv gegenüber UV-Licht reagiert. Um festzustellen, ob dies auch auf die *lon*-Mutante von *Xcv* zutrifft, wurden Bakterienkulturen der Wildtyp- und  $\Delta lon$ -Stämme 85-10 $\Delta lon$ , 85\* $\Delta lon$  und 82\* $\Delta lon$  auf NYG-Medium ausgestrichen, 30 Sekunden mit einer UV-Lichtstärke von 0, 0,001 und 0,002 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Die Auszählung der Klone brachte keinen Unterschied zwischen den  $\Delta lon$ -Stämmen und dem zugehörigen Wildtyp-Stamm, gleich mit welcher Stärke die Stämme bestrahlt wurden. Die Mutation scheint die UV-Sensitivität von *Xcv* nicht zu beeinflussen.

### 3.2.2.2. Morphologische Charakterisierung

Da in  $\Delta lon$ -Stämmen des pflanzenpathogenen Bakteriums *P. syringae* neben der stark angestiegenen UV-Sensitivität auch bis zu vierfach größere Zellen beobachtet werden konnten (Bretz *et al.*, 2002), wurde die Morphologie des *Xcv*-Stammes  $\Delta lon$  85-10 sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp 85E zeigten sich unter dem Lichtmikroskop weder Auffälligkeiten noch Unterschiede. Auch nach Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder konnte, wie die nachfolgende Abbildung 12 zeigt, kein Unterschied in der Größe bzw. keinerlei Neigung zur Filamentbildung aufgrund von Zellteilungsdefekten (Gottesman *et al.*, 1981) festgestellt werden.



**Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der 85-10 $\Delta lon$ -Mutante (A) und des *Xcv*-Wildtypstamms 85E (B). Der Balken markiert eine Größe von 0,5  $\mu\text{m}$  (Foto: Ernst Weber).**

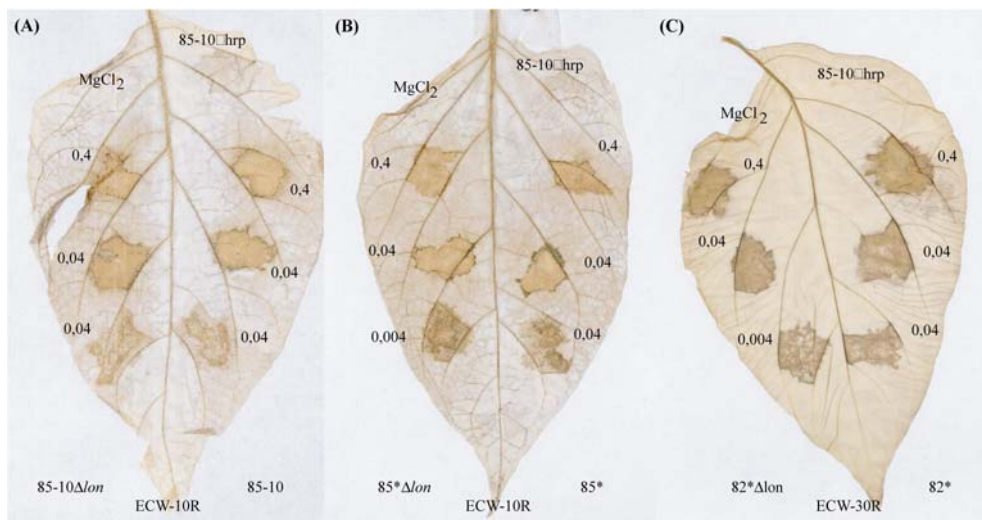
### 3.2.3. Einfluss der *lon*-Mutation auf die Interaktion von *Xcv* mit resistenten Wirtspflanzen

Es sollte untersucht werden, ob *Xcv* durch das Fehlen der Lon-Protease eine veränderte Abwehrreaktion oder Krankheitssymptomatik der Pflanze bewirken kann. Hierzu wurden Bakteriensuspensionen der drei mutierten Stämme 85-10 $\Delta lon$ , 85\* $\Delta lon$  und 85\* $\Delta lon$  in die Paprikakultivare ECW-10R (trägt das *Bs1*-Gen) und ECW-30R (trägt *Bs3*) infiltriert. Das *Bs1*-Resistenzgen ermöglicht die Erkennung von AvrBs1; dieses

Avirulenzgen wird in den Stämmen 85-10 und 85\* exprimiert (Minsavage *et al.*, 1990). Der *Xcv*-Stamm 82\* dagegen exprimiert das Avirulenzprotein AvrBs3 (Bonas *et al.*, 1989) und induziert eine HR auf ECW-30R-Pflanzen.

Durch die Verwendung des Wildtypstamms und der *hrpG*\*-Stämme sollte untersucht werden, ob die konstitutive Expression der *hrp*-Gene und das gleichzeitige Fehlen der Lon-Protease eine Anhäufung der Proteine des Typ III-Sekretionssystems bewirkt und ob dadurch eine gegenüber dem Wildtyp verstärkte und verfrühte Abwehrreaktion der Pflanze auftritt.

Abbildung 13 zeigt die gebleichten Blätter der infiltrierten Pflanzen 48 Stunden nach der Inokulation. Bild (A) und (B) zeigen die Reaktion des Paprikakultivars ECW-10R nach der Infiltration mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 $\Delta$ lon und 85\* $\Delta$ lon. Es konnte keine Verzögerung der HR festgestellt werden. Die Infiltration des Stammes 82\* $\Delta$ lon (Abbildung 13 (C)) in das Paprikakultivar ECW-30R zeigte auch keine Veränderung in der HR-Auslösung zwischen dem Wildtyp-Stamm und der Mutante. Eine Überprüfung der Blätter in einem kürzeren Zeitabstand (6, 12 und 24 Stunden) ließ keinen Unterschied erkennen.



**Abbildung 13: Reaktion von Paprika ECW-10R nach Inokulation mit den *Xcv*-Stämmen 85-10, 85-10 $\Delta$ lon (A) und 85\*, 82\* $\Delta$ lon (B) und von ECW-30R nach Inokulation mit den *Xcv*-Stämmen 82\* und 82\* $\Delta$ lon (C).** Die Bakterien wurden mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4, 0,04 und 0,004 inokuliert. Die Abbildung zeigt Blätter, die 48 Stunden nach der Infiltration gebleicht wurden.

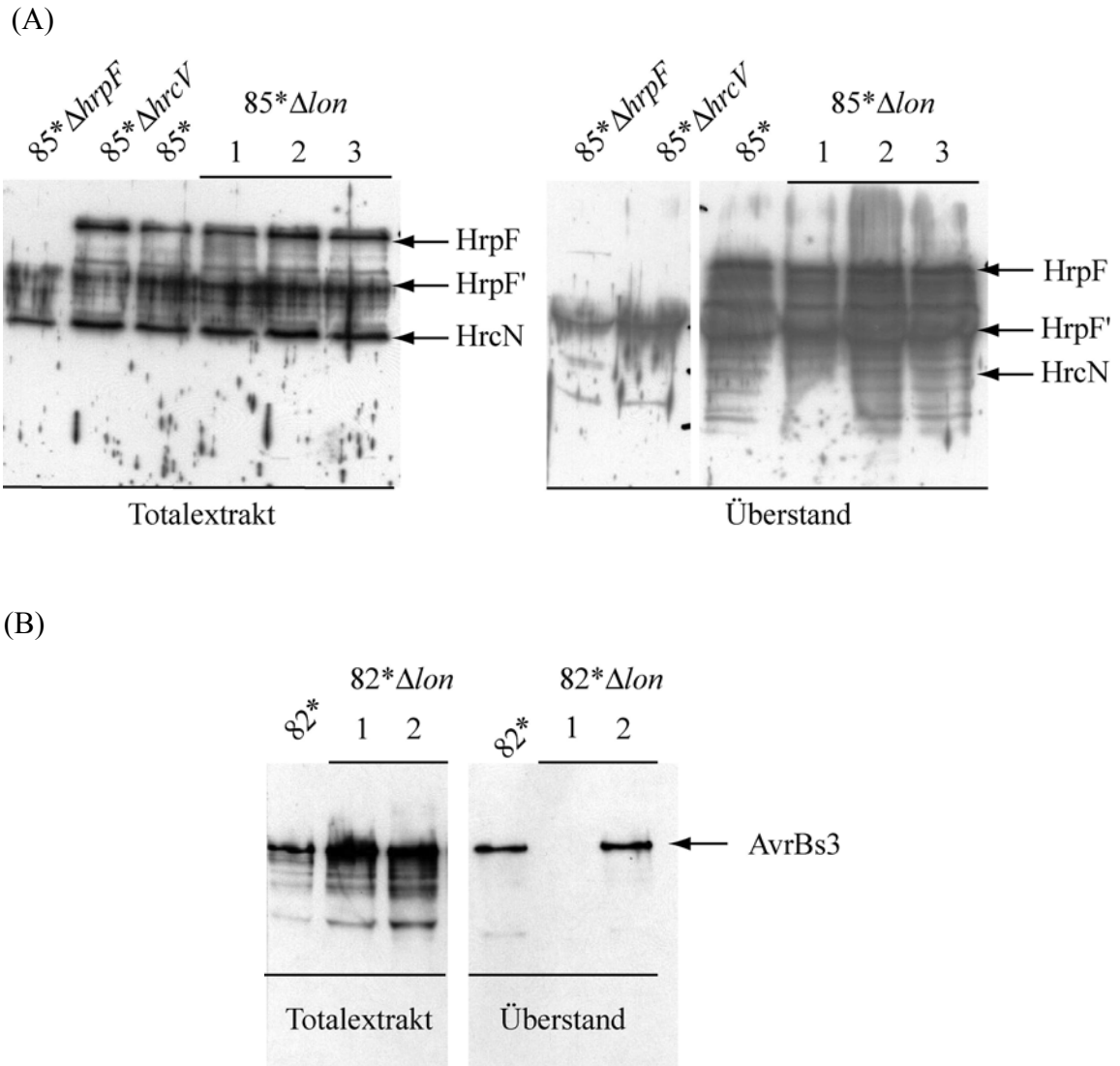
### 3.2.4. Einfluss der *lon*-Mutation auf die Typ III-Sekretion von Proteinen

Mit Hilfe des *in vitro*-Sekretionstests (Kapitel 2.21.) sollte untersucht werden, ob die Mutation des *lon*-Gens einen Einfluss auf die Sekretion bzw. die sekretierte Menge der Proteine HrpF und AvrBs3 ausübt.

In den Abbildungen 14(A) und (B) sind die Western Blot-Analysen der *in vitro*-Sekretionstests von drei Transkonjuganden des Stamms 85\* $\Delta lon$  und zwei Transkonjuganden von 82\* $\Delta lon$  dargestellt. Abbildung 14(A) zeigt, dass kein Unterschied in der detektierten Proteinmenge von HrpF im Totalextrakt der Zellen zwischen dem Wildtyp 85\* und der Mutante 85\* $\Delta lon$  besteht. HrpF tritt im Western Blot immer als Doppelbande auf, da das polyklonale Antiserum gegen HrpF spezifisch mit zwei Proteinen (ca. 100 und ca. 70 kDa) reagiert. Hierbei wird angenommen, dass die kleinere Bande eine prozessierte Form von HrpF darstellt (Büttner *et al.*, 2002). Auch im Überstand der Bakterienkulturen ist kein Unterschied zwischen den HrpF-Proteinmengen von 85\* und 85\* $\Delta lon$  festzustellen.

Der *Xcv*-Stamm 82\* exprimiert das Avirulenzprotein AvrBs3. Auch in diesem Fall konnte im Sekretionstest kein Unterschied zwischen den sekretierten Proteinmengen der Stämme 82\* und 82\* $\Delta lon$  festgestellt werden (Abbildung 14(B)). Im Falle von 82\* $\Delta lon$ -1 konnte aus ungeklärter Ursache in diesem Versuch keine Sekretion von AvrBs3 nachgewiesen werden.





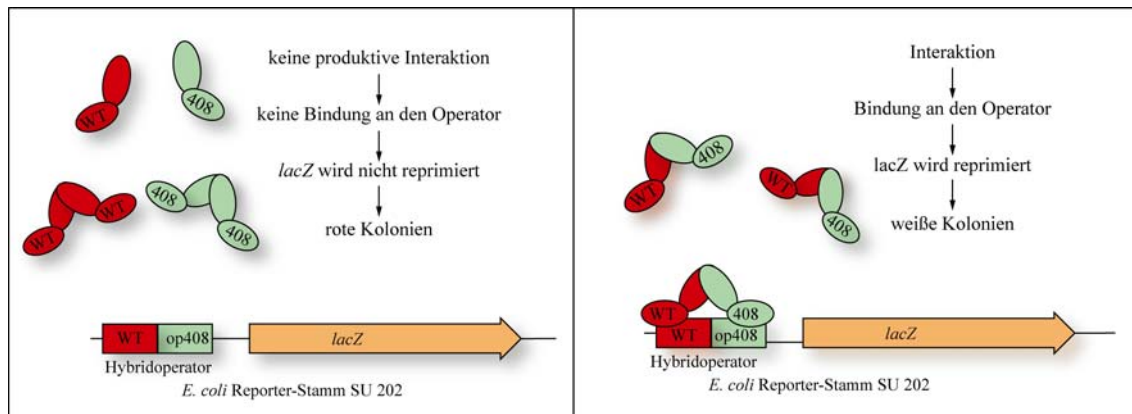
**Abbildung 14: Western Blot-Analyse der *in vitro*-Sekretionsanalysen von  $85^*\Delta lon$  und  $82^*\Delta lon$ .** (A)  $85^*\Delta lon$  sekretiert HrpF im selben Maße wie der Wildtyp. Gleiche Mengen an Protein-Totalextrakt und Überstand wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit  $\alpha$ -HrpF analysiert;  $85^*\Delta hrpF$ : Deletion von *hrpF*;  $85^*\Delta hrcV$ : Mutante ist durch die Deletion des *hrcV*-Gens nicht in der Lage, Proteine Typ III-abhängig zu sekretieren. Als Lysis-Kontrolle diente das im Zytoplasma lokalisierte HrcN-Protein. (B)  $82^*\Delta lon$  und  $82^*$  sekretieren vergleichbare Mengen an AvrBs3. Derselbe Blot wurde auch mit einem HrcN-spezifischen Antikörper behandelt, um lysierte Bakterienzellen im Überstand auszuschließen (nicht dargestellt).

### 3.3. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine mit Hilfe des *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems

#### 3.3.1. Kurze Einführung in das bakterielle Dihybridsystem

Ein bakterielles Dihybridsystem wurde bisher noch nicht für Interaktionsstudien integraler Membranproteine eingesetzt. Mit dem hier gewählten *lexA*-basierenden Dihybridsystem erschien es möglich, sowohl Homo- als auch Heterodimerisierungen des vollständigen Proteins in der natürlichen zytoplasmatischen *E. coli*-Membran – anders als bei Hefe-Dihybridsystemen – zu testen. Interaktionsstudien integraler Membranproteine im Hefe-Dihybridsystem zeigen hierbei einen eher geringen Erfolg. Um eine Proteininteraktion detektieren zu können, müssen die Proteine in den Zellkern transportiert werden. Membranproteine, die unlöslich sind oder, sofern sie nicht in der Membran lokalisiert sind, Aggregate bilden, können nicht in den Zellkern transportiert werden; Interaktionen sind dann nicht feststellbar. Ein weiterer Vorteil des bakteriellen Dihybridsystems ist auch die einfachere Handhabung und der schnellere Erhalt von Ergebnissen.

Das in dieser Arbeit verwendete *lexA*-basierende bakterielle Dihybridsystem wird zur Untersuchung von Selbstinteraktionen und Interaktionen zwischen zwei Proteinen genutzt. Hierzu stehen die Plasmide pMS604 und pDP804 und die *E. coli*-Stämme SU101 und SU202 zur Verfügung (Abbildung 15) (Dmitrova *et al.*, 1998). Das Plasmid pDP804 kodiert eine mutierte LexA<sub>1-87</sub>408-Jun-Zipper-Fusion, das Plasmid pMS604 eine LexA<sub>1-87</sub>WT-Fos-Zipper-Fusion unter der Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Das LexA-Fragment beinhaltet die DNA-bindende Domäne, die auf den Plasmiden sowohl als Wildtyp (LexA<sub>1-87</sub>WT) als auch in mutierter Form (LexA<sub>1-87</sub>408) vorliegt. Als Positivkontrolle für die Protein-Protein-Wechselwirkungen tragen die beiden Plasmide jeweils den Fos- und Jun-Leucin-Zipper, eine eukaryotische Dimerisierungsdomäne.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des bakteriellen Dihybridsystems im Reporterstamm SU202.**

Die *E. coli*-Reporterstämme SU101 und SU202 besitzen ein in das Chromosom integriertes *lacZ*-Gen, dessen Promotor mit einem *lexA*-Hybridoperator überlappt. Die LexA-Domänen binden spezifisch an ihre jeweilige Operatorhälfte. Der Hybridoperator des Stammes SU101 besteht aus zwei Wildtyphälften, während der Operator des Stammes SU202 eine Wildtyphälfte und eine mutierte Hälfte besitzt. Mit dem Stamm SU101 können in Kombination mit dem Plasmid pMS604 (*LexA*<sub>1-87</sub>WT) daher Selbstinteraktionen der Proteine getestet werden.

Für Interaktionsstudien zwischen zwei verschiedenen Proteinen werden der Stamm SU202 und die Kombination beider Plasmide (pMS604 und pDP804) benötigt. Interagieren zwei Proteine miteinander, kommen die beiden unterschiedlichen LexA-Domänen so eng zusammen, dass sie an den Operator in SU202 binden können (Abbildung 15). Die LexA-Wildtyp-Domäne bindet an die rechte Hälfte des Operators, die mutierte LexA408-Domäne an die linke, ebenfalls mutierte Operatorhälfte. Durch die Bindung an den Operator wird das *lacZ*-Gen reprimiert. Interaktionen zwischen den Proteinen können anhand dieser transkriptionellen Repression des *lacZ*-Gens auf MacConkey-Indikatorplatten festgestellt werden. Interagieren die Proteine, wird ein Komplex gebildet, der an den Operator binden kann; die Expression von *lacZ* wird reprimiert. Die Bakterien können die Laktose im Medium nicht verwerten, es entsteht keine pH-Absenkung, die Kolonien bleiben weiß. Weiße Kolonien zeigen somit eine Interaktion an, wohingegen rote Kolonien negativ zu bewerten sind.

Interagieren die Proteine nicht miteinander, erfolgt keine Bindung an den Operator und das *lacZ*-Gen wird exprimiert. Die Zellen sind dann in der Lage, die im MacConkey-

Medium vorhandene Laktose abzubauen, und es entsteht eine pH-Absenkung im Medium. Liegt der pH-Wert unter 6,8, nehmen die Zellen durch den pH-Indikator Neutralrot, der dem Medium zugesetzt ist, eine rötliche Färbung an.

### 3.3.2. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine

Um Informationen über den Aufbau des Typ III-Sekretionssystems zu erhalten, wurden Interaktionen zwischen den konservierten Hrc-Proteinen unter Verwendung des oben beschriebenen bakteriellen Dihybridsystems untersucht.

Hierzu wurden die konservierten Gene des *hrp*-Genclusters (*hrcJ*, *hrcL*, *hrcN*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*) sowie *hrpD5* in die Vektoren pMS604 und pDP804 kloniert. Die Proteine wurden dadurch C-terminal an LexA fusioniert. HrcC wurde nicht getestet, da davon ausgegangen werden konnte, dass dieses Protein der äußeren Membran nicht korrekt falten würden. HrcU und HrcV gehören zu den integralen Membranproteinen des Typ III-Apparates, und beide Proteine besitzen laut Vorhersage große zytoplasmatische C-terminale Bereiche. Diese Bereiche könnten als Interaktionspartner für andere lösliche Proteine dienen. Aufgrund dessen wurden von *hrcU* und *hrcV* mittels PCR verkürzte Versionen erzeugt. Das Gen *hrcV*<sub>Δ1-326</sub> kodiert für den vorhergesagten C-terminalen zytoplasmatischen Bereich von Aminosäure 327 bis 645 (HrcV<sub>C</sub>). Von HrcU wurden zwei unterschiedliche Versionen erzeugt, da HrcU im C-Terminus eine proteolytische Spaltstelle besitzt, die bei den homologen HrcU-Proteinen konserviert ist und den C-Terminus in zwei Fragmente teilt (Lavander *et al.*, 2002; Minamino und Macnab, 2000). Das Gen *hrcU*<sub>Δ1-205</sub> kodiert für den gesamten zytoplasmatischen C-terminalen Bereich des Proteins von Aminosäure 206 bis 357 (HrcU<sub>CN</sub>), während *hrcU*<sub>Δ1-264</sub> für den C-Terminus ab der Spaltstelle kodiert (HrcU<sub>CC</sub>). Auch HrcR gehört zu den integralen Membranproteinen und bildet, laut Vorhersage und nach Vergleichen mit homologen Proteinen, einen großen „Loop“, eine so genannte Schleife, im Zytoplasma aus. Um diesen Bereich des Proteins auf Interaktionen testen zu können, wurde mittels PCR ein Genfragment amplifiziert, das nur den Bereich von Aminosäure 77 bis 155 kodiert, *hrcR*<sub>77-155</sub>.

Zuerst wurden alle Proteine auf Selbstinteraktion getestet. Hierfür wurden die erhaltenen Vektorderivate pMS-*hrcJ*, pMS-*hrcL*, pMS-*hrcN*, pMS-*hrcU*, pMS-*hrcU*<sub>CN</sub>, pMS-*hrcU*<sub>CC</sub>, pMS-*hrcV*, pMS-*hrcV*<sub>C</sub>, pMS-*hrcQ*, pMS-*hrcR*, pMS-*hrcR*<sub>73-155</sub>, pMS-

*hrcS* und *pMS-hrpD5* in den Stamm SU101 transformiert, auf MacConkey-Indikatorplatten inkubiert und nach 24 Stunden ausgewertet. Tabelle 2 zeigt die gegeneinander getesteten Proteine und ihre Interaktionen. Selbstinteraktionen konnten bei den Proteinen HrcL und HrcN festgestellt werden. Es wurden reproduzierbar weiße Kolonien erhalten. Auch konnte eine Selbstinteraktion des C-terminalen zytoplasmatischen Bereichs des Proteins HrcV detektiert werden. Die Selbstinteraktion von HrcV<sub>C</sub> war allerdings im Vergleich zu den beiden anderen Interaktionen schwächer einzustufen.

Lokalisation	PP	CP	CP	CM	CM	CP	CP	CM	CP	CP	CM	CP	CM	CM
	HrcJ	HrcL	HrcN	HrcT	HrcU	HrcU <sub>CN</sub>	HrcU <sub>CC</sub>	HrcV	HrcV <sub>C</sub>	HrcQ	HrcR	HrcR <sub>73-155</sub>	HrcS	HrpD5
HrcJ	-													
HrcL		++												
HrcN			++											
HrcT				-										
HrcU					-									
HrcU <sub>CN</sub>						-								
HrcU <sub>CC</sub>							-							
HrcV								-						
HrcV <sub>C</sub>									+					
HrcQ										-				
HrcR											-			
HrcR <sub>73-155</sub>												-		
HrcS													-	
HrpD5														-

**Tabelle 2: Test der Proteine (exprimiert vom Vektor pMS604) auf Homodimerisierung.** -: keine Interaktion, +: Interaktion; ++: starke Interaktion; PP: Periplasma, CM: zytoplasmatische Membran; CP: Zytoplasma; HrcU<sub>CN</sub>: HrcU<sub>Δ1-205</sub>; HrcU<sub>CC</sub>: HrcU<sub>Δ1-264</sub>; HrcV<sub>C</sub>: HrcV<sub>Δ1-326</sub>.

---

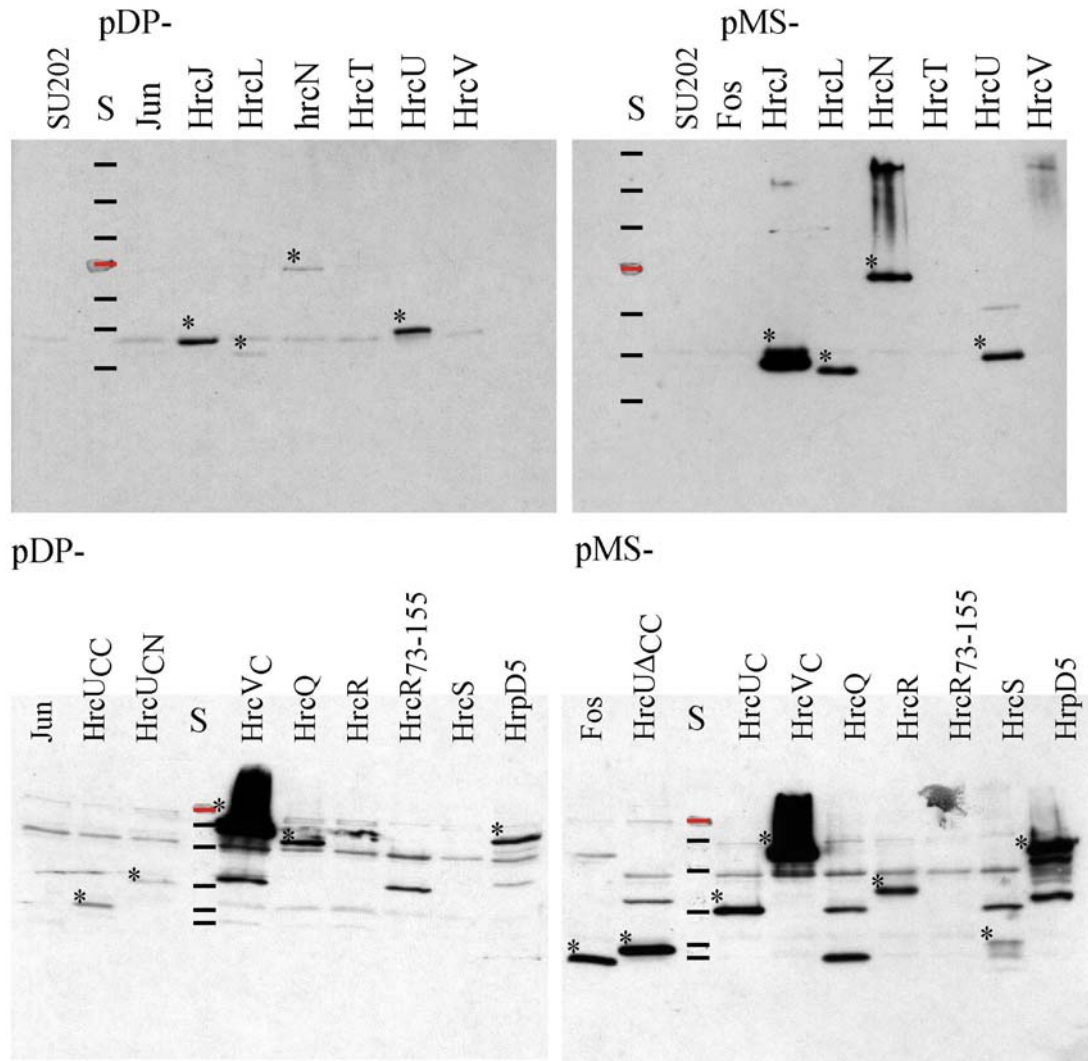
Nach dem Test auf Selbstinteraktion wurden alle Proteine paarweise gegeneinander auf Heterodimerisierung getestet. Hierzu wurden die durch Klonierung erhaltenen pMS- und pDP-Derivate in den *E. coli*-Stamm SU202 transformiert, ebenfalls auf MacConkey-Indikatorplatten inkubiert und nach 24 Stunden ausgewertet. In Tabelle 3 sind alle gegeneinander getesteten Proteine aufgelistet.

Die Selbstinteraktionen von HrcL und HrcN konnten wiederum detektiert werden. Im Weiteren konnten schwächere Interaktionen zwischen den Proteinen HrcL (pMS-*hrcL*) und HrcN (pDP-*hrcN*) beobachtet werden. Diese Interaktionen kamen nicht zustande, wenn die Proteine vom jeweils anderen Vektor exprimiert wurden, also in der Konstellation pDP-*hrcL* und pMS-*hrcN*. Dies könnte an der geringeren Kopienzahl des Vektors pDP804 im Vergleich zum Vektor pMS604 liegen (Dmitrova *et al.*, 1998). Eine sehr schwache Interaktion konnte auch zwischen den C-terminalen zytoplasmatischen Bereichen der Proteine HrcU und HrcV (pMS-*hrcV<sub>C</sub>* - pDP-*hrcU<sub>CC</sub>*) beobachtet werden. Aber auch in diesem Fall konnte die Interaktion nur in dieser Konstellation festgestellt werden. Auch die Selbstinteraktion von HrcV<sub>C</sub> konnte im Stamm SU202 mit den Vektorderivaten pMS-*hrcV<sub>C</sub>* und pDP-*hrcV<sub>C</sub>* nicht detektiert werden. Auch hier könnte es an den unterschiedlichen Expressionsmengen der Proteine liegen, die eine schwache Interaktion nicht nachzuweisen erlauben.

Lokali- sation	PP	CP	CP	CM	CM	CP	CP	CM	CP	CP	CM	CP	CM	CM
	HrcJ	HrcL	HrcN	HrcT	HrcU	HrcU CN	HrcU CC	HrcV	HrcV C	HrcQ	HrcR	HrcR 73-155	HrcS	HrpD5
HrcJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcL	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcN	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcU CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcU CC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
HrcV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcV C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcR 73-155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrcS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HrpD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 3: Test der Proteine (exprimiert von den Vektoren pMS604 und pDP804) auf Heterodimerisierung.** -: keine Interaktion, +: Interaktion; ++: starke Interaktion; PP: Periplasma, CM: zytoplasmatische Membran; CP: Zytoplasma; HrcU<sub>CN</sub>: HrcU $_{\Delta 1-205}$ ; HrcU<sub>CC</sub>: HrcU $_{\Delta 1-264}$ ; HrcV<sub>C</sub>: HrcV $_{\Delta 1-326}$ .

Um die Expression des jeweiligen Proteins zu kontrollieren, wurden alle vorhandenen pMS- und pDP-Derivate im Stamm SU202 in LB-Flüssigmedium angezogen. Durch vorherige Messung der OD<sub>600</sub> der jeweiligen Bakterienkulturen wurde sichergestellt, dass Extrakte mit möglichst gleicher Konzentration an Proteinen aufgetragen werden (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Expression der B2H-pMS- und pDP-Derivate im *E. coli*-Stamm SU202.** Protein-Gesamtextrakt von IPTG-induzierten Kolonien wurde in 10 (Blot 1-2) und 12%-igen (Blot 3-4) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, geblottet und mit  $\alpha$ -LexA-Antikörper inkubiert. Die zu den angegebenen Proteinen korrespondierenden Banden sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet; S: Proteingrößen-Standard in kDa (182, 116, 82, 64 (rot), 49, 37, 26, 19, 13). Aufgetragen wurden 10  $\mu$ l pro Kultur (entspricht ca.  $10^8$  cfu); HrcUCN: HrcU $_{\Delta 1-205}$ ; HrcUCC: HrcU $_{\Delta 1-264}$ ; HrcVC: HrcV $_{\Delta 1-326}$ .

In Tabelle 4 sind alle untersuchten Proteine und ihre jeweiligen molekularen Größen dargestellt. Spalte 2 gibt die erwartete Größe im Western Blot wieder.



Proteine (kDa)	Erwartete Proteingröße des LexA- Fusionsproteins in kDa	Proteine detektierbar mit $\alpha$ -LexA exprimiert von	
		pDP804	pMS604
Jun-Zipper (3,9)	13,6	-	
Fos-Zipper (3,9)	13,6		*
HrcJ (27,2)	36,9	*	*
HrcL (25,2)	34,9	* (schwach)	*
HrcN (47,7)	57,4	*	*
HrcQ (27,8)	37,5	*	*
HrcR (23,2)	32,9	-	*
HrcR <sub>73-155</sub> (8,5)	18,2	-	-
HrcS (8,9)	18,6	-	* (schwach)
HrcT (29,0)	38,7	-	-
HrcU (38,9)	48,6	*	*
HrcU <sub>C</sub> (16,6)	26,3	* (schwach)	*
HrcU <sub>CC</sub> (10,1)	19,8	* (schwach)	*
HrcV (69,9)	79,6	-	-
HrcV <sub>C</sub> (34,6)	44,3	*	*
HrpD5 (33,6)	43,3	*	*

**Tabelle 4: Auswertung der Western Blot-Analysen.** \*: Protein detektiert, -: Protein nicht detektiert.

Obwohl die als Kontrolle genutzten Proteine Fos- und Jun-Zipper in den Vektoren pMS604 (LexA<sub>1-87</sub>WT-Fos-Zipper) und pDP804 (LexA<sub>1-87</sub>408-Jun-Zipper) im bakteriellen Dihybridsystem immer ein positives Ergebnis ergaben (weiße Kolonien), konnte selbst das mit LexA fusionierte Jun-Zipper-Protein im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Das Fos-Protein aus pMS604 ist dagegen sehr gut als Bande zu erkennen (Abbildung 16, Blot 4, Spur 1). Die Proteine HrcJ, HrcU, HrcV<sub>V</sub> und HrpD5 konnten unabhängig vom Vektor detektiert werden. HrcU (Blot 1 und 2, jeweils Spur 8)

ist mit einer detektierten Größe von ca. 37 kDa etwa 10 kDa zu klein. Hierbei kann vermutet werden, dass das Protein während der Induktionszeit abgebaut wurde oder ein aberrantes Laufverhalten aufweist. Ein Hinweis auf einen Abbau des Proteins wäre die schon angesprochene Spaltstelle im C-Terminus. Bei den homologen Proteinen FlhB und YscU konnte gezeigt werden, dass vom Protein aufgrund der proteolytischen Spaltung ein ca. 10 kDa großes Fragment vom C-Terminus abgetrennt wird (Lavander *et al.*, 2002; Minamino und Macnab, 2000). Die Proteine HrcL, HrcU<sub>CN</sub>, HrcU<sub>CC</sub> und HrcR waren nur nach Expression vom Vektors pMS804 gut nachweisbar. Bei einer Expression mit pDP604 konnten nur sehr schwache Banden, im Fall von HrcR keine Bande nachgewiesen werden. HrcS ließ sich selbst unter Kontrolle des Vektors pMS804 nur sehr schwach nachweisen. Die Proteine HrcR<sub>73-155</sub>, HrcT und HrcV konnten im Western Blot nicht detektiert werden.

Im Fall von HrcQ sind bei einer Expression mit pMS804 zwei Banden deutlich sichtbar, die aber beide eine zu geringe Größe haben (ca. 25 kDa und ca. 14 kDa; Blot 4, Spur 6). Da die verwendeten Plasmidkonstrukte nicht vollständig sequenziert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch einen Sequenzfehler ein vorzeitiges Stoppcodon und somit ein Abbruch entstanden ist. HrcQ, exprimiert mit dem Vektor pDP604, zeigt eine Bande in der richtigen Größe (Blot 3, Spur 6).

### 3.3.3. Modifizierung der Vektoren pMS604 und pDP804

In den Vektoren pMS604 und pDP804 werden die zu untersuchenden Gene C-terminal an das *lexA*-Gen fusioniert. Es sollte untersucht werden, ob die Lage von LexA eventuell die Interaktionen und die Anlagerung an den Operator beeinflusst. Da es sich bei der Mehrzahl der Fälle um Membranproteine handelt, könnte die C-terminale Fusion nicht korrekt in die Membran – wenn überhaupt – assembliert worden sein.

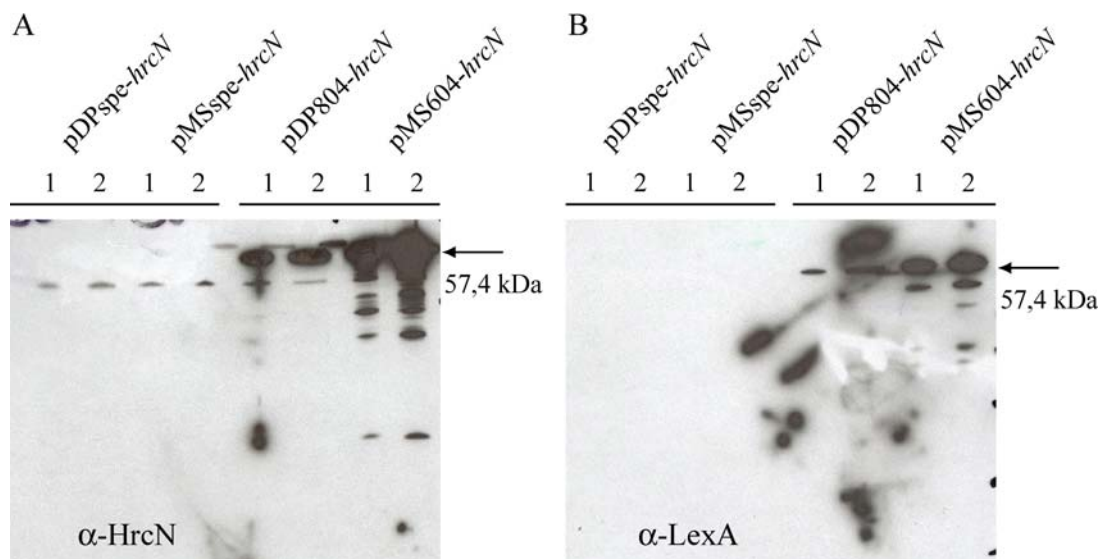
Hierfür wurden die Vektoren so modifiziert, dass durch die Einführung eines Stoppcodons am 3'-Ende von *lexA* und die Generierung einer multiplen Klonierungsstelle am 5'-Ende die zu untersuchenden Gene N-terminal an LexA fusioniert werden könnten. Es entstanden die Vektoren pMSspe und pDPspe, wobei „spe“ für den neu eingefügten Restriktionsort *SpeI* steht.

Zu Beginn wurden die Gene *hrcL*, *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU* und *hrcV* jeweils in die Vektoren pMSspe und pDPspe kloniert und sowohl im Stamm SU101 als auch im

Stamm SU202 getestet. Als Positivkontrolle diente die Interaktion von HrcN, da diese in allen vorhergehenden Versuchen gut detektiert werden konnte.

Mit den neu generierten Vektoren pMSspe und pDPspe konnten im bakteriellen Dihybridsystem keine Interaktionen detektiert werden. Auch die als Positivkontrolle gedachte Selbstinteraktion von HrcN konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

Um eine Aussage über die Stärke der Expression der Proteine in den Vektoren pMSspe und pDPspe zu erhalten, wurden die Konstrukte pMSspe-*hrcN* und pDPspe-*hrcN* im *E. coli*-Stamm SU202 angezogen. Die Immunoblotanalyse erfolgte mit den Antikörpern  $\alpha$ -HrcN und  $\alpha$ -LexA. Als Positivkontrolle dienten die ursprünglichen pMS604-*hrcN*- und pDP-*hrcN*-Derivate, die schon im Western Blot detektiert werden konnten (Abbildung 16). Von jedem Konstrukt wurden zwei voneinander unabhängige Klone für die Analyse verwendet. Membran A (Abbildung 17(A)) wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ -HrcN, Membran B (Abbildung 17(B)) mit  $\alpha$ -LexA inkubiert.



**Abbildung 17: Das Fusionsprotein HrcN-LexA, exprimiert von den Vektoren pMSspe und pDPspe.** Die Bakterienkulturen wurden bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 geerntet; es wurden jeweils gleiche Proteinmengen auf die Gele aufgetragen; die Membranen wurden mit den Antikörpern  $\alpha$ -HrcN (A) und  $\alpha$ -LexA (B) inkubiert.

Es ist zu erkennen, dass keiner der neu generierten Vektoren pMSspe und pDPspe in der Lage ist, die Proteine zu exprimieren. Es konnte weder LexA noch HrcN detektiert werden. Die ursprünglichen Vektoren zeigen dagegen eine deutliche Expression der Proteine. Das Fusionsprotein LexA-HrcN konnte mit beiden Antikörpern nachgewiesen

werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die neu generierten Vektoren pMSspe und pDPspe nicht in der Lage sind, die Fusionsproteine zu exprimieren. Da die Richtigkeit der durch PCR und Klonierung neu entstandenen Übergänge durch DNA-Sequenzierung kontrolliert wurde, liegen die Gründe möglicherweise in einem Sequenzfehler weiter stromabwärts. Da die Promotorregion nicht verändert wurde, kann eine ineffiziente Translationsinitiation der Grund für die fehlende Expressierung sein.

### **3.4. Topologiestudien der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine des Typ III-Sekretionssystems**

Die Proteine HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5 sind laut Vorhersage Proteine der inneren Membran (Hueck, 1998). Über ihre Lage und Orientierung in der Membran von *Xcv* lagen bisher keine experimentellen Daten vor. Für drei homologe *Yersinia*-Proteine (YscU, YscV (LcrD) und YscR) liegen Topologiemodelle vor, die allerdings mit sehr wenigen PhoA-Insertionen erstellt wurden (Allaoui *et al.*, 1994; Fields *et al.*, 1994; Plano *et al.*, 1991).

Wichtige Schritte zur Strukturaufklärung integraler Membranproteine sind die Analyse der Topologie, d.h. die Bestimmung der Anzahl transmembraner Segmente und ihre Orientierung in der bakteriellen Membran. Mit Hilfe verschiedener Vorhersageprogramme können Modelle erstellt werden, um eine erste Vorstellung von einem bestimmten Protein zu erlangen. Diese Modelle bedürfen jedoch der experimentellen Verifizierung.

#### **3.4.1. Hauptmerkmale der vorhergesagten inneren Membranproteine des Typ III-Sekretionssystems**

Die hier untersuchten Proteine des TTSS umfassen sämtliche vorhergesagten Proteine in der inneren Membran und besitzen sowohl Homologien zu Proteinen pflanzen- und tierpathogener Bakterien - mit Ausnahme von HrpD5 - als auch zu Proteinen des Flagellumexportapparates. Die Proteine sind stark hydrophob und besitzen keine typische N-terminale Signalsequenz. Ihre Hauptmerkmale sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Protein	Länge (Aminosäuren)	Molekulare Masse (kDa)	Isoelektrischer Punkt	Hydrophobizität in %
<b>HrcR</b>	212	23,2	8,8	50%
<b>HrcS</b>	86	8,9	4,6	60%
<b>HrcT</b>	276	29,0	4,8	67%
<b>HrcU</b>	357	38,9	6,6	44%
<b>HrcV</b>	645	69,9	7,0	45%
<b>HrpD5</b>	312	33,6	5,5	39%

**Tabelle 5: Hauptmerkmale der sechs vorhergesagten inneren Membranproteine von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.**

### 3.4.2. Computergestützte Topologievorhersagen

Um eine Vorstellung von der Topologie der sechs Proteine zu erhalten, wurden Vorhersagen mit fünf unterschiedlichen Computerprogrammen erstellt (TMHMM, HMMTOP, MEMSAT, TOPPRED, PHD; Kapitel 2.25.1.). Alle fünf Programme sagen Anzahl und Orientierung von transmembranen  $\alpha$ -Helices voraus. TMHMM und HMMTOP benutzen Hidden-Markov-Modelle, um die „Architektur“ eines integralen Membranproteins zu beschreiben, während die Vorhersage von PHD auf neuronalen Netzwerken basiert. MEMSAT benutzt einen dynamischen Algorithmus, um die vorgegebene Polypeptidkette bestmöglich mit Topologiemodellen in Einklang zu bringen. TOPPRED identifiziert „sichere“ und „putative“ transmembrane  $\alpha$ -Helices mittels Hydrophathieanalysen und wählt, basierend auf der „positive inside“-Regel, die wahrscheinlichste Topologie aus. Alle fünf Modelle benutzen in ihrer Vorhersage die bekannte asymmetrische Verteilung der Aminosäuren zwischen der *cis*- und der *trans*-Seite der Membran.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Algorithmen, die von diesen Programmen benutzt werden, ergaben sich auch in den meisten Fällen sehr unterschiedliche Topologievorhersagen für die Proteine. Daher ist die Verlässlichkeit einer Topologievorhersage am höchsten, wenn mehrere Programme in ihrer Aussage übereinstimmen (Drew *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2000).

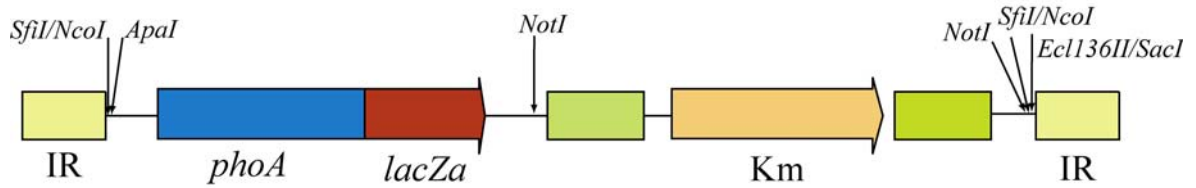
Für die hier untersuchten sechs Membranproteine des Typ III-Sekretionsapparates von *Xcv* wurde nur für HrcR und HrcS von allen Programmen dieselbe Anzahl an transmembranen  $\alpha$ -Helices vorhergesagt (siehe Tabelle 6). Allerdings unterschieden sie sich in der vorhergesagten Orientierung, also der Lage des N-Terminus. Bei allen anderen Proteinen variierten sowohl die Anzahl der vorhergesagten transmembranen Segmente als auch deren Orientierung.

Protein	TOPPRED	TMHMM	HMMTOP	MEMSAT	PHD
<b>HrcR</b>	4 TMS - P	4 TMS - Z	4 TMS - Z	4 TMS - Z	4 TMS - Z
<b>HrcS</b>	2 TMS - Z	2 TMS - P	2 TMS - Z	2 TMS - P	2 TMS - Z
<b>HrcT</b>	5/6 TMS - Z/P	5 TMS - Z	6 TMS - P	6 TMS - P	7 TMS - P
<b>HrcU</b>	4 TMS - Z	3 TMS - Z	4 TMS - Z	4 TMS - Z	4 TMS - Z
<b>HrcV</b>	8 TMS - Z	7 TMS - Z	8 TMS - Z	8 TMS - Z	6 TMS - P
<b>HrpD5</b>	2 TMS - P	löslich	1 TMS - P	1 TMS - P	1 TMS - Z

**Tabelle 6: Vorhersagen fünf unterschiedlicher Computerprogramme zur Topologie von Membranproteinen.** TMS: transmembrane Segmente; Z: N-Terminus liegt im Zytoplasma; P: N-Terminus liegt im Periplasma.

### 3.4.3. Das duale Reportersystem

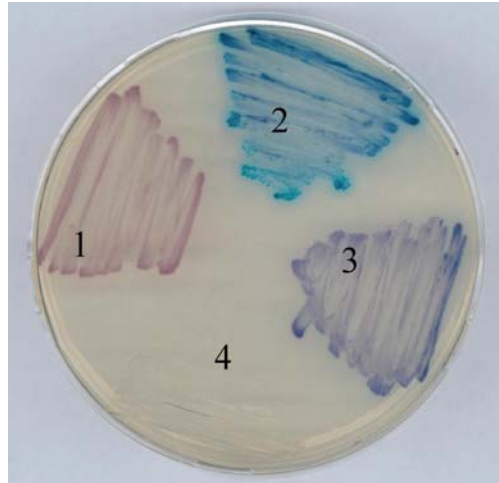
Um die Topologie der Proteine experimentell zu ermitteln, wurde eine *in vitro*-Transposonmutagenese mit dem mini-Tn5-Derivat *Tnpholac1* (Abbildung 18) (Alexeyev und Winkler, 2002) durchgeführt. *Tnpholac1* besitzt einen dualen *pho-lac*-Reporter, der mit dem zu untersuchenden Gen fusioniert wird. Der Reporter besteht aus einem Fusionsgen zwischen *phoA*, welches für die bakterielle alkalische Phosphatase (PhoA) kodiert, und *lacZ $\alpha$* , das für das  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Das  $\alpha$ -Fragment allein ist allerdings inaktiv. Um eine aktive  $\beta$ -Galaktosidase zu erhalten, wird zusätzlich zum  $\alpha$ -Fragment das  $\omega$ -Fragment benötigt. Nur wenn beide Fragmente interagieren, kann ein aktives Enzym gebildet werden. Dieser Vorgang wird als  $\alpha$ -Komplementation (Weply *et al.*, 1981) bezeichnet. Daher ist es wichtig, dass mit einem *E. coli*-Stamm gearbeitet wird, der zur  $\alpha$ -Komplementation fähig ist, d.h. der das  $\omega$ -Fragment kodiert.



**Abbildung 18: Struktur des Transposons Tnpholac1 im Vektor pMA814.** IR: 19 bp invertierte Sequenzwiederholung, Km: Gen kodiert für Kanamycinresistenz; *phoA*: alkalische Phosphatase, *lacZα*:  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase.

Die Aktivität des Reporters ist abhängig von dessen Lokalisation. PhoA ist nur im Periplasma in der Lage, sich in eine enzymatisch aktive Form zu falten, da nur dort die benötigten Disulfid-Brücken gebildet werden können (Derman und Beckwith, 1991). Die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) ist ein zytoplasmatisches Enzym und kann somit komplementär zu PhoA genutzt werden. Beide Enzyme wurden schon früher als Reporter für die Lokalisierung von integralen Membranproteinen genutzt (Manoil *et al.*, 1990; Silhavy und Beckwith, 1985).

Die Aktivität von PhoA und LacZ kann durch Zugabe chromogener Substrate sichtbar gemacht werden (Abbildung 19). Hierbei dient X-Phos (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) als Enzymsubstrat für PhoA und Rose-Gal (6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) für LacZ. Fusioniert der Reporter an eine periplasmatische Domäne des Proteins, wird PhoA aktiv, und die Bakterienkolonie färbt sich blau. Bei einer Fusion an eine zytoplasmatische Domäne kommt es zur  $\alpha$ -Komplementation und die Kolonien färben sich rot. Es kann auch zur Ausbildung purpurfarbener Kolonien kommen. Hierbei wird angenommen, dass sich der Fusionspunkt in einem transmembranen Segment befindet und beide Enzyme aktiv sind.



**Abbildung 19: Ausfärbung der Kolonien auf dualen Indikatorplatten.** (1) rote Ausfärbung: Fusionspunkt befindet sich in einer zytoplasmatischen Domäne des Proteins; (2) blaue Ausfärbung: Fusionspunkt befindet sich in einer periplasmatischen Domäne des Proteins; (3) purpur: Fusionspunkt befindet sich in einem transmembranen Segment; (4) farblose/weiße Kolonien: kein auswertbarer Fusionspunkt (Insertion in einem anderen Leseraster oder außerhalb des zu analysierenden Gens).

Der Großteil der Kolonien bildet jedoch eine normale weiße Kolonienfärbung aus. Hier ist es wahrscheinlich, dass der Reporter entweder außerhalb des Leserasters des zu untersuchenden Gens oder in einer falschen Orientierung oder außerhalb des Gens in einen anderen Vektorbereich integriert wurde.

#### **3.4.4. Isolierung und Charakterisierung der *in vitro*-Tnpholac1-Fusionskonstrukte**

Die Gene *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, *hrcV* und *hrpD5* wurden zunächst in den Vektor pBAD24 kloniert. In diesem Vektor befinden sich die Gene unter der Kontrolle eines vom *araBAD*-Operon stammenden Promotors, der durch L-Arabinose induzierbar ist. Durch die *in vitro*-Transposonmutagenese mittels Tnpholac1 konnten anschließend Reporterfusionen in pBAD-*hrcT*, pBAD-*hrcU*, pBAD-*hrcV*, pBAD-*hrcR*, pBAD-*hrcS* und pBAD-*hrpD5* erstellt werden. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden auf Indikatorplatten, die die Enzymsubstrate X-Phos und Rose-Gal enthielten, nach Farbe selektiert. Die Insertionsstelle des Transposons wurde durch Kolonie-PCR und Restriktionsverdau kartiert und durch DNS-Sequenzierung bestimmt.



Mittels dieser Methode wurden in drei Proteinen genügend Insertionen erzeugt, um ein Topologiemodell erstellen zu können. Innerhalb der Proteine HrcS, HrcT und HrcU gab es jedoch auch Bereiche, für die keine Transposoninsertionen erhalten wurden. Um Aussagen über diese Proteinsegmente zu erhalten, wurde ein Vektor geschaffen, der eine gezielte Fusion des dualen Reporters erlaubt.

### **3.4.5. Konstruktion und Anwendung des Topologievektors pDT**

Der Vektor pDT ist so konstruiert, dass nach Klonierung eines PCR-amplifizierten Fragments wie beim Transposonderivat *Tn<sub>pholac1</sub>* eine translationale Fusion mit dem dualen Reportergen entsteht. Die generierten Fusionen wurden nach der letzten Aminosäure der fusionierten Proteinkette benannt. Für HrcS wurden drei Proteinfragmente konstruiert. Diese Fragmente hatten folgende Längen: Aminosäure 1-50 (dies entspricht der letzten Aminosäure Serin: S50), 1-80 (L80) und 1-89 (L89). Für HrcT wurde der Bereich von Aminosäure 1-119 (Q119), 1-223 (S223) und 1-229 (I229) und für HrcU der Bereich von 1-134 (S134) untersucht.

Zusammengenommen wurden durch *in vitro*-Transposition mit *Tn<sub>pholac1</sub>* für HrcR 28, HrcS 9, HrcT 25, HrcU 20, HrcV 58 und für HrpD5 21 Insertionen erhalten. Anhand der erhaltenen Fusionspunkte wurden Topologiemodelle der sechs Membranproteine von *Xcv* erstellt.

### **3.4.6. Topologieuntersuchungen**

#### **3.4.6.1. HrcR**

Um eine erste Vorstellung von der Topologie zu bekommen, wurde die Proteinsequenz von HrcR (212 AS) mit fünf unterschiedlichen Vorhersageprogrammen untersucht. In der nachfolgenden Tabelle sind die vorhergesagten Aminosäurebereiche der transmembranen Segmente (TMS) von HrcR aufgelistet.

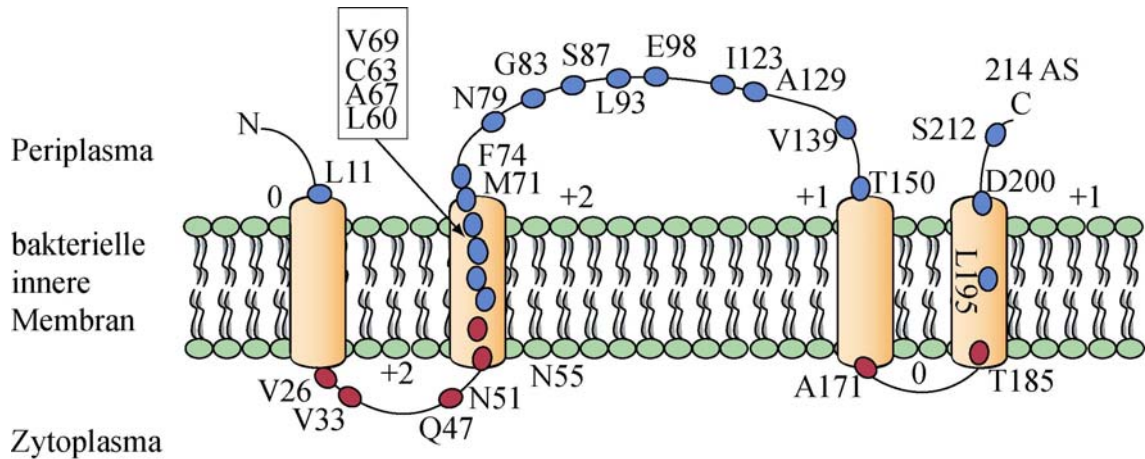
HrcR: 212AS	TMS1	TMS2	TMS3	TMS4	Orientierung
<b>TOPPRED</b>	7-27	51-71	155-175	193-213	P
<b>TMHMM</b>	7-29	52-74	157-179	189-211	Z
<b>HMMTOP</b>	13-37	52-71	155-179	194-213	Z
<b>MEMSAT</b>	7-30	53-70	155-179	193-210	Z
<b>PHD</b>	13-36	52-69	150-169	174-198	Z

**Tabelle 7: Vorhersage der Topologie von HrcR.** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; Z: N-terminus liegt im Zytoplasma, P: N-Terminus liegt im Periplasma.

Alle Vorhersageprogramme gehen von vier Membrangängen aus und lokalisieren bis auf TOPPRED den N-Terminus im Zytoplasma. Die Vorhersagen für das zweite und dritte transmembrane Segment (TMS2 und TMS3) liegen in ähnlichen Bereichen. Während bei TOPPRED, TMHMM und MEMSAT das erste TMS bei Aminosäure sieben beginnt, startet TMS1 bei HMMTOP und PHD sechs Aminosäuren später.

Diese Vorhersage wird durch die experimentellen Daten gestützt. In Anlehnung an diese computergestützten Vorhersagen wurde anhand der Transposoninsertionen ein Topologiemodell von HrcR entworfen (Abbildung 20). Bei HrcR wird von vier TMS ausgegangen. Der N-Terminus des Proteins wird im Periplasma lokalisiert. Daran anschließend befindet sich das erste transmembrane Segment mit einer kurzen Domäne im Zytoplasma. Zwischen dem zweiten und dritten Segment bildet sich ein großer periplasmatischer Loop. Dieser besitzt über die ganze Länge 11 positiv geladene Reste. Ausschlaggebend für den Transport sind aber mit großer Wahrscheinlichkeit die positiven Reste, die sich im Bereich von 20 Aminosäuren nach einem TMS befinden (R. Koebnik, persönliche Auskunft). Somit würden im Ganzen nur drei positive Reste gezählt werden. Nach einem kurzen zytoplasmatischen Loop folgt das vierte und letzte TMS. Ein Beweis für die periplasmatische Lokalisierung des C-Terminus ist die Insertion S212. Diese liegt fast am Ende von HrcR (214 AS) und zeigt eine blaue Koloniausfärbung, also eine Aktivität der alkalischen Phosphatase an.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus im Periplasma lokalisiert sind und vier TMS die zytoplasmatische Membran des Bakteriums durchspannen. Die TMS liegen voraussichtlich in den Aminosäurebereichen 7-27 (TMS 1), 51-71 (TMS 2), 150-170 (TMS 3) und 180-200 (TMS 4).



**Abbildung 20: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcR.** Die Insertionsstellen des dualen *pho-lac*-Reporters sind durch Angaben der Aminosäuren sowie deren Positionen gekennzeichnet. Rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase. Die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich in den jeweiligen zyto- und periplasmatischen Bereichen befinden, ist angegeben. Im Falle des periplasmatischen Loops zwischen TMS2 und TMS3 werden 20 Reste vor und nach einem TMS bei der Ermittlung der positiven Aminosäuren betrachtet.

### 3.4.6.2. HrcS

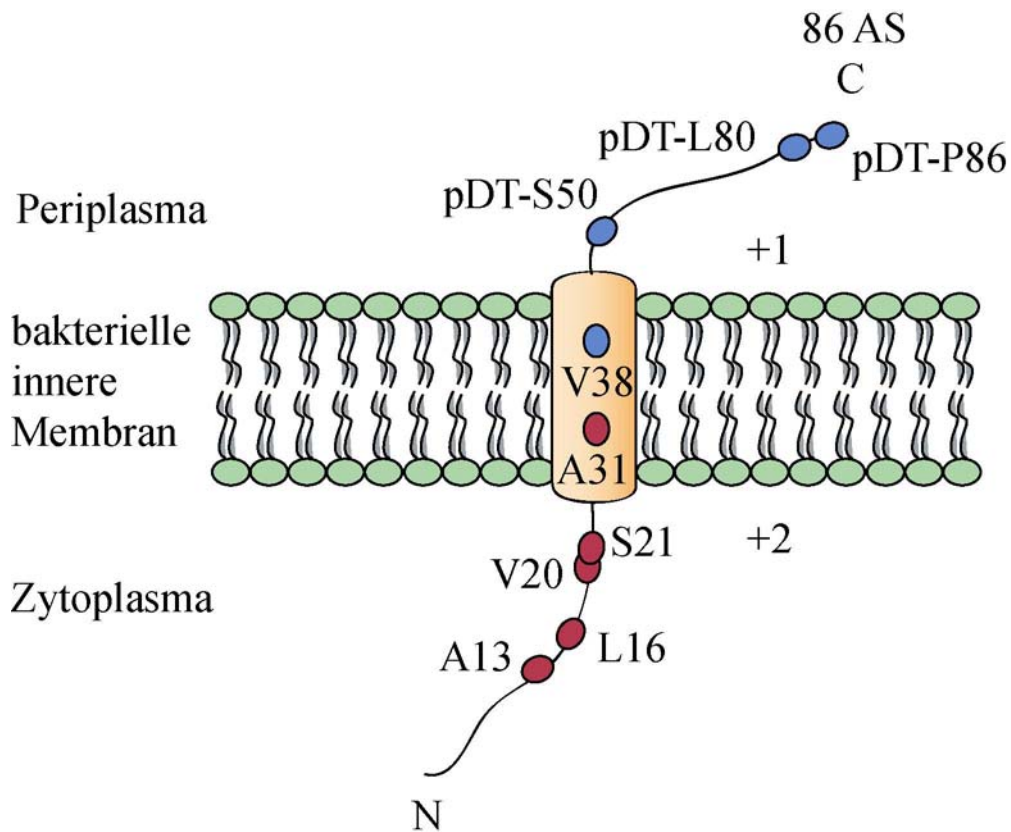
HrcS ist mit 86 Aminosäuren das kleinste der sechs inneren Membranproteine und stark hydrophob. Alle Vorhersagen geben zwei transmembrane Segmente an, die auch etwa im gleichen Bereich liegen, kommen aber hinsichtlich der Orientierung in der Membran zu unterschiedlichen Aussagen.

HrcS: 86 AS	TMS1	TMS2	Orientierung
<b>TOPPRED</b>	20-40	55-75	Z
<b>TMHMM</b>	20-42	55-77	P
<b>HMMTOP</b>	20-42	51-74	Z
<b>MEMSAT</b>	14-38	55-75	P
<b>PHD</b>	16-41	50-77	Z

**Tabelle 8: Vorhersage der Topologie von HrcS.** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; Z: N-terminus liegt im Zytoplasma, P: N-Terminus liegt im Periplasma.

Die Auswertung der Insertionen in HrcS führte zu einem Topologiemodell mit nur einem transmembranen Segment (Abbildung 21); der N-Terminus befindet sich im

Zytoplasma. Die Insertionen S50, L80 und L86 wurden mit Hilfe des Vektors pDT erstellt und zeigten alle eine Aktivität der alkalischen Phosphatase. Somit ist auszuschließen, dass die Polypeptidkette einen zweiten Transmembrangang aufweist. Die Insertionen A31 und V38 liegen sehr nahe zusammen und zeigen trotzdem eine unterschiedliche Ausfärbung an. Dass es zu keiner Mischpopulation und somit eventuell zur Ausbildung purpurfarbener Kolonien kommt, könnte an den in der Sequenz enthaltenen Informationen liegen. Im Falle der Insertion V38 ist bereits ein ausreichend langer Bereich des TMS vorhanden, um die anschließende Polypeptidkette durch die Membran zu translozieren. Dagegen liegt beim Konstrukt A31 der Fusionspunkt zu weit im N-terminalen Bereich des putativen TMS, so dass eine Translokation nicht erfolgen konnte. Das TMS liegt voraussichtlich im Aminosäurebereich 25 bis 45.



**Abbildung 21: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcS.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich im Bereich von 20 Aminosäuren vor und nach einem TMS befinden, ist angegeben.

### 3.4.6.3. HrcT

Für HrcT werden sehr unterschiedliche Topologien vorhergesagt. Die einzige Gemeinsamkeit der Vorhersage ist die Lokalisierung des N-Terminus im Periplasma. TOPPRED geht von fünf bis sechs transmembranen Segmenten aus, wobei das zweite Segment nicht als „sicher“, sondern nur als „putativ“ eingestuft wird. TMHMM sagt nur fünf transmembrane Segmente voraus, das vermutete zweite Segment wird nicht vorhergesagt. HMMTOP und MEMSAT gehen allerdings wiederum von sechs Segmenten aus, während PHD ein siebtes vorher sagt.

HrcT: 276 AS	TMS 1	TMS 2	TMS 3	TMS 4	TMS 5	TMS 6	TMS 7	Orientierung
<b>TOPPRED</b>	18-38		84-104	138-158	-	195-215	230-250	P
<b>TOPPRED</b>	18-38	50-70	84-104	138-158	-	195-215	230-250	Z
<b>TMHMM</b>	15-37		80-102	136-158	-	192-214	234-256	P
<b>HMMTOP</b>	15-38	51-70	85-109	139-158	-	189-213	232-256	P
<b>MEMSAT</b>	15-39	51-69	85-109	134-158	-	189-213	231-247	P
<b>PHD</b>	20-37	50-67	76-100	137-158	169-186	191-211	228-245	P

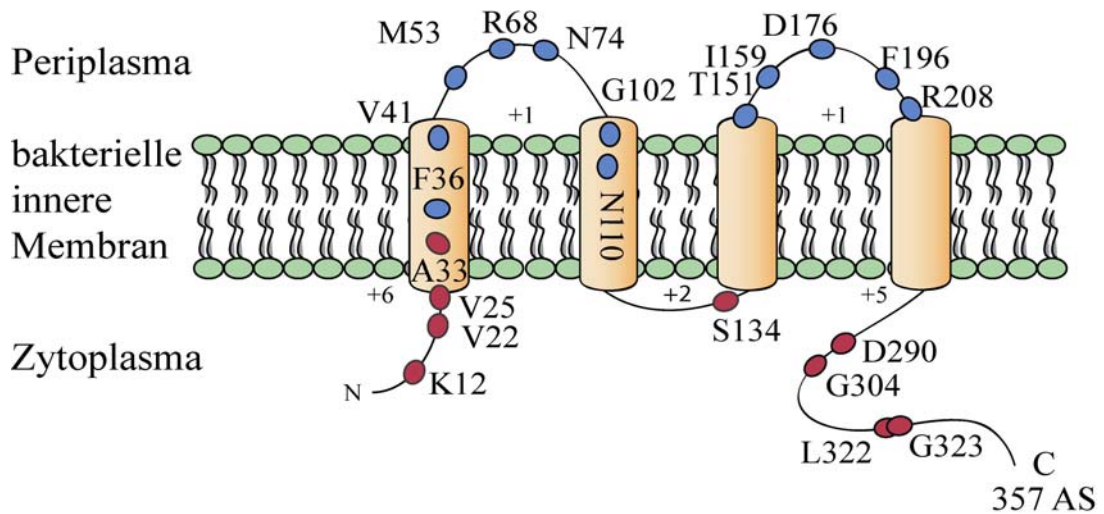
**Tabelle 9: Vorhersage der Topologie von HrcT.** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; Z: N-terminus liegt im Zytoplasma, P: N-Terminus liegt im Periplasma.

Abbildung 22 zeigt das durch experimentelle Daten erhaltene Topologiemodell von HrcT. Alle Insertionen, die im Bereich der ersten 38 Aminosäuren erzielt wurden, führten zu einer roten Ausfärbung der Kolonien. Alle nachfolgenden Insertionen führten zu einer blauen Ausfärbung der Kolonien, was auf eine Lokalisierung dieses Proteinbereichs im Periplasma hinweist. Drei Proteinfragmente (Aminosäure 1-119: Q119; 1-223: S223, 1-229: I229) wurden mit dem Vektor pDT untersucht und zeigten ebenfalls eine Lokalisierung dieser Bereiche im Periplasma an. HrcT besitzt demnach nur eine transmembrane Domäne im N-Terminus (Aminosäurebereich 20 bis 37), die das Protein in der Membran verankert. Der Rest des Proteins bildet eine große periplasmatische Domäne aus.



der C-Terminus befinden sich, wie vorhergesagt, im Zytoplasma. Der C-terminale zytoplasmatische Bereich ist mit einer Länge von mehr als 60 Aminosäuren sehr lang. Die TMS liegen voraussichtlich in den Aminosäurebereichen 25 bis 45 (TMS 1), 100 bis 120 (TMS 2), 135 bis 155 (TMS 3) und 208 bis 228 (TMS 4).

Für das HrcU-Homolog YscU aus *Yersinia* wurde ebenfalls eine Topologiestudie durchgeführt (Allaoui *et al.*, 1994). Die Ergebnisse zeigen ein gleiches Topologiemodell von YscU wie für HrcU.



**Abbildung 23: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcU.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich in den jeweiligen Bereichen von 20 Aminosäuren vor und nach einem TMS befinden, ist angegeben.

### 3.4.6.5. HrcV

HrcV ist mit 645 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 69,9 kDa das größte der hier untersuchten Membranproteine; es werden bis zu acht transmembrane Segmente vorhergesagt.

<b>HrcV: 645 AS</b>	<b>TMS 1</b>	<b>TMS 2</b>	<b>TMS 3</b>	<b>TMS 4</b>	<b>TMS 5</b>
<b>TOPPRED</b>	13-33	37-57	-	108-128	195-215
<b>TMHMM</b>	7-29	34-56	68-90	105-127	195-217
<b>HMMTOP</b>	13-27	37-56	63-82	103-127	196-215
<b>MEMSAT</b>	13-30	37-55	62-82	103-127	195-215
<b>PHD</b>	17-41	-	64-81	106-126	196-213

	<b>TMS 6</b>	<b>TMS 7</b>	<b>TMS 8</b>	<b>TMS 8</b>	<b>Orientierung</b>
<b>TOPPRED</b>	236-256	288-308	386-406	531-551	Z
<b>TMHMM</b>	232-254	289-311	-	-	Z
<b>HMMTOP</b>	236-255	278-296	301-318	-	Z
<b>MEMSAT</b>	236-254	280-296	303-319	-	Z
<b>PHD</b>	236-253	288-311	-	-	P

**Tabelle 11: Vorhersage der Topologie von HrcV.** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; Z: N-Terminus liegt im Zytoplasma, P: N-Terminus liegt im Periplasma.

Die Aussagen der Programme stimmen nur teilweise überein. TOPPRED, HMMTOP und MEMSAT sagen acht transmembrane Segmente voraus, TMHMM nur sieben und PHD gar nur sechs. So fehlt bei PHD das zweite, bei TOPPRED das dritte und bei TMHMM und PHD das achte transmembrane Segment. TOPPRED sagt als einziges Programm noch ein weiteres neuntes Segment voraus, das am C-Terminus im Bereich von 531 bis 555 Aminosäuren liegt. Bis auf PHD postulieren alle Programme einen zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus.

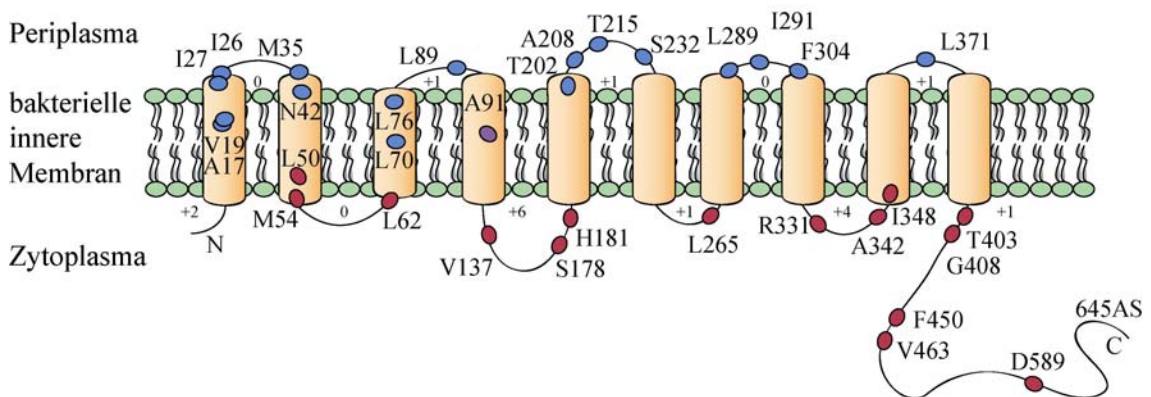
Die Analyse des Proteins mittels Transposoninsertionen führt zu einem Modell von HrcV mit zehn transmembranen Segmenten (Abbildung 24). Aufgrund positiver Reste an Aminosäureposition 2 und 5 verbleibt der N-Terminus im Zytoplasma. Das Protein



zeichnet sich durch einen extrem langen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich von annähernd 250 Aminosäuren aus.

Ob das von TOPPRED vorhergesagte neunte TMS im Bereich von Aminosäure 531-551 besteht, konnte nicht genau ermittelt werden, da in diesem Bereich keine Fusionen generiert werden konnten. Allerdings spricht die Fusion D589 gegen dieses TMS, da eine eindeutige LacZ-Aktivität vorliegt.

Die TMS liegen voraussichtlich in den Aminosäurebereichen 7-27 (TMS1), 35-55 (TMS2), 62-82 (TMS3), 90-110 (TMS4), 185-205 (TMS5), 236-256 (TMS6), 269-289 (TMS7), 304-324 (TMS8), 345-365 (TMS9) und 380-400 (TMS10).



**Abbildung 24: Zweidimensionales Topologiemodell von HrcV.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich im Bereich von 20 Aminosäuren vor und nach einem TMS befinden, ist angegeben.

### 3.4.6.6. HrpD5

HrpD5 nimmt eine besondere Stellung unter den Proteinen der inneren Membran ein. Trotz nahezu verschwindend geringer Sequenzähnlichkeiten wird HrpD5 als Homolog der Proteine YscD aus *Yersinia* spp. und FliG, einem Protein des Flagellumexportapparates, angesehen (Hueck, 1998; R. Koebnik, persönliche Mitteilung). HrpD5 ist essentiell für die Funktionalität des Typ III-Sekretionssystems von *Xcv*. Obwohl es nicht zu den stark konservierten Proteinen des *hrp*-Clusters gehört, ist es dennoch essentiell für die Pathogenität des Bakteriums. *hrpD5*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, Krankheiten in suszeptiblen Pflanzen oder eine hypersensitive

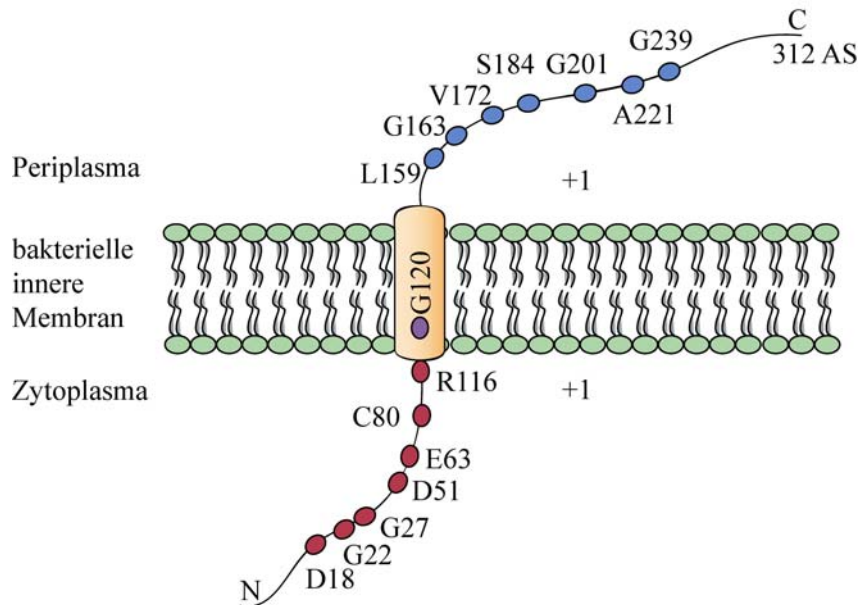
Reaktion in resistenten Pflanzen auszulösen. Es wurde ursprünglich vermutet, dass es sich bei HrpD5 um ein pflanzenspezifisch evolviertes Protein des Typ III-Sekretionssystems handelt, da eine starke Ähnlichkeit zu HrpW aus *R. solanacearum* besteht (Huguet *et al.*, 1998).

<b>HrpD5: 312 AS</b>	<b>TMS 1</b>	<b>TMS 2</b>	<b>Orientierung</b>
<b>TOPPRED</b>	63-83	117-137	P
<b>TMHMM</b>	löslich	-	-
<b>HMMTOP</b>	65-82	-	P
<b>MEMSAT</b>	-	118-134	P
<b>PHD</b>	-	120-134	Z

**Tabelle 12: Vorhersage der Topologie von HrpD5.** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; N-zyto.: N-terminus liegt im Zytoplasma, N-peri.: N-Terminus liegt im Periplasma.

Die Vorhersagen über die Topologie von HrpD5 sind sehr unterschiedlich: Während TOPPRED zwei transmembrane Segmente vorhersagt, geht TMHMM noch nicht einmal von einem Membranprotein aus. Dies könnte an der geringen Hydrophobität von HrpD5 liegen, die nur 39,4 % beträgt. HMMTOP, MEMSAT und PHD sagen jeweils nur ein transmembranes Segment voraus. Dieses liegt bei HMMTOP im Bereich von 65 bis 82 und bei MEMSAT und PHD im Bereich von 118 bis 134 Aminosäuren. Nur PHD gibt einen zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus an.

Anhand der erstellten Fusionen konnte ein Modell aufgestellt werden, in dem HrpD5 ein transmembranes Segment besitzt und der N-Terminus entsprechend der PHD-Vorhersage im Zytoplasma lokalisiert ist (Abbildung 25). Das TMS liegt voraussichtlich im Aminosäurebereich 116 bis 136.



**Abbildung 25: Zweidimensionales Topologiemodell von HrpD5.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich im Bereich von 20 Aminosäuren vor und nach einem TMS befinden, ist angegeben.

### 3.5. Bestimmung des Transkriptions- und Translationsstarts von HrpD5

Es wurde bislang davon ausgegangen, dass HrpD5 vom fünften Gen des *hrpD*-Operons kodiert wird (Huguet *et al.*, 1998). Allerdings gibt es begründete Vermutungen, dass *hrpD5* und *hrpD6* nicht zum *hrpD*-Operon zu zählen sind, sondern mit *hrpE* ein eigenständiges Operon bilden. Erste Vermutungen wurden durch RT-PCR-Untersuchungen und Komplementationsstudien mit den Operonen *hrpD* und *hrpE* bestätigt (E. Weber; unveröffentlichte Daten). Außerdem konnte durch die Bestimmung des Transkriptionsstarts von *hrpE* mittels Primer-Extension-Methode festgestellt werden, dass kein bekanntes Promotormotiv stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *hrpE* liegt (Weber *et al.*, 2004). Da das Translations-Stopcodon von *hrpD6* vier Basenpaare stromaufwärts des vermuteten transkriptionalen Starts von HrpE liegt (Huguet *et al.*, 1998), wurde gefolgert, dass der *hrpE*-Promotor im *hrpD*-Operon liegt (Weber *et al.*, 2004). Interessanterweise befindet sich im Bereich des postulierten Startcodons von *hrpD5* eine sogenannte PIP-Box („Plant Inducible Promoter“), die auch

in vier weiteren Xanthomonaden konserviert ist. Dieses Sequenzmotiv, TTCGC-N15-TTCGC, konnte unter anderem in den Promotoren des *hrpB*- und *hrpC*-Operons (Fenselau und Bonas, 1995) wie auch im Promotor des *hrpD*-Operons (Huguet *et al.*, 1998) identifiziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass *hrpD5* das erste Gen eines eigenständigen Operons sein könnte, das wahrscheinlich *hrpD5*, *hrpD6* und *hrpE* umfasst.

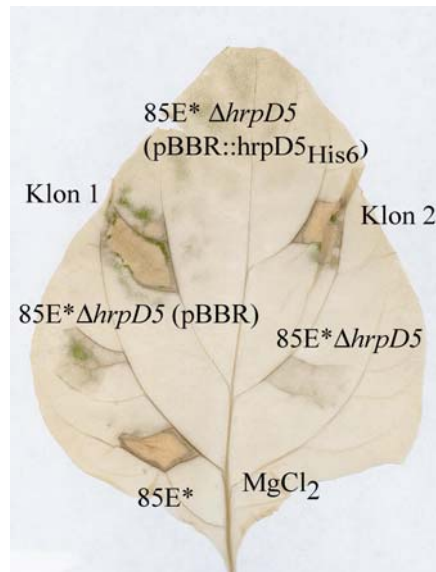
Da die PIP-Box somit das postulierte Startcodon (Huguet *et al.*, 1998) von *hrpD5* überlappt, muss davon ausgegangen werden, dass *hrpD5* sowohl einen anderen Transkriptions- als auch einen anderen Translationsstart besitzt als bisher postuliert.

### **3.5.1. Herstellung einer Hexahistidin-Epitop (His<sub>6</sub>)-markierten HrpD5-Variante**

Um den Translationsstart des Membranproteins HrpD5 näher untersuchen zu können, wurde ein C-terminales Hexahistidin-Epitop (His<sub>6</sub>) an das Protein fusioniert. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von *hrpD5* mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten zusätzlich die Sequenz für ein C-terminales His<sub>6</sub>. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pBBR1MCS-5 kloniert und sequenziert. Mittels Konjugation wurde das Konstrukt pBBR::*hrpD5*<sub>His<sub>6</sub></sub> in den Stamm 85E\* $\Delta$ *hrpD5* eingebracht und auf Komplementation getestet. Um einen Einfluss des His<sub>6</sub>-Epitops auf die Funktion des Proteins auszuschließen, wurde zum Vergleich nur *hrpD5* (ohne His<sub>6</sub>) in den Vektor pBBR1MCS-5 kloniert und ebenfalls in 85E\* $\Delta$ *hrpD5* konjugiert.

### **3.5.2. Komplementationstest**

Es wurden mehrere unabhängige Klone von 85E\* $\Delta$ *hrpD5*(pBBR::*hrpD5*<sub>His<sub>6</sub></sub>) auf der Pflanze getestet. In Abbildung 26 ist der Phänotyp dieser Klone auf der Pflanze dargestellt. Bei beiden Klonen von 85E\* $\Delta$ *hrpD5* (pBBR::*hrpD5*<sub>His<sub>6</sub></sub>) zeigte sich 48 Stunden nach der Inokulation eine deutliche HR auf der Pflanze. Die Inokulation mit dem unmarkierten *hrpD5*-Konstrukt, 85E\* $\Delta$ *hrpD5*(pBBR::*hrpD5*), zeigte denselben Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Beide plasmidkodierte Konstrukte zeigten weder in der Intensität noch im zeitlichen Verlauf einen Unterschied zum Wildtyp 85E\*. Somit konnte HrpD5 ohne Funktionsverlust des Proteins His<sub>6</sub>-markiert werden.

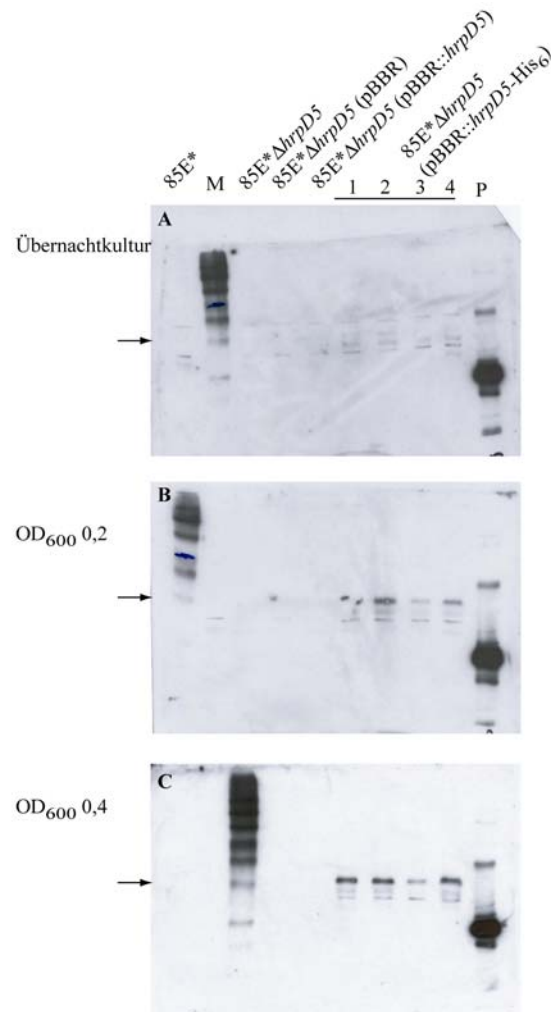


**Abbildung 26: Komplementation einer *hrpD5*-Deletionsmutante durch eine His<sub>6</sub>-Epitop-markierte Version von HrpD5 auf ECW-10R.**

Es wurden zwei unabhängige Klone der Konstrukte 85E\**ΔhrpD5*(pBBR1::*hrpD5*<sup>His<sub>6</sub></sup>), zwei Negativkontrollen 85E\**ΔhrpD5* und 85E\**ΔhrpD5*(pBBR1) sowie 85E\* als positive Kontrolle infiltriert. Es handelt sich um ein 48 Stunden nach der Inokulation geerntetes und in Ethanol gebleichtes Blatt.

### 3.5.3. Detektion des His<sub>6</sub>-Epitop-Fusionsproteins

Nachdem gezeigt worden war, dass das Protein HrpD5-His<sub>6</sub> voll funktionsfähig ist, sollte noch die Stabilität des His<sub>6</sub>-Epitops mittels Immunoblotanalyse getestet werden. Dazu wurde mit den aufgekochten Zell-Lysaten eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Die Zell-Lysate der Proben in Abbildung 27(A) wurden direkt aus Übernachtskulturen gewonnen. In ihnen konnte die Markierung von HrpD5 nicht mehr nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist, dass das His<sub>6</sub>-Epitop während der stationären Wachstumsphase der Bakterien abgespalten wurde. In Bild (B) und Bild (C) wurden die Proben frisch aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 und 0,4 geerntet. In beiden Fällen wurde die Markierung durch den spezifischen Antikörper erkannt.

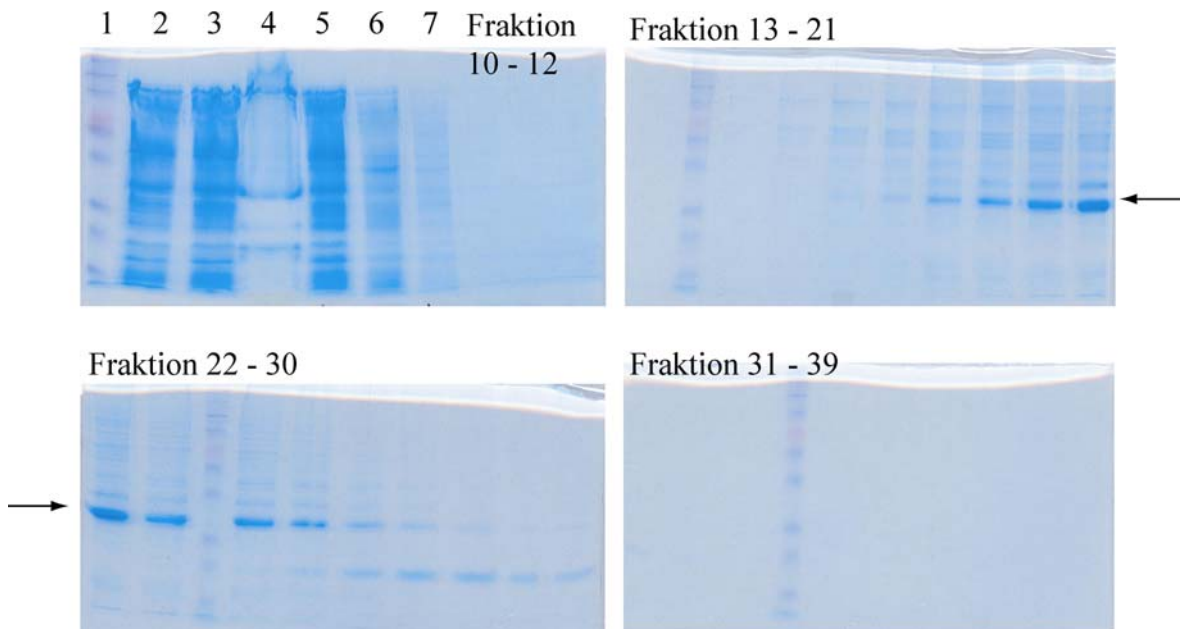


**Abbildung 27: HrpD5-His<sub>6</sub> konnte mit einem  $\alpha$ -Penta-His-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.** Proteine wurden zu gleichen Mengen auf das Gel aufgetragen, danach auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper  $\alpha$ -Penta-His inkubiert.

### 3.5.4. Reinigung des His<sub>6</sub>-markierten-Fusionsproteins HrpD5

Um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten, wurden 3 l des Bakterienstammes 85E\*  $\Delta hrpD5$  (pBBR::hrpD5<sub>His6</sub>) in NYG-Medium angezogen, bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geerntet und für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet. Das erhaltene Lysat wurde mittels Gradi Frac auf eine HisTrap<sup>TM</sup>HP-Säule aufgetragen. Eluiert wurde das HrpD5::His<sub>6</sub>-Fusionsprotein mit einem linearen Imidazol-Gradienten von 0 bis 250 mM. Abbildung 28 zeigt die auf ein SDS-Gel aufgetragenen Fraktionen der Reinigungsschritte. HrpD5 besitzt laut ursprünglicher Vorhersage eine ungefähre Größe von 37 kDa (Huguet *et al.*, 1998). Da der Start allerdings weiter stromabwärts

liegen könnte, kann das Protein auch kleiner sein. Das durch Reinigung in den Fraktionen 20 bis 30 erhaltene Protein schien für eine Verwendung zur Sequenzierung geeignet zu sein (Abbildung 28).



**Abbildung 28: SDS-PAGE (10 %-ig) der Reinigungsfraktionen 10-39.** Spur 1: Größenstandard (182, 115, 82, 64 (rot), 49, 37, 26, 20, 15); Spur 2: resuspendiertes Bakterienpellet in Lysispuffer; Spur 3: Überstand nach French Press und Zentrifugation; Spur 4: Pellet nach French Press und Zentrifugation; Spur 5: Lysat nach Sterilfiltration; Spur 6: Durchfluss der Säule, Spur 7: Wasch-Schritt. Die angegebenen Pfeile kennzeichnen das vermutete HrpD5-Protein.

Um das Protein eindeutig bestimmen zu können, wurde eine Western Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -Penta-His-Antikörper durchgeführt. Ein Signal im Western Blot wurde nicht ermittelt. Möglich wäre, dass die His<sub>6</sub>-Markierung während oder nach der Elution vom Protein abgetrennt wurde. Ein Hinweis auf eine hohe proteolytische Empfindlichkeit der C-terminalen Epitopmarkierung ist auch der in Abbildung 27 dargestellte Western Blot. Hier konnte das His<sub>6</sub>-markierte HrpD5-Protein aus einer Übernachtskultur nicht mehr nachgewiesen werden.

### 3.5.5. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von HrpD5

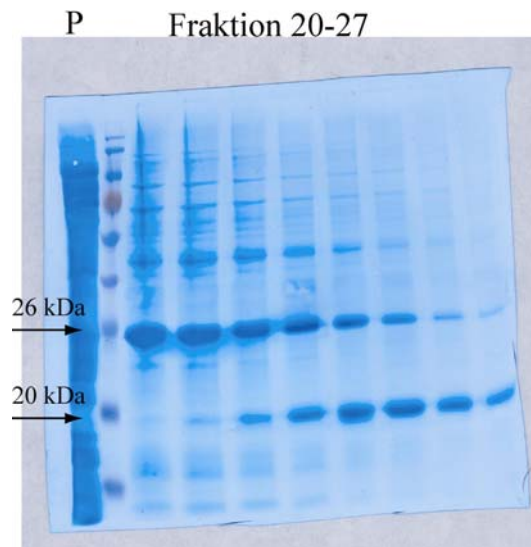
Zur Erzielung einer höheren Konzentration des Proteins wurden die Fraktionen 20 bis 30 mittels Vakuumzentrifugation konzentriert, auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen

und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (Abbildung 29). Anschließend wurden die Membranen kurz in eine Coomassie-Färbelösung getaucht, danach sofort entfärbt und getrocknet. Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde mittels Edman-Abbau durch Herrn Dr. Peter Rücknagel (Max-Planck-Institut für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bestimmt.

Aufgrund der starken Anreicherung wurde davon ausgegangen, dass das Protein bei ca. 26 kDa dem HrpD5-Protein entsprechen sollte. Beim Versuch der Sequenzierung stellte sich allerdings heraus, dass das Protein N-terminal blockiert ist. Hierdurch wird der Edman-Abbau behindert. Die N-terminale Blockierung entsteht unter anderem durch N-Acetylaminosäuren, glykosylierte Aminosäuren und Pyrrolidongruppen. Die N-terminale Blockade kann schon *in vivo* oder erst bei der Reinigung entstehen. Um festzustellen, ob durch die Versuchsbedingungen sämtliche Proteine auf der Membran blockiert wurden, wurde die bei ca. 20 kDa laufende Proteinbande untersucht. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz lieferte eine Abfolge von 10 Aminosäuren: MLIELDSVVR. Diese Anfangssequenz entspricht dem Enzym Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase. Dies konnte durch BLAST-Suche in der Genomsequenz von *Xcv* identifiziert werden. Dieses Protein besitzt am C-Terminus drei hintereinander folgende Histidine und konnte vermutlich aufgrund dessen über die Säule angereichert werden. Die erfolgreiche Sequenzierung dieses Proteins zeigte, dass die Blockierung des 26 kDa großen Proteins auf andere Ursachen zurückzuführen ist.

Durch die Blockierung des N-Terminus war es nicht möglich, eine Aminosäuresequenz des Proteins zu erhalten. Somit konnte weder bewiesen werden, dass es sich bei der gezeigten Bande (Abbildung 29, oberer Pfeil) tatsächlich um HrpD5 handelt, noch konnte der Translationsstart dieses Proteins bestimmt werden.





**Abbildung 29: PVDF-Membran der konzentrierten Fraktionen 17-32 des gereinigten HrpD5-His<sub>6</sub>-Proteins.** P: Zell-Lysat nach Filtration durch eine 0,2 µm-Membran; Pfeile markieren die Banden der zu sequenzierenden Proteine. Größenstandard (182, 115, 82, 64 (rot), 49, 37, 26, 20, 15).

### 3.5.6. Bestimmung des transkriptionellen Starts von *hrpD5*

Um den Transkriptionsstart von *hrpD5* zu ermitteln, wurden Bakterien aus einer Übernachtskultur vom Stamm 85E\* laut Protokoll (Qiagen RNeasy Mini Kit) geerntet und die RNA isoliert. Für die 5'-RACE-PCR (BD SMART RACE cDNA Amplifikation Kit) wurden spezifische Primer verwendet, die ca. 100 bp stromabwärts vom erwarteten Start lagen. Die in der PCR erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> kloniert und die erhaltenen Klone nach einer Zufallsauswahl mit den vektorspezifischen M13-Primern sequenziert.

Der Start der erhaltenen 5'-Sequenzen sind in Abbildung 30 mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Der Sequenzstart an erster Position konnte sechsmal festgestellt werden. Anhand dieser Sequenzen wurde Adenin an Position 62 als Transkriptionsstart von *hrpD5* postuliert. Da bei den anderen erhaltenen Sequenzen keine Wiederholungen auftraten, repräsentieren sie vermutlich Abbrüche der Polymerase während der cDNA-Synthese oder nukleolytische Abbauprodukte der mRNA.

ACA GGC GGC TCA GGA GGT TCG CCC *hpaA-*  
*hrpD5-*  
 ATG ACC ATG CAG CTT CGC GTA ATG ACA GGA ACC CAC GCA GGC 42  
 M T M Q L R V M T G T H A G

6x ↓ ↓

GCA CGA TTA GAT TTG GCG CAA GGT CGC TAC ACC CTG GGG AGC 84  
 A R L D L A Q G R Y T L G S

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

GAT CCA CAA ACC GAT ATC CGA ATA GAC GAT TGG CCT GGT TGC 126  
 D P Q T D I R I D D W P G C

TCA CTC ATT ATC GAG GTA GAC CAA GAT GGT CAG ATC CGC TAT 168  
 S L I I E V D Q D G Q I R Y

GGC AGC GAC ACG GTG CAA GAA ACG TTC TTT GTT GCA TTT CAG 210  
 G S D T V Q E T F F V A F Q

CCG GTC CGC TTC GGC CCG CTG GTG CTA TGC GTT GGC GAT GCT 252  
 P V R F G P L V L C V G D A

GCT GCC GAT TGG CCG GAC GAT GTG GCG CTG CTG GAG CGG CTG 294  
 A A D W P SD D D V A L L E R L

CTTTCCCAGCACCGCCGCGCCGCGCACAGTCCAGGCGCAAAGTCTTGCGTA 349  
 CTGCGGTGGGCGCCGTGCTAGCGCTTGCCGCCGACGCTTGCTCCCCTCGTTGCA 404  
 GCCGGCGTTTCTGTCCGATGCGGCCACCCGGCAACATCCGGAAAATACCCTCAAT 459  
 CAGGCCAAAGCCTTATTG.....

**Abbildung 30: Bestimmung des Transkriptionsstart von *hrpD5* mittels 5'-RACE.** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des *hrpD5*-Gens und des HrpD5-Proteins. Orange: PIP-Box-Motiv; Grün: -10-Binde-Element der RNA-Polymerase; Blau: angenommener Transkriptionsstart; Rosa: Bindestelle der verwendeten Primer *hrpD5*-256-3' und *hrpD5*-343-3'; ↓ durch 5'-RACE erhaltener Sequenzstart; SD: Shine-Dalgarno-Sequenz; Unterstrich: vermuteter Translationsstart.

Der Transkriptionsstart an Position 62 stimmt mit Beobachtungen überein, die schon im Bakterium *R. solanacearum* gemacht wurden. Hier wurde bei Sequenzanalysen HrpB-regulierter Gene (HrpB ist das Homolog zu HrpX in *Xcv*) ein der PIP-Box sehr verwandtes DNA-Sequenzmotiv festgestellt (Cunnac *et al.*, 2004). Dieses

---

Sequenzmotiv wurde *hrpII*-Box genannt. HrpD5 besitzt dieses *hrpII*/PIP-Box-Promotormotiv (Abbildung 30, orange Färbung). Der transkriptionelle Start von *hrpD5*, der mittels 5'-RACE-PCR ermittelt werden konnte, beginnt mit einem Adenin. Ein Adenin in ähnlichem Abstand konnte auch bei den untersuchten Genen von *R. solanacearum* ermittelt werden (Cunnac *et al.*, 2004).

## 4. Diskussion

Das Hauptziel meiner Arbeit war die Untersuchung des Proteinkomplexes des TTSS in der inneren Membran von *Xcv*. Zu diesem Zweck wurden Interaktionsstudien mit allen konservierten Hrc-Proteinen – mit Ausnahme von HrcC, einem Protein der äußeren Membran – unter Zuhilfenahme eines *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems (Dmitrova *et al.*, 1998) durchgeführt. Daran anschließend wurde die Topologie der vorhergesagten integralen Membranproteine des Sekretionsapparates (HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5) mit Hilfe des mini-Tn5-Transposonderivates *Tn<sub>pholac1</sub>* (Alexeyev und Winkler, 2002) untersucht und bestimmt.

### 4.1. Interaktionsstudien der Hrc-Proteine unter Zuhilfenahme eines *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystems

Das hier verwendete bakterielle Dihybridsystem (Dmitrova *et al.*, 1998) (Abbildung 15) ist eine schnelle und effektive Methode, um Interaktionen zweier Proteine *in vivo* zu analysieren. Dieses System wurde vor dieser Arbeit noch nie an integralen Membranproteinen getestet. Die Idee, dieses System zu nutzen, entstand aus einer Veröffentlichung, die Interaktionen zwischen transmembranen Segmenten von zytoplasmatischen Membranproteinen *in vivo* mittels eines  $\lambda$ -Phagen-Screens untersuchte (Leeds und Beckwith, 1998). Der Reporter für dieses System ist ein Fragment („headpiece“) des Bakteriophagen-Lamda-Repressors, dem die eigene Dimerisierungsdomäne fehlt. Die Aktivierung des Repressorfragmentes in einer Fusion ermöglicht die Immunität des bakteriellen Reporterstammes gegenüber einer Infizierung durch einen  $\lambda$ -Phagen. Interaktionen zwischen den transmembranen Helices können dann mittels eines Plattierungsverfahrens ermittelt werden. Mit diesem System sind allerdings nur Homodimerisierungen einzelner Helices messbar.

Mit dem gewählten *lexA*-basierenden Dihybridsystem erschien es möglich, sowohl Homo- als auch Heterodimerisierungen in der natürlichen zytoplasmatischen *E. coli*-Membran – anders als bei Hefe-Dihybridsystemen – zu testen. Mittlerweile wurde auch in einer Veröffentlichung gezeigt, dass dieses System tatsächlich geeignet ist, Interaktionen von Membranproteinen zu testen (Schneider und Engelman, 2003).

Die konservierten Gene des *hrp*-Clusters (*hrcJ*, *hrcL*, *hrcN*, *hrcT*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR* und *hrcS*) und das pflanzenpathogen-spezifische *hrpD5* wurden in die jeweiligen Vektoren pMS604 und pDP804 des bakteriellen Dihybridsystems kloniert und auf Homo- und Heterodimerisierung getestet (Tabelle 2 und 3).

In *Xcv* konnte gezeigt werden, dass HrcN im bakteriellen Dihybridsystem zum einen homodimerisiert und zum anderen mit HrcL interagiert. HrcL ist ebenfalls in der Lage, mit sich selbst zu interagieren. HrcN und HrcL sind zytoplasmatische Proteine. Diese Homo- und Heterodimerisierungen konnten unter anderem auch bei den jeweils homologen Proteinen YscN und YscL von *Y. pestis* (Jackson und Plano, 2000) und den homologen Proteinen FliI und FliH des Typ III-Flagellumexportsystems von *S. typhimurium* (Minamino und MacNab, 2000; Minamino *et al.*, 2001) festgestellt werden. In der letzteren Untersuchung konnte sogar gezeigt werden, dass FliH und FliI einen Komplex bilden, der aus einem FliH-Dimer und einem FliI-Monomer besteht (siehe auch Abbildung 31). FliH nimmt in diesem Komplex die Funktion eines Regulators ein und inhibiert so die Aktivität der ATPase FliI (Minamino und MacNab, 2000). Hefe-Dihybrid-Untersuchungen in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* zeigten Selbstinteraktionen des HrcN-Proteins (Alegria *et al.*, 2004). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass HrcN *in vivo* ein Hexamer bildet, ähnlich zur  $\alpha_3\beta_3$ -Ringstruktur der  $F_0F_1$ -ATPase. Dies wurde kürzlich auch für HrcN von *P. syringae* (Pozidis *et al.*, 2003) und das HrcN-Homolog Spa47 in *Shigella* sp. (Blocker *et al.*, 2003) postuliert.

Interaktionen der hier untersuchten Membranproteine von *Xcv* konnten nicht detektiert werden. Nur eine Heterodimerisierung zwischen den C-terminalen zytoplasmatischen Fragmenten von HrcU (HrcU<sub>CC</sub>) und HrcV (HrcV<sub>C</sub>) sowie eine Homodimerisierung von HrcV<sub>C</sub> konnten gezeigt werden.

Trotzdem geht aus einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2003 hervor, dass dieses System für die Untersuchung von Membranproteinen geeignet ist. Mittels des GALLEX-Systems, das auf dem *lexA*-basierenden Dihybridsystem beruht, konnten heterologe Interaktionen zwischen einzelnen transmembranen Helices von Glycophorin A in *E. coli* (Schneider und Engelman, 2003) detektiert werden. Obgleich das System geeignet ist, wurden einige Schwierigkeiten aufgezeigt. Vor allem die Länge der transmembranen Helices und somit ihre Orientierung zueinander scheinen kritische Faktoren zu sein. Die optimierte Orientierung der interagierenden Helices ist

anscheinend besonders wichtig; dies konnte auch schon in früheren Studien gezeigt werden (Langosch *et al.*, 1996).

Das verwendete System ist also in der Lage, Interaktionen zwischen transmembranen Helices zu detektieren. Die Frage ist nun, warum keine Interaktionen der getesteten integralen Membranproteine von *Xcv* gefunden werden konnten. Im GALLEX-System wurde ein Protein mit nur einer transmembranen Helix untersucht, und es war sichergestellt, dass die LexA-Domäne im Zytoplasma lokalisiert ist.

In dem in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Dihybridsystem wird die LexA-Domäne, wie beim GALLEX-System, N-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert. Um Interaktionen zwischen zwei Proteinen detektieren zu können, müssen beide Proteine die LexA-Fusion im Zytoplasma lokalisieren, damit diese auch in Verbindung treten können. Befindet sich der N-Terminus eines Proteins im Periplasma, wird auch die LexA-Domäne durch die Membran transportiert. Die Proteine würden zwar miteinander interagieren, aber diese Interaktion könnte mit dem genutzten System nicht detektiert werden. In den später folgenden Topologiestudien konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus der Proteine HrcR, HrcS, HrcT und HrpD5 im Zytoplasma liegt. Bei HrcV wird aufgrund positiver Reste mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch von einer zytoplasmatischen Lokalisierung des N-Terminus ausgegangen. Nur der N-Terminus von HrcU befindet sich nach diesen Studien im Periplasma. Fraglich ist nur, ob durch die N-terminale LexA-Fusion an die jeweiligen Proteine überhaupt die fehlerfreie Lokalisierung des N-Terminus möglich ist.

Eine Interaktion der Membranproteine HrcV und HrcU konnte im bakteriellen Dihybridsystem nicht nachgewiesen werden. Nur eine Interaktion der beiden zytoplasmatischen C-terminalen Domänen von HrcU und HrcV wurde detektiert. Das bedeutet, dass eine Interaktion dieser beiden Proteine vorliegt, jedoch nur für die löslichen Varianten nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Fusion mit der LexA-Domäne zu einer Fehlfaltung oder zu einer unterschiedlichen Lokalisierung der LexA-Domäne führen könnte.

Es wäre auch möglich, dass die zu untersuchenden Proteine aufgrund der fusionierten LexA-Domäne gar nicht in die Membran inserieren und eine Interaktion der sonst

---

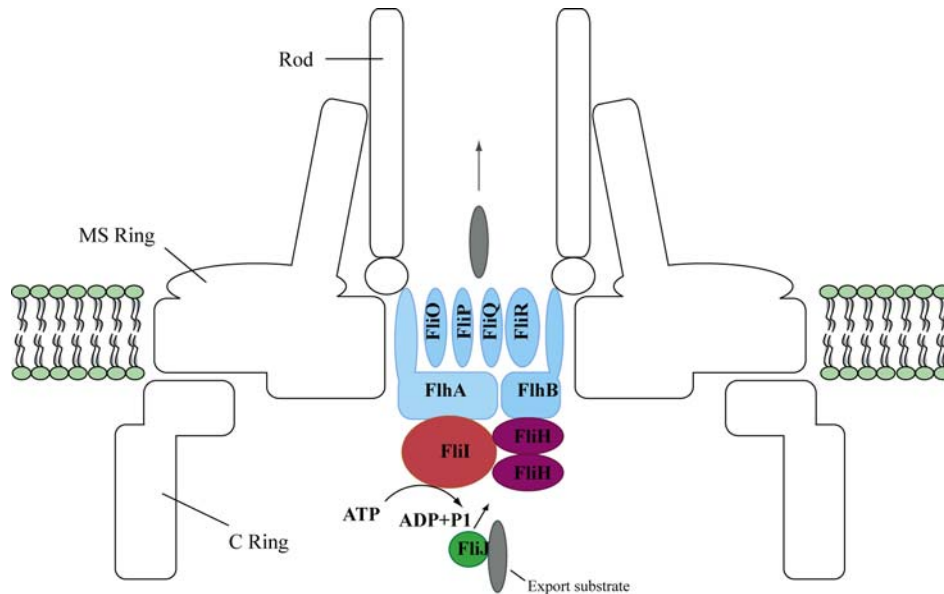
membraneeingelagerten Proteinbereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht möglich wird. Bei einer fehlerhaften Insertion würden die Helices nicht ihre optimale Lage zueinander erhalten, was aber, wie schon erwähnt, besonders wichtig zu sein scheint (Schneider und Engelman, 2003).

In einem weiteren Versuch sollte festgestellt werden, ob die N-terminale Fusion der LexA-Domäne an das zu untersuchende Protein einen Einfluss auf die Interaktionen ausübt. Hierzu wurden die ursprünglichen Vektoren pMS604 und pDP804 des bakteriellen Dihybridsystems so modifiziert, dass die LexA-Domäne C-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert werden konnte. Als Positivkontrolle sollte die Selbstinteraktion des HrcN-Proteins dienen, da diese in allen vorhergehenden Untersuchungen immer eine starke Interaktion anzeigte.

Bei den ersten Versuchen stellte sich heraus, dass weder eine Interaktion auf den Indikatorplatten erkennbar war noch das Protein im Western Blot detektiert werden konnte. Sämtliche verwendeten Klone für diesen Versuch wurden sequenziert, um die neu entstandenen Sequenzübergänge auf Fehler zu kontrollieren. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass zum Beispiel ein Sequenzfehler in einem späteren Bereich auftrat und eventuell zu einem frühzeitigen Abbruch führte.

Allerdings stellte sich bei den erst später durchgeführten Topologieuntersuchungen heraus, dass sich mit großer Wahrscheinlichkeit nur die C-Termini der Proteine HrcU und HrcV im Zytoplasma befinden. Nach den Erkenntnissen aus den Topologiestudien wäre somit die Umstellung der Fusionen bei HrcR, HrcS, HrcT und HrpD5 nicht aussagekräftig gewesen, da sie die LexA-Domäne vermutlich ins Periplasma transloziert hätte.

Dass die Proteine der inneren Membran des TTSS miteinander interagieren, ist in Untersuchungen an homologen Proteinen verschiedener Bakterien gezeigt worden. Abbildung 31 zeigt die Lage der homologen Flagellumproteine. Die genauen Funktionen von FliO, FliP, FliQ, FliR und ihrer jeweiligen Interaktionspartner sind nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass sie mit den transmembranen Domänen von FlhA und FlhB einen Kanal für den Transport von Untereinheiten des Flagellums bilden (Minamino und Macnab, 1999).



**Abbildung 31: Schematische Darstellung des bakteriellen flagellaren Typ III-Exportapparates mit möglichen Interaktionspartnern.** FlhA, FlhB, FliO, FliQ und FliR sind als integrale Membranproteine sehr wahrscheinlich in einer zentralen Pore des MS-Ringes lokalisiert. FlhA und FlhB besitzen große zytoplasmatische Domänen. Diese sind sehr wahrscheinlich die Bindestellen für die ATPase FliI und ihren Regulator FliH. Das Chaperon FliJ schützt seine Substrate vor Aggregation im Zytoplasma (Minamino und Namba, 2004).

Das zytoplasmatisch lokalisierte C-terminale Fragment des zu HrcU homologen Flagellumproteins FlhB – FlhB<sub>C</sub> – von *Salmonella* wurde in Interaktionsstudien näher untersucht. Es wurde gezeigt, dass die durch proteolytische Spaltung entstandenen Fragmente FlhB<sub>CN</sub> (221-270 AS) und FlhB<sub>CC</sub> (271-383 AS) miteinander interagieren (Minamino und Macnab, 2000). In einem weiteren Versuch interagierte FlhB<sub>C</sub> (211-383 AS) mit dem zur ATPase HrcN homologen Protein FliI und mit FliH (Minamino und MacNab, 2000), dem möglichen Regulator von FliI, sowie mit dem zu HrcV homologen Flagellumprotein FlhA. Auch interagiert der C-terminale zytoplasmatische Bereich von FlhA mit FlhB<sub>C</sub>, FliH und FliI. Weiterhin wurde dokumentiert, dass auch Selbstinteraktionen von FlhB<sub>C</sub> und FlhA<sub>C</sub> stattfinden. Mittels Affinitätschromatographie und „Affinitäts-Blots“ der Proteine FlhA und FlhB wurde die Interaktion zwischen den Proteinen gezeigt, allerdings konnten in diesem Test keine Selbstinteraktionen der beiden Proteine festgestellt werden (Zhu *et al.*, 2002).



---

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten *lexA*-basierenden bakteriellen Dihybridsystem konnten Interaktionen zwischen löslichen Proteinen und im Zytoplasma lokalisierten Fragmenten der untersuchten Membranproteine detektiert werden. Interaktionen zwischen Membranproteinen konnten hingegen nicht festgestellt werden. Dieses System wurde noch nie zur Untersuchung von polytopen Membranproteinen herangezogen. Es konnte aber gezeigt werden, dass Interaktionsstudien mit bitopen Membranproteinen durchaus Erfolg versprechend sind, wie anhand des GALLEX-Systems gezeigt werden konnte (Schneider und Engelman, 2003). Durch die im Nachhinein gefertigten Topologiestudien der Membranproteine wäre es möglich, Interaktionen der einzelnen Helices (insbesondere der bitopen Membranproteine HrcS, HrcT und HrpD5) nach dem Vorbild des GALLEX-Systems zu untersuchen, da nun bekannt ist, in welcher Orientierung die Helices in der Membran liegen. Allerdings wäre hierfür ein beträchtlicher Arbeitsaufwand nötig, da trotz der sehr genauen Topologiestudien die exakten Bereiche der transmembranen Segmente nicht feststehen. Die optimale Länge, mit der die einzelnen Helices gegeneinander getestet werden müssen, müsste für jedes einzelne transmembrane Segment erst untersucht werden. Alternativ zu dem vorgenannten System könnten auch die auf ToxR basierenden Systeme TOXCAT (Russ und Engelman, 1999) und POSSYCCAT (Gurezka und Langosch, 2001) genutzt werden. Allerdings können auch hiermit nur bitope Membranproteine untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, das vollständige Proteine in einer Interaktionsstudie zu testen, stellt das Split-Ubiquitin-System (Johnsson und Varshavsky, 1994) in Hefe dar. Dieses System basiert auf der Reassemblierung der N- und C-terminalen Hälften von Ubiquitin. Mit diesem System gelang es unter anderem, schon bekannte Interaktionen zwischen ausgewählten Membranproteinen *in vivo* zu bestätigen. Hierzu gehören Untersuchungen am Translokationsapparat des endoplasmatischen Retikulums (Dünnwald *et al.*, 1999), zwischen den mitochondrialen Membranproteinen Tom22p und Tom20p (Wittke *et al.*, 1999), am ErbB3-Rezeptor in Säugetierzellen (Thaminy *et al.*, 2003) und am Sukrosetransporter SUT1 aus Pflanzen (Reinders *et al.*, 2002).

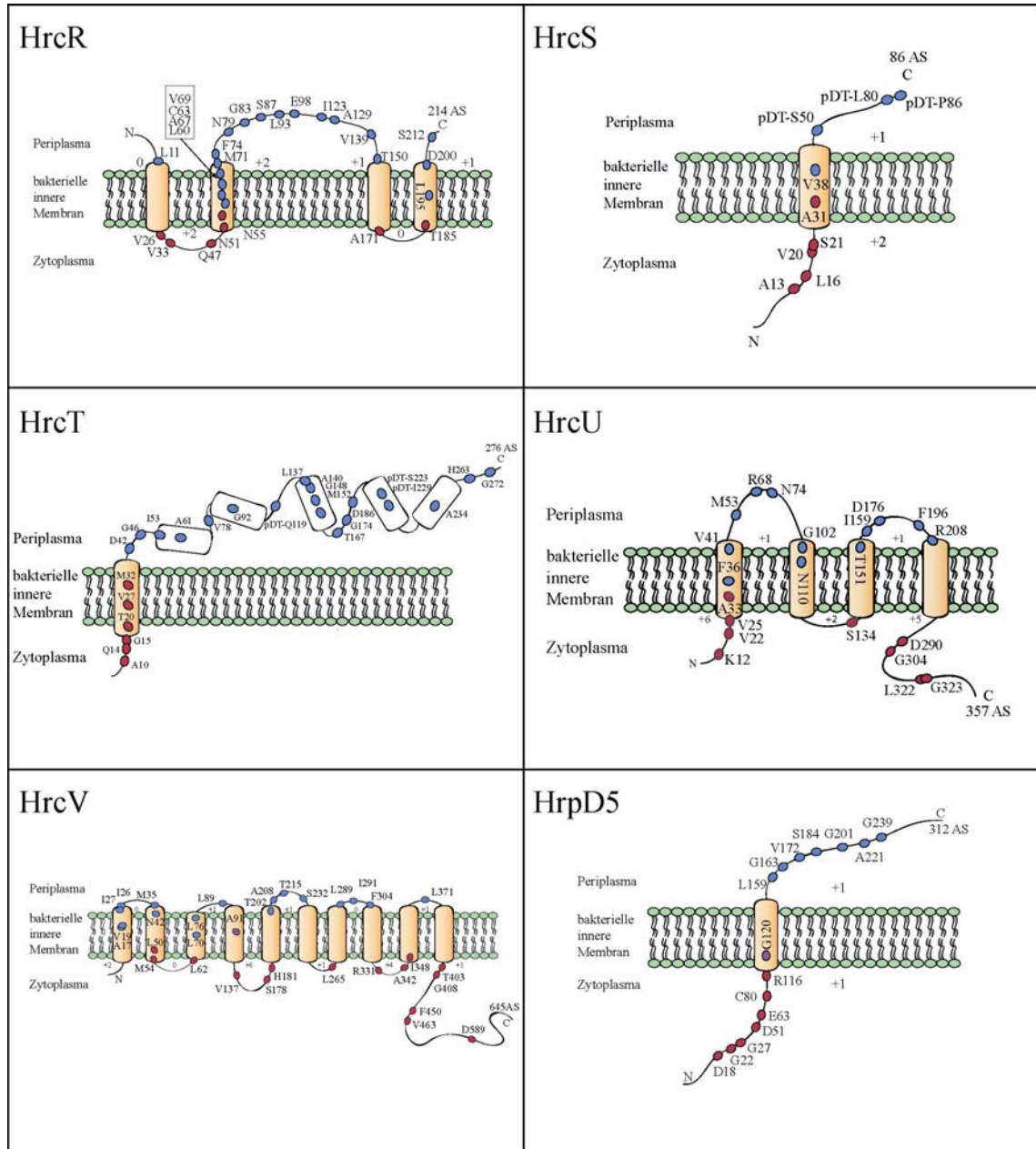
## 4.2. Topologiestudien

Ein wichtiger erster Schritt, um ein integrales Membranprotein der Zytoplasmamembran strukturell zu charakterisieren, ist die Bestimmung der Topologie des Proteins in der Membran. Hierzu zählt die Anzahl und Orientierung transmembraner Segmente (TMS) in der zytoplasmatischen Membran. Für diese Art der Untersuchung werden Reporterproteine an unterschiedliche Bereiche des Membranproteins fusioniert und ihre Aktivität untersucht. Zu den bekanntesten Reporterproteinen zählen die alkalische Phosphatase (PhoA), die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) und die  $\beta$ -Laktamase (BlaM) (Manoil, 1991). Aber auch GFP („Green Fluorescent Protein“)-Fusionen wurden als Marker für eine zytoplasmatische Lokalisierung von Membranproteinbereichen verwendet (Drew *et al.*, 2002).

LacZ dient als Reporter, um zytoplasmatische Bereiche eines Proteins zu detektieren. Das Enzym ist nur im Zytoplasma aktiv; die Fusion an eine periplasmatische Domäne eines Membranproteins erwies sich als toxisch für *E. coli* (Lee *et al.*, 1989; Snyder und Silhavy, 1995). Als „Gegenspieler“ von LacZ hat sich PhoA etabliert. PhoA kann nur im Periplasma in eine aktive Form falten, da die Bildung benötigter Disulfidbrücken im Zytoplasma unterbleibt (Akiyama und Ito, 1993; Derman *et al.*, 1993). In Topologieuntersuchungen wird das Enzym ohne seine Signalsequenz, die es dem Protein sonst ermöglicht, ins Periplasma transportiert zu werden, als Reporter eingesetzt (Manoil *et al.*, 1990; van Geest und Lolkema, 2000). PhoA war das erste Protein, das für Topologiestudien genutzt wurde (Manoil und Beckwith, 1986).

Zur Untersuchung der sechs inneren Membranproteine des TTSS von *Xcv* wurde ein dualer Reporter verwendet, der die gleichzeitige Fusion von PhoA und LacZ $\alpha$  an das Membranprotein ermöglicht. Das hier genutzte Transposon Tn $\phi$ lac1 (Alexeyev und Winkler, 2002) (Abbildung 18) beinhaltet diesen dualen Reporter. Da das  $\alpha$ -Fragment ein sehr kleiner Teil (<6%) der  $\beta$ -Galaktosidase ist, ist es wahrscheinlich, dass es nur einen minimalen Effekt auf den Transport des gesamten Reporters durch die Membran hat (Alexeyev und Winkler, 1999). Da andererseits das  $\alpha$ -Fragment nur in Verbindung mit dem zytoplasmatischen  $\omega$ -Fragment ( $\alpha$ -Komplementation (Welply *et al.*, 1981)) von LacZ ein funktionsfähiges Protein bilden kann, ist die entsprechende LacZ $\alpha$ -Fusion nur im Zytoplasma aktiv.

Unter Verwendung dieses Reporters wurden Transposoninsertionen in den sechs Membranproteinen HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und HrpD5 durchgeführt. Die Insertionsstellen wurden mittels DNA-Sequenzierung bestimmt. Abbildung 32 fasst die in dieser Arbeit erstellten zweidimensionalen Topologiemodelle der untersuchten Proteine zusammen.



**Abbildung 32: Zweidimensionale Topologiemodelle der sechs inneren Membranproteine des TTSS von *Xcv*.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; purpurne Kreise: „Mischpopulation“, Aktivität sowohl der alkalischen Phosphatase wie auch der  $\beta$ -Galaktosidase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich in den jeweiligen Abschnitten befinden, ist angegeben.

#### 4.2.1. HrcR

Nach Auswertung der experimentellen Daten zeigt das Topologiemodell von HrcR (Abbildungen 20, 32) ein Membranprotein mit vier transmembranen Segmenten. Die Lage der TMS deckt sich mit den Vorschlägen der Vorhersageprogramme. Die Orientierung ist allerdings entgegengesetzt zu den Vorhersagen von vier Programmen. Nur TOPPRED geht davon aus, dass der N-Terminus des Proteins im Periplasma lokalisiert ist. Da sich das Programm TOPPRED bei seinen Vorhersageberechnungen nach der „positive inside“-Regel von Gunnar von Heijne orientiert, ist diese Vorhersage sehr ungewöhnlich, da sich in der periplasmatischen Domäne zwischen dem zweiten und dritten TMS elf positiv geladene Aminosäuren befinden. Allerdings wird davon ausgegangen, dass die Topologie eines Proteins vorwiegend von den Resten bestimmt wird, die direkt vor oder nach einem TMS liegen (persönliche Mitteilung, R. Koebnik). Im vorliegenden Fall ist dieses Verhältnis sehr ausgeglichen. Auch nach Auswertung der experimentellen Daten wird davon ausgegangen, dass der N-Terminus im Periplasma lokalisiert ist, da alle Insertionen, die zwischen dem zweiten und dritten TMS erzielt wurden, eine LacZ-Aktivität anzeigten. Nur die Insertion L11 wirft einige Fragen auf: Sie zeigt zwar eine PhoA-Aktivität an, allerdings ist der kurze N-terminale Bereich der Polypeptidkette nicht ausreichend, um einen Transport ins Periplasma zu bewirken. Zu vermuten ist, dass der Transport des N-Terminus durch die nachfolgenden, hydrophoben Reste der „inverted repeats“ des Transposons bewirkt wurde; diese sollte jedoch unter normalen Umständen keinen Einfluss auf die Insertion des Proteins haben.

In einer ähnlichen Untersuchung mit dem HrcR-homologen YscR aus *Yersinia* (Fields *et al.*, 1994) wurde mit Hilfe von Hydropathieuntersuchungen und nur sechs *TnphoA*-Transposon-Insertionen ein Topologiemodell des Proteins erstellt. Dieses Modell besteht ebenfalls aus vier transmembranen Segmenten, allerdings befinden sich der N- und C-Terminus sowie die Domäne zwischen dem zweiten und dritten transmembranen Segment im Zytoplasma. Untersucht man die Proteinsequenz von YscR mit den in dieser Arbeit verwendeten fünf Vorhersageprogrammen, erhält man sehr unterschiedliche Vorhersagen zur Anzahl und Orientierung der TMS. Allerdings wäre es nicht zulässig, nur von den Vorhersageprogrammen auf die Topologie eines Proteins zu schließen oder Topologien homologer Proteine miteinander zu vergleichen, da die

---

Vorhersagen nicht immer korrekt sind. So wurden bei einer Untersuchung mit 60 Membranproteinen von *E. coli*, deren Topologie experimentell bestimmt worden war, dieselben (in dieser Arbeit verwendeten) fünf Vorhersageprogramme benutzt. Dabei wurde festgestellt, dass in den Fällen, in denen vier oder fünf Programme dieselbe Topologie vorhersagten, diese in 94% der Fälle (30/32) korrekt war. Bei drei übereinstimmenden Vorhersagen betrug die Zuverlässigkeit nur noch 56% (10/18). Es gab aber auch sieben Fälle, in denen kein einziges Programm die experimentell bestimmte Topologie vorhersagte (12%) (Nilsson *et al.*, 2000). Bezogen auf die Proteine anderer Bakterien dürfte die Vorhersagegenauigkeit generell noch schlechter sein, da die Algorithmen mit *E. coli*-Sequenzen trainiert worden waren.

Für das zu HrcU homologe Protein HrpT aus *R. solanacearum* wurden ebenfalls vier transmembrane Segmente vorhergesagt (Van Gijsegem *et al.*, 1995) und die vorhergesagte periplasmatische Domäne zwischen dem zweiten und dritten TMS wurde durch zwei aktive PhoA-Fusionen bestätigt.

Vergleicht man HrcR, HrpT und YscR miteinander, fällt zuerst die Übereinstimmung der Lage der vier transmembranen Segmente auf (Abbildung 33). Die Anzahl der positiven Reste zwischen dem zweiten und dritten TMS ist bei allen drei Proteinen ähnlich. HrcR besitzt in diesem Bereich elf, HrpT zehn und YscR sieben positive Aminosäuren. Trotzdem scheint die Topologie von YscR entgegengesetzt zu sein, da auch die generierten PhoA-Fusionen in dieser Domäne, im Gegensatz zu den Insertionen in HrcR und HrpT, eine sehr niedrige PhoA-Aktivität anzeigen.

```

HrcR  -MQMPDVGSLLLIVVIMLGLLPFAAMVVTSYTKIVVVLGLLRNAIGVQQVPPNMVLNGVAL 59
HrpT  -MQNVEFASLIVMAVAIALLPFAAMVVTSYTKIVVVLGLLRNALGVQQVPPNMVLNGIAM 59
YscR  MIQLPDEINLIIVLSLLTLLPLISVMATSFVKFAVVFSLLRNALGVQQIPPNMAMYGLAI 60
      :*  :  . *:::  :  ***:  :::. **:. *:. **:. *****:*****:*****:  :  *:::

HrcR  LVSCFVMAPVGMFAFKAAQ---NYGAGSDNSRVVLLDACREPFQFLKHTREREKAFF 116
HrpT  IVSCFVMAPVGMFAHQRAHVQINAQGGTNIQVMPLLDAARDPFREFLNKHTNAREKAFF 119
YscR  ILSLYVMAPVGFATQDYLQA--NEVSLTNIESVEKFFDEGLAPYRMFLKQHIQAQEYSFF 118
      ::*  :*****:  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :

HrcR  MRSAQQIWPKDKAATLKSDDLLVLAPAFTLSELTEAFRIGFLLYLVFIVIDLVVANALMA 176
HrpT  MRSAQQLWPPAKAAQLKDDDLIVLAPAFTLTELTSAFRIGFLLYLAFIVIDLVIANLLMA 179
YscR  VDSTKQLWPKQYADRLESLSLFIILLPAFTVSELTRAFEIGFLIYLPFIVIDLVISNILLA 178
      :  *:::*:*  *  *:. *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :

HrcR  MGLSQVTPTNVAIPFKLLLFVAMDGWSMLIHGLVLSYR- 214
HrpT  LGLSQVTPSNVAIPFKLLLFVMDGWSVLIHGLVNTYR- 217
YscR  MGLMMVSPMTISLPFKLLLFVLLDGWTRLTHGLVISYGG 217
      ::*  *:*  :::*****  :***:  *  *****  :*

```

**Abbildung 33: Sequenzvergleich des HrcR-Proteins aus *Xcv* mit YscR aus *Y. pestis* (Fields *et al.*, 1994) und HrpT aus *R. solanacearum* (Van Gijsegem *et al.*, 1995). Grün: positiv geladene Aminosäuren (K,R); Blau: negativ geladene Aminosäuren (D,E); Rot: hydrophobe Aminosäuren (A,I,L,F,W,V); Schwarz: polare Aminosäuren (N,C,Q,S,T,Y); grauer Balken: für YscR postulierte TMS; dunkelgrauer Balken: für HrpT postulierte TMS; gelber Balken: für HrcR experimentell bestätigte TMS. Alignment erstellt mit Clustal-W.**

Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass zwei homologe polytope Membranproteine unterschiedliche Topologien aufweisen können. Die homologen Membranproteine ORF193 und YdgQ wurden mittels PhoA-Fusionen untersucht und zeigten entgegengesetzte Topologien bei gleicher Anzahl an TMS. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit dieser beiden Proteine liegt eine unterschiedliche Verteilung der positiv geladenen Reste vor, so dass beide Proteine nach wie vor der „positive inside“-Regel folgen (Sääf *et al.*, 1999). Bei HrcR, HrpT und YscR liegt allerdings keine deutlich erkennbare Umverteilung positiver Reste vor, die auf eine Veränderung der Orientierung der Proteine in der Membran schließen lassen würden.

Da im Falle von HrcR hinreichend viele Insertionen erreicht wurden, wird von der Richtigkeit des hier aufgestellten Topologiemodells ausgegangen.

#### 4.2.2. HrcS

Bei HrcS steht das experimentell bestimmte Topologiemodell im Widerspruch zu den Vorhersagen. Die Programme untereinander stimmen mit jeweils zwei TMS in der Anzahl, allerdings nicht in ihrer Orientierung überein. Drei von fünf Programmen legen den N-Terminus des Proteins ins Periplasma. Nach Auswertung der Insertionen konnte aber nur ein TMS für HrcS ermittelt werden. Vier Insertionen (A13, L16, V20 und S21; Abbildungen 21, 32) zeigen eine rote Kolonienfärbung und befinden sich somit im zytoplasmatischen Bereich des Proteins. Die Insertionen A31 und V38 liegen sehr nahe zusammen und zeigen trotzdem eine unterschiedliche Färbung an. A31 zeigt durch seine rote Kolonienfärbung eine Aktivität von LacZ an, V38 durch die Blaufärbung Aktivität von PhoA. Diese positive Aktivität der Insertion in der Helix könnte damit begründet werden, dass fünf oder mehr Reste einer ins Periplasma führenden Helix genug sind, um die Polypeptidkette zusammen mit der Fusion durch die Membran zu leiten (Boyd *et al.*, 1987; Calamia und Manoil, 1990).

Die Insertion S50 zeigt eine Aktivität von PhoA an. Eine zweite daran anschließende transmembrane Domäne kann daher, im Gegensatz zur Vorhersage, ausgeschlossen werden. Die beiden Insertionen L80 und P86 liegen am Ende der Polypeptidkette und zeigen beide eine blaue Färbung. Bei einem zweiten TMS dürfte PhoA bei diesen Insertionen nicht aktiv sein, da sich dieser Bereich dann im Zytoplasma befände. Aufgrund der verbliebenen Länge des Proteins von ca. 35 Aminosäuren scheint es eher unwahrscheinlich zu sein, dass ein weiteres TMS vorliegt, zumal für diesen Bereich auch keine Vorhersagen über ein weiteres TMS vorliegen.

Für das HrcS-Homolog HrpU von *R. solanacearum* wurden zwei transmembrane Segmente vorausgesagt, ähnlich den Vorhersagen von HrcS. Durch eine aktive PhoA-Insertion hinter S50 konnte dieser Bereich der Polypeptidkette im Periplasma lokalisiert werden (Van Gijsegem *et al.*, 1995), daran anschließend wurde ein zweites TMS vorhergesagt (Abbildung 34). Die S50 nachfolgenden Insertionen in *Xcv* zeigen allerdings in diesem Bereich alle eine PhoA-Aktivität, weshalb von der Richtigkeit des hier für HrcS aufgestellten Topologiemodells ausgegangen wird.

```

HrcS  MDHDDLVRFTSEALLLCLKVSLPVVGVAALAGLLIAFVQAVMSLQDASIS[FALKLVVVVA 60
HrpU  MDYDNITRLTSTALLLCLLVSLPAVGVAAIAGLLISFLQAITSLQDSSIS[HGLKLIIVSL 60
      **:*:::.*:** ***** *****:*****:***: *****:***..***:**
HrcS  AIAVTAPWGASAIMQFGQALMQAAFP 86
HrpU  VIVVAAPWGAAAILQFANSIMQTLFT 86
      .*.**:*****:***:**.::***:*.

```

**Abbildung 34: Sequenzvergleich des HrcS-Proteins aus *Xcv* mit HrpU aus *R. solanacearum* (Van Gijsegem *et al.*, 1995).** Grün: positiv geladene Aminosäuren (K,R), Blau: negativ geladene Aminosäuren (D,E), Rot: hydrophobe Aminosäuren (A,I,L,F,W,V), Schwarz: polare Aminosäuren (N,C,Q,S,T,Y), grauer Balken: für HrpU postulierte TMS, gelber Balken: für HrcS experimentell bestätigte TMS; umrandet: PhoA-Insertion an Position S50. Alignment erstellt mit Clustal-W.

### 4.2.3. HrcT

Für HrcT werden fünf bis sieben TMS vorausgesagt; der Beginn des Proteins liegt in allen Fällen im Periplasma. Nach Auswertung der experimentellen Daten ergibt sich für HrcT von *Xcv* jedoch eine Topologie mit nur einer transmembranen Domäne (Abbildungen 22, 32). Die Insertionen Q14, G15, T20, V27 und M32 im N-Terminus zeigen alle eine rote Färbung der Kolonien. Dies deutet auf eine zytoplasmatische Lokalisierung hin. Die in der Polypeptidkette nachfolgenden Insertionen sind blau gefärbt. Von diesen wurden drei Insertionen mit dem neu konstruierten Topologievektor pDT erstellt.

In der Literatur gibt es zwei gut charakterisierte Beispiele für integrale Membranproteine, die eine Topologie vergleichbar mit der ermittelten von HrcT aufweisen. Die Membranproteine TolA (Levengood *et al.*, 1991; Lubkowski *et al.*, 1999) und TonB (Roof *et al.*, 1991) zeichnen sich durch drei Proteinbereiche aus. Der hydrophobe N-Terminus verankert das Protein in der zytoplasmatischen Membran des Bakteriums und bildet mit weiteren Proteinen einen Komplex (Larsen und Postle, 2001). Die anschließende Domäne durchspannt das Periplasma. Der nachfolgende C-terminale Bereich tritt sehr wahrscheinlich mit Proteinen der äußeren Membran in Kontakt.

Für das zu HrcT homologe Protein FliR des Flagellumexportapparates von *Salmonella* werden dagegen allein aufgrund bioinformatischer Analysen fünf bis sechs transmembrane Segmente vermutet, abhängig von der Lokalisierung des N-Terminus (Van Arnam *et al.*, 2004). Allerdings ist bis jetzt noch keine Untersuchung bekannt, die eine experimentell verifizierte Topologie von HrcT-homologen Proteinen beschreibt.



#### 4.2.4. HrcU

Das experimentell erstellte Topologiemodell von HrcU besitzt vier TMS sowie einen N- und C-terminalen zytoplasmatisch lokalisierten Bereich (Abbildungen 23, 32).

Die beiden Insertionen A33 und F36 liegen mit großer Wahrscheinlichkeit schon im ersten TMS des Proteins. Hier ist zu vermuten, dass durch die Insertion A33 das Protein nicht in die Membran inseriert und daher LacZ aktiv werden konnte. F36 dagegen wird in die Membran assembliert und lässt somit eine Aktivität von PhoA zu. Es ist gezeigt worden, dass die N-terminale Hälfte eines nach außen gehenden Segments ausreichend ist, den Reporter durch die Membran zu transportieren (Boyd *et al.*, 1987; Calamia und Manoil, 1990; Pourcher *et al.*, 1996; Ujwal *et al.*, 1995).

Die Lage des vierten TMS kann nicht näher eingegrenzt werden, da zwischen R208 und D290 keine weitere Insertion generiert werden konnte. Die Vorhersageprogramme lokalisieren dieses vierte Segment einheitlich im Bereich von 180 bis 200 Aminosäuren. Das dargestellte topologische Modell von HrcU stimmt mit dem Modell für das *Yersinia*-Homolog YscU überein (Allaoui *et al.*, 1994). Auch YscU besitzt einen sehr langen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich und vier TMS. Allerdings befinden sich das zweite und vierte Segment in unterschiedlichen Bereichen der Polypeptidkette (Abbildung 35). Das zweite Segment wird bei YscU in einem Bereich von Aminosäure 83 bis 100 angegeben. Bei HrcU scheint dieses Segment erst nach Aminosäure 100 zu beginnen, die zytoplasmatische Schleife ist somit sehr kurz. Das vierte TMS befindet sich bei YscU im Bereich von Aminosäure 188 bis 211, bei HrcU lässt sich der Bereich dieses Segments nicht eindeutig bestimmen und ist auf den Aminosäurebereich von 208 bis 228 festgelegt. Alle fünf Vorhersageprogramme vermuten das vierte TMS in einem Aminosäurebereich von ca. 180 bis 204.

```

HrcU  MSEEKTEKPTTEKKLRDARKDGEVPVSPDVTAAAVLFGALLVMKSA GDYFSDHMRALMTIG 60
YscU  MSGEKTEQPTPKKIRDARKKGQVAKSKEVSTTLLIVALSAAMLMLSDYFFEHL SRLMLIP 60
      ** ****:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*

HrcU  FDFSEHTRDAAA INRALGHIGIQGLLLMLPFLAACLVAGMAGGAFQTGLNASLKPVAPKF 120
YscU  AEQSYLP-FSQALSYVDNVLLLEFFYLCPLLTVAALMAIASHVVQYGFLLISGEAIKPD 119
      : * . : * : . : : : : : * : * : * : . : : * . . * * : * : : * :

HrcU  DSLNPA TGVKKLFS LRSLINLLKLIKAILIGVVLWVGIRALMPMIIGLAYETPLDVAQI 180
YscU  KKINPIEGAKRIFSIKSLVEFLKSIKVVLLSILIWIIKGNLVTLLQLPTCGIECITPL 179
      . . : * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :

HrcU  AWR T LGM L FALGVLLFVLVGAADWSVQRWLFIRDKRMSKDEQKREVKESEGDP EIKDKRK 240
YscU  LGQILRQLMVICTVGFVVISIADYAF EYYQYIKELKMSKDEIKREYKEMEGSPEIKSKRR 239
      : * * : . : * : : . * : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * :

HrcU  EFAKELVFGDPRERVAKAKVMVNPTHY AVALAYEPDDFGLPQVVAKVDDG--ALLRAFA 298
YscU  QFHQEIQSGNMRENVKRSSVVANPTHIAIGILYKRGETPLPLVTFKYTDAQVQTVRKIA 299
      : * : * : * : * * * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

HrcU  HNQGIPIVANPPLARALYQVELGD-AIPEPLFETVAVVLRWVDELGRDHGDGDGALPC 355
YscU  EEGVPILQRIPLARALYWDALVDHYIPAEQIEATAEVLRWLERQNIEKQHSEML--- 354
      . : * : * : * : * * * * * * * * * : . : * : * : * : * : * : * :

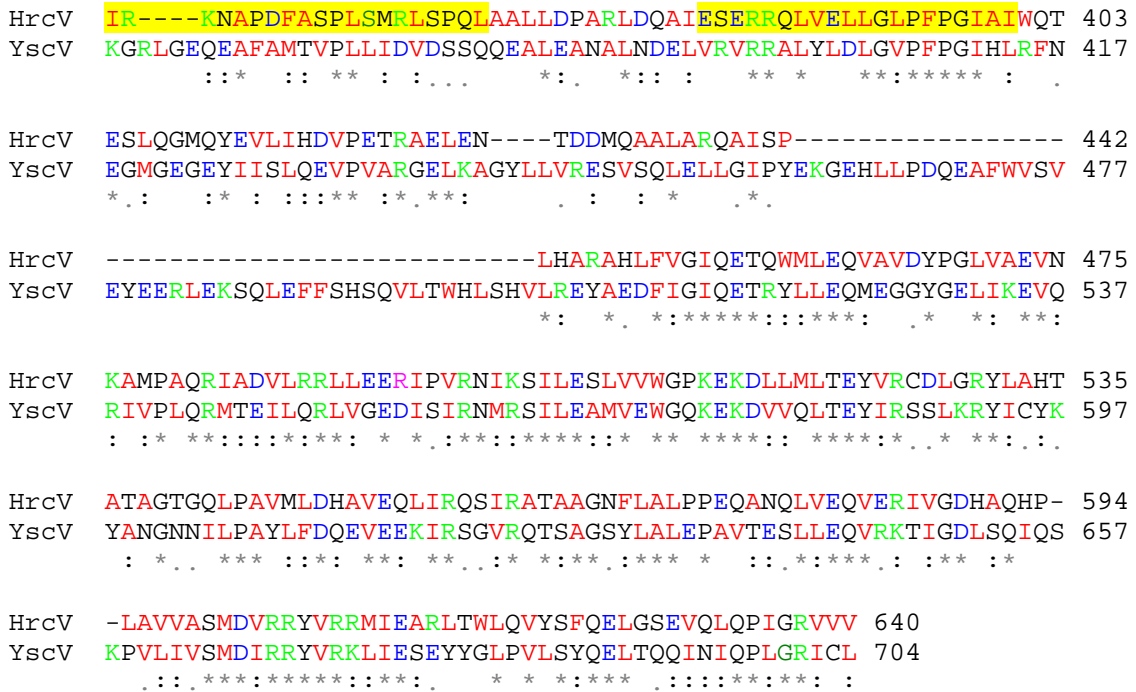
```

**Abbildung 35: Sequenzvergleich des HrcU-Proteins aus *Xcv* mit YscU aus *Y. pestis* (Allaoui *et al.*, 1994). Grün: positiv geladene Aminosäuren (K,R); Blau: negativ geladene Aminosäuren (D,E); Rot: hydrophobe Aminosäuren (A,I,L,F,W,V); Schwarz: polare Aminosäuren (N,C,Q,S,T,Y); grauer Balken: für HrpT postulierte TMS; gelber Balken: für HrcR experimentell bestätigte TMS; Unterstrich: postulierte proteolytische Spaltstelle. Alignment erstellt mit Clustal-W.**

#### 4.2.5. HrcV

Für HrcV wurden zwischen sechs und acht TMS vorhergesagt. Im dargestellten Modell ist der sehr lange C-terminale Bereich im Zytoplasma lokalisiert. Auch die Vorhersagen unterstützen in der Mehrzahl das hier dargestellte Modell mit zehn TMS und einem zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus (Abbildungen 24, 32). Die Insertionen A17 und V19 zeigen durch ihre blaue Färbung eine PhoA-Aktivität an. Wie schon erwähnt, können Insertionen in einer nach außen gehenden Helix durchaus eine PhoA-Aktivität besitzen. Ein weiterer Grund für die Wahl des zytoplasmatischen N-Terminus war das Vorhandensein von zwei positiven Aminosäuren, nämlich zwei Argininen an Position zwei und fünf. Nach der „positive inside“-Regel müsste dieser Bereich im Zytoplasma verbleiben. Die Insertion A91 zeigt eine der eher seltenen purpurfarbenen Kolonien. In diesem Fall wird angenommen, dass sowohl LacZ als auch PhoA aktiv sind. Die Farbe





**Abbildung 36: Sequenzvergleich des HrcV-Proteins aus *Xcv* mit YscV aus *Y. pestis* (Plano *et al.*, 1991). Grün: positiv geladene Aminosäuren (K,R); Blau: negativ geladene Aminosäuren (D,E); Rot: hydrophobe Aminosäuren (A,I,L,F,W,V); Schwarz: polare Aminosäuren (N,C,Q,S,T,Y); grauer Balken: für YscV postulierte TMS; gelber Balken: für HrcV experimentell bestätigte TMS. Alignment erstellt mit Clustal-W.**

Aufgrund von Topologievorhersagen wurden für das HrcV-Homolog FlhA (692 AS) von *Salmonella* acht TMS postuliert; das Protein besitzt eine sehr große C-terminale zytoplasmatische Domäne von Aminosäure 328 bis 692. Neben PhoA-Analysen des *Salmonella*-Proteins InvA, einem FlhA-Homolog, unterstützen Interaktionsstudien diese Vorhersage (Kihara *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische C-terminale Domäne von FlhA mit den zytoplasmatischen Proteinen FliH und FliI interagiert (Minamino und MacNab, 2000).

**4.2.6. HrpD5**

HrpD5 gehört zu den nicht-konservierten Proteinen und wurde bisher nur in einer Veröffentlichung als Hrc-Protein bezeichnet (Pühler *et al.*, 2004). Es ist homolog zu HrpW von *R. solanacearum* (Van Gijsegem *et al.*, 1995) und zeigt schwache Ähnlichkeiten zu den Proteinen HrpJ3 von *P. syringae* pv. *syringae* (Lidell und Hutcheson, 1994) und HrpQ von *E. amylovora* (Bogdanove *et al.*, 1996). Zur YscD-

Proteinfamilie und zu Proteinen des Flagellumexportapparates sind kaum Ähnlichkeiten feststellbar. Trotzdem ist dieses Protein essentiell für die Pathogenität des Bakteriums und wird für die Typ III-Sekretion benötigt (Rossier *et al.*, 2000). Da bisher keine nahen Verwandten zu diesem Protein in tierpathogenen Bakterien gefunden wurden und HrpD5 mit seinen Homologen in pflanzenpathogenen Bakterien eine essentielle Rolle in der Pathogenität einnimmt, wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass diese Proteine spezifische Komponenten des Typ III-Sekretionssystems pflanzenpathogener Bakterien sind (Huguet *et al.*, 1998). Ob HrpD5 tatsächlich zur YscD-Familie gehört, müssen weitere funktionelle und strukturelle Analysen erst noch zeigen.

Während die Vorhersagen zur Topologie von HrpD5 sehr unterschiedlich ausfallen - TMHMM geht sogar von einem löslichen Protein aus - ergibt das experimentell bestimmte Topologiemodell von HrpD5 ein transmembranes Segment. Daher kann HrpD5 als inneres Membranprotein und Bestandteil des Sekretionssystems angesehen werden. Alle Insertionen bis Aminosäure 116 zeigen eine LacZ-Aktivität an, der N-Terminus lässt sich folglich im Zytoplasma lokalisieren. Insertionen ab Aminosäure 159 zeigen sämtlich eine blaue Färbung und somit PhoA-Aktivität an, womit sich der gesamte C-terminale Bereich im Periplasma befindet. Die Fusion G120 zeigte eine purpurne Färbung. Hierbei handelt es sich, wie schon angesprochen, um eine „Mischpopulation“. Die Insertion befindet sich an einer sehr kritischen Stelle, die eine stabile Insertion in die Membran nicht ermöglicht.

### **4.3. Bestimmung des Transkriptions- und Translationsstarts von HrpD5**

In RT-PCR- und Komplementationsuntersuchungen (E. Weber, unveröffentlichte Daten) wurde herausgefunden, dass *hrpD5* und *hrpD6* eventuell nicht zum *hrpD*-Operon gehören, sondern mit *hrpE* ein eigenständiges Operon bilden. Primer-Extension-Studien weisen allerdings auf einen Transkriptionsstart vor *hrpE* hin (Huguet *et al.*, 1998). Allerdings konnte in der Region stromaufwärts vom mutmaßlichen Transkriptionsstart keine PIP-Box oder ein bekanntes Promotorelement gefunden werden.

Um weitere Aussagen über die Operonstruktur zu erlangen, sollte der Transkriptions- und Translationsstart von *hrpD5* bestimmt werden.

Der Transkriptionsstart von *hrpD5* wurde mittels 5'-RACE-PCR ermittelt. Nach Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde das an Position 62 (Abbildung 30) stehende Adenin als Transkriptionsstart postuliert. Dieser Startpunkt liegt 43 bp stromabwärts der im *hrpD*-Operon liegenden PIP-Box. Bei *R. solanacearum* befindet sich vor den HrpB-regulierten Genen (HrpB ist das Homolog zu HrpX in *Xcv*) eine unvollständige PIP-Box, die sogenannte *hrpII*-Box (Cunnac *et al.*, 2004). Die *hrpII*-Box wurde bisher in allen HrpB-abhängigen Promotoren gefunden. Sequenzalignments der HrpB-abhängigen Promotoren zeigten die starke Konservierung dieses Sequenzmotivs. Untersuchungen belegten, dass nur eine intakte und vollständige *hrpII*-Box im richtigen Abstand zum Transkriptionsstart die Expression des nachfolgenden Gens ermöglicht. Auch bei *hrpD5* stimmen die Abständen von der *hrpII*- oder PIP-Box mit den in *R. solanacearum* beobachteten Abständen überein. Der Transkriptionsstart von *hrpD5* beginnt an einem Adenin. Ein Adenin im gleichen Abstand konnte auch bei den HrpB-abhängig regulierten Genen von *R. solanacearum* ermittelt werden (Cunnac *et al.*, 2004). Auch bei *E. coli* gibt es eine generelle Präferenz für Purine als effizienten Startpunkte der Transkription (Lewis und Adhya, 2004).

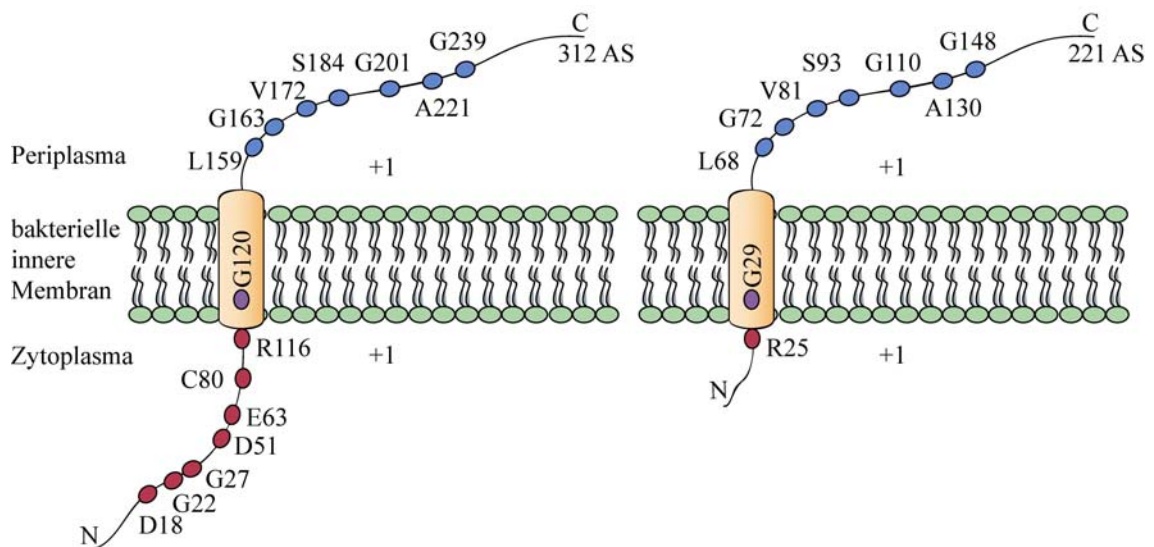
Um den translationalen Start des Proteins zu bestimmen, wurde HrpD5 C-terminal mit einem Hexahistidin-Epitop (His<sub>6</sub>) markiert, gereinigt und N-terminal sequenziert. Um sichergehen zu können, dass das Protein durch das Epitop nicht beeinträchtigt ist, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde das His<sub>6</sub>-markierte *hrpD5* - exprimiert vom broad-host-range-Vektor pBBR1MCS-5 - in den *Xcv*-Stamm 85E\* $\Delta$ *hrpD5* konjugiert. Es zeigte sich, dass dieser Stamm in der Lage war, eine mit dem Wildtyp 85E\* vergleichbare HR auf der Pflanze auszulösen.

Das Protein wurde dann im *Xcv*-Stamm 85E\* $\Delta$ *hrpD5* exprimiert und über eine HisTrap<sup>TM</sup>HP-Säule gereinigt. Bei der anschließenden Sequenzierung stellte sich allerdings heraus, dass die Sequenz des gereinigten Proteins aufgrund N-terminaler Blockierung nicht bestimmt werden konnte. Über den Translationsstart können daher zu diesem Zeitpunkt nur Vermutungen angestellt werden.

Anhand von Sequenzauswertungen kommen drei unterschiedliche Startcodone (GTG) in die engere Auswahl. Diese sind in Abbildung 30 durch einen Unterstrich kenntlich gemacht. Das an Position 274 befindliche GTG kommt am ehesten in Frage, da sich im

richtigen Abstand stromaufwärts eine unvollständige Shine-Dalgarno-Sequenz befindet. Geht man von diesem neuen Startcodon aus, würde sich die kodierende Sequenz von *hrpD5* von 939 bp um 273 Nukleotide auf 666 bp verkürzen. Das Protein HrpD5 würde dann eine Größe von 221 Aminosäuren (vorher 312) haben, was einer molekularen Masse von ca. 24 kDA entspricht. Diese Größe stimmt in etwa mit der Größe des gereinigten Proteins überein (Abbildung 29).

Geht man von der Richtigkeit des neuen Translationsstartpunktes aus und überträgt dies auf die von HrpD5 gewonnenen Daten der Topologiestudie, erhält man - wie in Abbildung 36 dargestellt - ein am N-Terminus um 91 Aminosäuren verkürztes Protein. Die Lokalisation des TMS verändert sich nicht. HrpD5 besäße dann einen sehr kurzen N-terminalen Bereich, der das Protein in der Membran verankert. Der Hauptteil des Proteins würde ins Periplasma ragen.



**Abbildung 37: Zweidimensionales Topologiemodell von (A) HrpD5 und (B) des N-terminal verkürzten HrpD5-Proteins.** Die Fusionen sind durch Kreise angedeutet, zusammen mit der Insertionsstelle (Aminosäure, nach der die Insertion erfolgte); rote Kreise: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase; blaue Kreise: Aktivität der alkalischen Phosphatase; die Anzahl der basischen Reste (K und R), die sich im Bereich von 20 Aminosäuren vor und nach einem TMS befinden, ist angegeben.

Überprüft man die verkürzte Sequenz von HrpD5 mit den in dieser Arbeit verwendeten Vorhersageprogrammen, geben TOPPRED, MEMSAT und PHD eine TMS im Aminosäurebereich von 26 bis 46 an (N-Terminus ist zytoplasmatisch), während TMHMM und HMMTOP von einem löslichen Protein ausgehen (Tabelle 13). Diese

Vorhersage würde sich mit dem Topologiemodell des N-terminal verkürzten HrpD5-Proteins decken. Auch das angenommene TMS liegt im selben Aminosäurebereich. Es ist daher durchaus naheliegend, dass es sich hier tatsächlich um den Translationsstart des Proteins HrpD5 handelt.

	HrpD5: 312 AS			HrpD5 verkürzt: 221 AS	
	TMS 1	TMS 2	Orientierung	TMS 1	Orientierung
<b>TOPPRED</b>	63-83	117-137	P	26-46	Z
<b>TMHMM</b>	löslich	-	-	löslich	löslich, zytoplasmatisch
<b>HMMTOP</b>	65-82	-	P	löslich	sekretiert, periplasmatisch
<b>MEMSAT</b>	-	118-134	P	27-43	Z
<b>PHD</b>	-	120-134	Z	28-45	Z

**Tabelle 13: Vorhersage der Topologie von HrpD5 und HrpD5 (verkürzt).** TMS: transmembrane Segmente, Länge angegeben in Aminosäuren; Z: N-Terminus liegt im Zytoplasma, P: N-Terminus liegt im Periplasma.

Zur Verifizierung dieser Daten sollte in einer weiteren Studie experimentell versucht werden, die Sequenz des Proteins zu bestimmen. Hierbei müsste zuerst untersucht werden, ob die N-terminale Blockierung des Proteins *in vivo* oder erst bei der Reinigung entstanden ist. Die Blockierung kann unter Umständen durch oxidative Veränderungen während der SDS-Gelelektrophorese oder schon auf der Reinigungssäule entstanden sein. Im letzteren Fall kann der Puffer eine große Rolle spielen. Für weiterführende Versuche hätten erst mehrere Reinigungsbedingungen getestet werden müssen, was den Rahmen dieser Arbeit allerdings gesprengt hätte. Denkbar wäre (und wird einer vertiefenden Studie vorbehalten bleiben müssen), das gereinigte Protein tryptisch zu verdauen und die erhaltenen Peptidfragmente massenspektroskopisch zu identifizieren.

Vergleicht man das ursprünglich vorhergesagte HrpD5 mit dem verwandten Protein der anderen Xanthomonaden (*X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), and *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*)), erkennt man, dass der N-terminale Bereich hoch konserviert ist. Auch der vermutete neue Translationsstart (in der Abbildung eingerahmt) und seine Umgebung sind stark



konserviert. Die im Alignment gezeigten ersten 91 Aminosäuren (Abbildung 38), würden im nicht-translatierten Bereich liegen.

```
Xcv MTMQLRVMTGTHAGARLDLAQGRYTLGSDPQTDIRIDDWPGCSLIIIEVDQDGQIRYGSDT 60
Xoo MTMQLRVLTGTHAGARLDLAPGRYTLGSDPQTDIRIDDWPGCSLSIEVDQDGQIRYSSDT 60
Xag MTMQLRVLTGTHAGARLDLAQGRYTLGSDPQTDIRIDDWPGCSLIIIEVDQDGQIRYSSDT 60
Xac MTMQLRVLTGTHAGARLDLAQGRYTLGSDPQTDIRIDDWPGCSLIIIEVDQDGQIRYSSDT 60
Xcc MTMQLRVLTGIHAGARLDLQPGSYTLGADPQAEIRIEDWPDCLIIIEVDADGQVCYRSEA 60
*****:* * ***** * *****:***:***:***.*** ***** *: *::

Xcv VQETFFVAFQPVRFGLVLCVGDAAADWPDDVALLERLLSPAPP---PAPRTSRRKVLRT 117
Xoo LPETSFVAFQPVRFGLVLCVGDAGADWPDDVALLERLLSPAPP---PAPRTSRRNIVRT 117
Xag VPETSFVAFQPVRFGLVLCIGDAGADWPDDVALLEQLLSPAPT---PAPRTSRRKVLRT 117
Xac VPETSFVAFQPVRFGLVLCIGDAGADWPDDVALLEQLLSPAPT---PAPRTSRRKVLRT 117
Xcc LPTTAFVALHPVRFGLVLCMGDAAADWPDDVALLEQLLSPAATPAAPSPRRSRRRTALRA 120
: * *****:***.*****:*****. *:* * * * :*::
```

**Abbildung 38: Ausschnitt des Aminosäure-Alignments homologer HrpD5-Proteine fünf verschiedener Xanthomonaden.** Grün: positiv geladene Aminosäuren (K,R); Blau: negativ geladene Aminosäuren (D,E); Rot: hydrophobe Aminosäuren (A,I,L,F,W,V); Schwarz: polare Aminosäuren (N,C,Q,S,T,Y); das Kästchen zeigt den möglichen Translationsstart. Alignment erstellt mit Clustal-W.

Betrachtet man allerdings das Alignment der Nukleotidsequenzen der homologen *hrpD5*-Gene, fällt auf, dass an der vermuteten Stelle kein konserviertes Startcodon vorliegt (Abbildung 39). So besitzt zwar *hrpD5* bei *Xcv*, *Xag*, *Xac* und *Xoo* ein konserviertes GTG, welches als Startcodon fungieren kann, bei *Xcc* dagegen befindet sich an dieser Stelle ein GTT. Das Codon GTT repräsentiert zwar auch die Aminosäure Valin, fungiert allerdings nicht als Startcodon. Bei *Xag* und *Xac* zeigt sich auch, dass die Shine-Dalgarno-Sequenz weniger gut ausgeprägt ist.

```
Xcv GTTGGCGATGCTGCTGCCGATTGGCCGGACGATGTGGCGCTGCTGGAGCGGCTGCTTTCC 300
Xoo GTTGGCGATGCTGGTGCCGATTGGCCGGACGATGTGGCGTTGCTGGAGCGGCTGCTTTCC 300
Xag ATTGGCGATGCTGGTGCCGATTGGCCAGACGATGTGGCGCTGCTGGAGCAGCTGCTTTCC 300
Xac ATTGGCGATGCTGGTGCCGATTGGCCAGACGATGTGGCGCTGCTGGAGCAGCTGCTTTCC 300
Xcc ATGGGCGACGCTGCGGCCGATTGGCCGGACGATGTTGCGCTGCTGGAGCAGCTACTGTCTG 300
* ***** * * ***** ***** ***** * * ***** * * * * *
SD
```

**Abbildung 39: Ausschnitt des Alignments der Nukleotidsequenz homologer hrpD5-Gene fünf verschiedener Xanthomonaden.** Rot: vermutetes Startcodon; Blau/Orange: Shine-Dalgarno-Sequenz. Alignment erstellt mit Clustal-W.

Die Operonstruktur, der Transkriptions- und Translationsstart von HrpD5 werfen also noch einige Fragen auf. Vor allem die unterschiedlichen Ergebnisse, die durch RT-PCR (E. Weber, unveröffentlichte Daten) und Primer-Extension-Studien der Operone (Huguet *et al.*, 1998) gewonnen wurden, sind schwierig zu diskutieren. Es wäre allerdings denkbar, dass eine ähnliche Situation vorliegt wie bei der Biogenese der

Fimbrien von *E. coli* (Balsalobre *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 1996), bei der eine posttranskriptionelle mRNA-Prozessierung erörtert wurde, die die Expressionsrate einzelner Gene bestimmt. Ein ähnlicher Vorgang könnte auch im vorliegenden Fall stattfinden. Um diese Vermutungen belegen zu können, würden sich Northern Blot-Untersuchungen der entsprechenden Operone anbieten, um die Größe der einzelnen Transkripte bestimmen zu können.

#### **4.4. Etablierung eines in *Xcv* induzierbaren und vollständig reprimierbaren Vektorsystems**

Gesucht wurde ein Vektorsystem, das in *Xcv* eine ausreichende und dicht regulierbare Genexpression ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde der schon mit positiven Ergebnissen in *Xanthomonas campestris* pv. *phaesoli* verwendete broad-host-range-Vektor pBBad22K (Sukchawalit *et al.*, 1999) in *Xcv* getestet. In einer zweiten Untersuchung wurde der Promotorbereich des *cop*-Operons anstelle des vorhandenen *lac*-Promotors in den broad-host-range-Vektor pBBR1-MCS5 (Gentamycin<sup>R</sup>) (Kovach *et al.*, 1995) kloniert und ebenfalls auf eine ausreichende und dicht regulierbare Genexpression in *Xcv* getestet.

Im verwendeten Vektor pBBad22K befindet sich die multiple Klonierungsstelle unter der Transkriptionskontrolle des *E. coli*-BAD-Promotors (P<sub>BAD</sub>) und des regulatorischen *araC*-Gens. Das AraC-Protein ist sowohl ein negativer wie auch positiver Regulator (Carra und Schleif, 1993; Lobell und Schleif, 1990). Durch die Induktion mit L-Arabinose wird die Transkription vom P<sub>BAD</sub>-Promotor gestartet; ohne Induktion erfolgt die Transkription auf einer sehr geringen Ebene (Lee *et al.*, 1987). Die Transkription kann durch die Zugabe von Glukose vollständig unterdrückt werden. Glukose reduziert den Anteil an cAMP (zyklisches AMP; Adenosin-3'-5'-monophosphat) und reprimiert den P<sub>BAD</sub>-Promotor in *E. coli* (Miyada *et al.*, 1984).

In den Vektor pBBad22K wurde das *hrcN*-Gen kloniert und dessen Expression unter verschiedenen Induktionsbedingungen getestet. Nach Auswertung der Western Blot-Analysen zeigte sich, dass auch ohne Induktion mit L-Arabinose schon eine deutliche Expression des Gens vorlag. Die nachfolgende Induktion des Promotors führte zwar zu einer Erhöhung der Expression, ließ sich aber durch höhere Arabinosekonzentrationen

nicht signifikant steigern. In *Xcp* war es dagegen möglich, die sehr schwache Expression (ohne Induktion) durch eine Endkonzentration von 0,02% L-Arabinose im Medium signifikant zu erhöhen (Sukchawalit *et al.*, 1999). Diese Konzentration von L-Arabinose ist zehnmal geringer als die höchste getestete Konzentration bei *Xcv* mit 0,2%.

Da der Promotor durch Zugabe von Glukose reprimiert werden kann, wurde versucht, eine Abschaltung des Gens zu erzielen. Es zeigte sich allerdings, dass in *Xcv* durch die Zugabe von Glukose der Promotor nicht zu beeinflussen war. Selbst beim Wachstum der Bakterienkulturen über Nacht in glukosehaltigem Medium erfolgte keine Reprimierung des Promotors. In Untersuchungen mit *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Promotor durch die Zugabe von Glukose sehr schnell und effizient reprimiert werden kann (Guzman *et al.*, 1995).

Die volle Aktivität des P<sub>BAD</sub>-Promotors benötigt die CRP-Protein-Interaktion im Arabinoseoperon. CRP („cAMP receptor protein“) bindet an cAMP („cyclic adenosine monophosphat“) und ermöglicht so eine Strukturveränderung des Proteins, das sich dadurch mit hoher Spezifität an einen DNA-Abschnitt direkt vor den Promotor legen kann. Es wird angenommen, dass heterologe CRP-Proteine in *P. aeruginosa* und *Xcp* ähnlich auf den *E. coli*-P<sub>BAD</sub>-Promotor wirken könnten, da in *Xcp* ein Expressionsanstieg bei Induktion mit L-Arabinose zu erkennen war (Sukchawalit *et al.*, 1999). In *Xcv* konnte diese Vermutung hingegen nicht im vollen Maße bestätigt werden, obwohl das CRP-Gen in der Genomsequenz von *Xcv* annotiert wurde (R. Koebnik, persönliche Mitteilung).

Da es nicht möglich war, mit diesem Promotor eine dichte und regulierbare Expression in *Xcv* zu erlangen, erwies er sich leider für die geplanten Untersuchungen als unbrauchbar. Es wurde daher nach einem Promotor gesucht, der aus dem Bakterium selbst kommen sollte. Für dieses Vorhaben schien der Promotor des *cop*-Operons, das die Resistenz gegenüber Kupfer kodiert, geeignet zu sein. Das *cop*-Operon besteht aus den vier offenen Leserastern *copA* bis *copD* und wurde in *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (*Xcj*) näher untersucht (Lee *et al.*, 1994). Es besitzt eine sehr hohe Ähnlichkeit zum *cop*-Operon von *Xcv*. Die Promotorsequenz und die transkriptionellen Startpunkte der *cop*-Gene wurden bei Untersuchungen in *Xcj* nicht näher bestimmt; eine Shine-Dalgarno-Sequenz befindet sich aber sowohl in *Xcj* als auch in *Xcv* im richtigen Abstand zum vermuteten Translationsstart von *copA*.

---

Der Promotorbereich wurde aus genomischer DNA des *Xcv*-Stammes 85-10 mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBBR1-MCS5 (Kovach *et al.*, 1995) kloniert. Um die Aktivität und Induzierbarkeit des Promotors zu kontrollieren, wurde das *uidA*-Gen, das die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert, in den neu entstandenen Vektor pCOP kloniert. Die Aktivität des Enzyms kann durch einen speziellen Aktivitätstest gemessen werden. Die Induzierbarkeit des *cop*-Promotors wurde im sehr reichen NYG-Medium, im Minimalmedium MA (mit und ohne Casaminosäuren) und im MA-Medium, dem der Ionenaustauscher Chelex-100 zugesetzt wurde, getestet. In keinem Medium konnte der Promotor durch die Zugabe von Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) gesteuert werden, d.h. es konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivität des GUS-Gens zwischen uninduzierter und induzierter Probe festgestellt werden.

Im homologen Kupferoperon von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine starke Expression durch den Promotor des Operons nur möglich ist, wenn weitere regulatorische Gene anwesend sind (Munson *et al.*, 2000). Dem hier verwendeten Expressionssystem fehlt möglicherweise der positive Regulator, ohne den eine gesteigerte Expression nicht möglich ist. Damit übereinstimmend konnten im Genom von *Xcv* bisher keine weiteren zum *cop*-Operon zugehörigen regulatorischen Gene identifiziert werden. Dies würde die relativ geringe Expression erklären.

Eine Erklärung für die ausbleibende Repression des *cop*-Promotors wäre die Verwendung von Kupfersulfat als Pflanzenschutzmittel, das über einen sehr langen Zeitraum gegen zahlreiche bakterielle Erkrankungen eingesetzt wurde. Durch immer häufiger auftretende Resistenzen verloren die Mittel an Wirksamkeit (Marco und Stall, 1983). Kupferresistente Stämme von *Xcv* konnten aus solchen Tomaten- und Paprikapflanzen isoliert werden, die regelmäßig mit kupferhaltigen Mitteln behandelt wurden (Williams *et al.*, 1993). Denkbar wäre, dass der Promotor des *cop*-Operons daher konstitutiv exprimiert wird.

Da beide hier untersuchten Promotoren nicht die gewünschte Regulierbarkeit des zu exprimierenden Gens bieten konnten, wurden die Experimente eingestellt.

#### 4.5. Konstruktion einer Lon-Protease-Mutante in *Xcv*

In *Xcv* wurde das *lon*-Gen in den Stämmen 82\*, 85-10 und 85\* deletiert. Die unterschiedlichen  $\Delta lon$ -Stämme wurden auf der Pflanze in verschiedenen Titern getestet. Es wurde untersucht, ob das Bakterium durch die fehlende Lon-Protease in der Lage ist, schneller ein funktionsfähiges TTSS aufzubauen, um die Pflanze zu besiedeln. Dies wäre der Fall gewesen, wenn die Pflanze - verglichen mit dem Wildtypstamm - verfrühte Krankheits- oder Abwehrsymptome gezeigt hätte. Im Vergleich mit dem Wildtyp war jedoch kein  $\Delta lon$ -Stamm in der Lage, eine signifikant schnellere Reaktion auszulösen. Auch die bei *P. syringae* beschriebene vermehrte Sekretion von Effektorproteinen (Bretz *et al.*, 2002) konnte in *Xcv* nicht beobachtet werden. Die AvrBs3-Sekretion des  $\Delta lon$ -Stamms 82\* ähnelte der des Wildtyps.

Ein bedeutsamer Aspekt der Lon-Protease ist ihre Fähigkeit, die Expression von TTSS in *P. syringae* und *S. enterica* zu kontrollieren.

Die exprimierten Gene der SPI1 (Salmonella Pathogenicity Island 1) von *S. enterica* kodieren für ein bakterielles TTSS und zahlreiche Effektorproteine. Reguliert wird die Expression dieser Gene hauptsächlich durch *hilA*, das für einen Transkriptionsaktivator der OmpR/ToxR-Familie kodiert. HilA aktiviert Promotoren der SPI1-Operone, die für das TTSS kodieren, sowie *InvF* (Lucas *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass in  $\Delta lon$ -Mutanten die Transkription von *hilA* und *invF* stark anstieg und *Salmonella* verstärkt in der Lage war, *in vitro* Epithel-Zellen zu befallen. Außerdem stieg die Anzahl der ins Medium sekretierten Effektorproteine SipA, SipC und SipD (Takaya *et al.*, 2002). Es steht somit fest, dass die Lon-Protease die Expression von Invasionsgenen negativ beeinflusst.

In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Lon-Protease die Regulierung der *hilA*-Expression kontrolliert und somit das Überleben der bakteriellen Zellen nach einer Infektion sicherstellt. Bei einer Mutation des *lon*-Gens kommt es zu einem ca. zehnfachen Anstieg der *hilA*-Expression und einem signifikanten Abfall des bakteriellen Wachstums (Boddicker und Jones, 2004). Schon im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass  $\Delta lon$ -Stämme von *S. enterica* nicht mehr in der Lage sind, eine letale Infektion in Mäusen hervorzurufen (Takaya *et al.*, 2003).

Auch in *Pseudomonas syringae* fungiert die Lon-Protease als negativer Regulator der Typ III-Proteinsekretion. Lon-Mutanten in *P. syringae* zeigen eine erheblich höhere Sekretion von Effektoren und induzieren schnellere Abwehrreaktionen in resistenten Pflanzen (Bretz *et al.*, 2002).

Die Expression der *hrp*-Gene wird kontrolliert durch den alternativen Sigmafaktor HrpL. Der *hrpL*-Promotor wiederum benötigt zur Aktivierung einen Komplex aus HrpR und HrpS. Das *hrpRS*-Operon wird durch den *hrpR*-Promotor kontrolliert. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von *hrpL* in  $\Delta lon$ -Mutanten von *P. syringae* stark erhöht ist. Die Lon-Protease wirkt allerdings nicht direkt auf HrpL ein, sondern greift durch die Proteolyse von HrpR weiter stromaufwärts in die regulatorische Kaskade ein.

Bei *Y. pestis* hingegen wird in  $\Delta lon$ -Stämmen gar kein funktionelles TTSS ausgebildet, so dass dort auch die Sekretion der Effektorproteine abnimmt und nicht wie in den vorhergehenden Beispielen ansteigt. Dies wird sehr wahrscheinlich durch das Protein YmoA begünstigt. Erst bei der temperatursensitiven Degradation von YmoA kommt es zum Aufbau des TTSS. In  $\Delta lon$ -Mutanten wird dieses Protein nicht abgebaut (Jackson *et al.*, 2004).

Untersuchungen zum Vergleich der UV-Sensitivität vom Wildtyp-*Xcv*-Stamm und der *Xcv*- $\Delta lon$ -Mutante zeigten keinen Unterschied. Auch eine unterschiedliche Größe der Zellen bzw. eine Neigung zur Filamentbildung aufgrund von Zellteilungsdefekten konnte nicht festgestellt werden. Im Tierpathogen *S. enterica* dagegen wurde gezeigt, dass der  $\Delta lon$ -Stamm extrem sensitiv gegenüber UV-Licht reagierte (Takaya *et al.*, 2003). In  $\Delta lon$ -Stämmen des pflanzenpathogenen Bakteriums *P. syringae* konnten neben der stark angestiegenen UV-Sensitivität auch bis zu vierfach größere Zellen beobachtet werden (Bretz *et al.*, 2002). Die Lon-Protease spielt auch eine Rolle bei der Regulation der Expression eines Typ IV-Sekretionssystems bei *Agrobacterium tumefaciens*. Interessanterweise weisen jedoch *lon*-Mutanten von *A. tumefaciens* ebenso wie *Xcv* keine UV-Überempfindlichkeit oder veränderte Zellmorphologie auf (S.K. Farrand, persönliche Mitteilung).

Es stellt sich also die Frage, ob die Lon-Protease in *Xcv* eine Rolle in der Regulation des TTSS spielt oder nicht. Verglichen mit dem Gruppe-I-Bakterium *P. syringae* (Kapitel

---

1.2.2.1.) verläuft die Regulation des TTSS in *Xcv* über andere transkriptionelle Aktivatoren (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996). In *Xcv* sind die außerhalb des *hrp*-Genclusters liegenden Proteine HrpG, das zur OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Regulatoren gehört, und HrpX, das ein Regulator der AraC/XylS-Familie ist, für die Regulation verantwortlich (Bonas *et al.*, 1991). Weitere Regulatoren konnten bisher nicht gefunden werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aizawa, S. I. (2001). "Bacterial flagella and type III secretion systems." FEMS Microbiol Lett **202**(2): 157-64.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2004). "Genetic analysis of the Salmonella enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains." J Bacteriol **186**(8): 2402-12.
- Akiyama, Y. and K. Ito (1993). "Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase in vitro and in vivo." J Biol Chem **268**(11): 8146-50.
- Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. Ramos, A. C. da Silva and C. S. Farah (2004). "New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis Pathovar citri." J Bacteriol **186**(18): 6186-97.
- Alexeyev, M. F. and H. H. Winkler (1999). "Membrane topology of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase revealed by novel dual pho-lac reporters." J Mol Biol **285**(4): 1503-13.
- Alexeyev, M. F. and H. H. Winkler (2002). "Transposable dual reporters for studying the structure-function relationships in membrane proteins: permissive sites in R. prowazekii ATP/ADP translocase." Biochemistry **41**(1): 406-14.
- Alfano, J. R. and A. Collmer (1997). "The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death." J Bacteriol **179**(18): 5655-62.
- Allaoui, A., P. J. Sansonetti and C. Parsot (1992). "MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of Shigella Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the Yersinia Yop proteins." J Bacteriol **174**(23): 7661-9.
- Allaoui, A., P. J. Sansonetti and C. Parsot (1993). "MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins." Mol Microbiol **7**(1): 59-68.
- Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluifers and G. R. Cornelis (1994). "YscU, a Yersinia enterocolitica inner membrane protein involved in Yop secretion." J Bacteriol **176**(15): 4534-42.
- Andersen, C. (2003). "Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria." Rev Physiol Biochem Pharmacol **147**: 122-65.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1996). "Current protocols in molecular biology." New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Balsalobre, C., J. Morschhauser, J. Jass, J. Hacker and B. E. Uhlin (2003). "Transcriptional analysis of the sfa determinant revealing mmRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic Escherichia coli." J Bacteriol **185**(2): 620-9.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Binet, R., S. Letoffe, J. M. Ghigo, P. Delepelaire and C. Wandersman (1997). "Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review." Gene **192**(1): 7-11.



- Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti and A. Allaoui (2001). "Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion." Mol Microbiol **39**(3): 652-63.
- Blocker, A., K. Komoriya and S. Aizawa (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3027-30.
- Boddicker, J. D. and B. D. Jones (2004). "Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells." Infect Immun **72**(4): 2002-13.
- Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos and F. Van Gijsegem (1996). "Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria." Mol Microbiol **20**(3): 681-3.
- Bogdanove, A. J., Z. M. Wei, L. Zhao and S. V. Beer (1996). "Erwinia amylovora secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of yopN of *Yersinia* spp." J Bacteriol **178**(6): 1720-30.
- Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz and R. E. Stall (1991). "Isolation of a genecluster from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato." Mol Plant Microbe Interact **4**: 81-88.
- Bonas, U., R. E. Stall and B. Staskawicz (1989). "Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria." Mol Gen Genet **218**(1): 127-36.
- Boyd, D., C. Manoil and J. Beckwith (1987). "Determinants of membrane protein topology." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8525-9.
- Bretz, J., L. Losada, K. Lisboa and S. W. Hutcheson (2002). "Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*." Mol Microbiol **45**(2): 397-409.
- Brito, B., M. Marena, P. Barberis, C. Boucher and S. Genin (1999). "prhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*." Mol Microbiol **31**(1): 237-51.
- Brown, I. R., J. W. Mansfield, S. Taira, E. Roine and 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**(3): 394-404.
- Burns, D. L. (2003). "Type IV transporters of pathogenic bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(1): 29-34.
- Büttner, D. and U. Bonas (2002). "Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell." Embo J **21**(20): 5313-22.
- Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noël and U. Bonas (2004). "HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion." Mol Microbiol **54**(3): 755-68.
- Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klusener and U. Bonas (2002). "Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria." J Bacteriol **184**(9): 2389-98.
- Calamia, J. and C. Manoil (1990). "lac permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 4937-41.

- Carra, J. H. and R. F. Schleif (1993). "Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein." *Embo J* **12**(1): 35-44.
- Christie, P. J. (2001). "Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines." *Mol Microbiol* **40**(2): 294-305.
- Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins and C. Hughes (2003). "Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly." *Mol Microbiol* **48**(5): 1349-55.
- Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." *Annu Rev Microbiol* **54**: 735-74.
- Cunnac, S., C. Boucher and S. Genin (2004). "Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*." *J Bacteriol* **186**(8): 2309-18.
- da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal and J. P. Kitajima (2002). "Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities." *Nature* **417**(6887): 459-63.
- Dalbey, R. E., M. Chen, F. Jiang and J. C. Samuelson (2000). "Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 435-42.
- Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde and A. H. Fielding (1984). "Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1." *EMBO J* **3**: 3323-3328.
- Derman, A. I. and J. Beckwith (1991). "Escherichia coli alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm." *J Bacteriol* **173**(23): 7719-22.
- Derman, A. I., W. A. Prinz, D. Belin and J. Beckwith (1993). "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli." *Science* **262**(5140): 1744-7.
- Dmitrova, M., G. Younes-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr and M. Granger-Schnarr (1998). "A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in Escherichia coli." *Mol Gen Genet* **257**(2): 205-12.
- Drew, D., D. Sjostrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier and G. von Heijne (2002). "Rapid topology mapping of Escherichia coli inner-membrane

- proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2690-5.
- Driessen, A. J., P. Fekkes and J. P. van der Wolk (1998). "The Sec system." Curr Opin Microbiol **1**(2): 216-22.
- Dünnwald, M., A. Varshavsky and N. Johnsson (1999). "Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **10**(2): 329-44.
- Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz and S. A. Lloyd (2003). "YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system." J Bacteriol **185**(7): 2259-66.
- Engelman, D. M., Y. Chen, C. N. Chin, A. R. Curran, A. M. Dixon, A. D. Dupuy, A. S. Lee, U. Lehnert, E. E. Matthews, Y. K. Reshetnyak, A. Senes and J. L. Popot (2003). "Membrane protein folding: beyond the two stage model." FEBS Lett **555**(1): 122-5.
- Fenselau, S. and U. Bonas (1995). "Sequence and expression analysis of the hrpB pathogenicity operon of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems." Mol Plant Microbe Interact **8**(6): 845-54.
- Fields, K. A., G. V. Plano and S. C. Straley (1994). "A low-Ca<sup>2+</sup> response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in Yersinia pestis." J Bacteriol **176**(3): 569-79.
- Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1648-52.
- Fischer, W., R. Haas and S. Odenbreit (2002). "Type IV secretion systems in pathogenic bacteria." Int J Med Microbiol **292**(3-4): 159-68.
- Francis, M. S., H. Wolf-Watz and A. Forsberg (2002). "Regulation of type III secretion systems." Curr Opin Microbiol **5**(2): 166-72.
- Galan, J. E., C. Ginocchio and P. Costeas (1992). "Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family." J Bacteriol **174**(13): 4338-49.
- Gottesman, S., E. Halpern and P. Trisler (1981). "Role of sulA and sulB in Filamentation by Lon Mutants of Escherichia coli K-12." J Bacteriol: 265-273.
- Gurezka, R. and D. Langosch (2001). "In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT." J Biol Chem **276**(49): 45580-7.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J Bacteriol **177**(14): 4121-30.
- He, S. Y. (1998). "Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria." Annu Rev Phytopathol **36**: 363-92.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia and J. P. Nataro (1998). "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins." Trends Microbiol **6**(9): 370-8.
- Hendrickson, E. L., P. Guevera and F. M. Ausubel (2000). "The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in Pseudomonas syringae pv. maculicola and acts at the level of hrpL transcription." J Bacteriol **182**(12): 3508-16.

- Hu, W., J. Yuan, Q. L. Jin, P. Hart and 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**(2): 234-41.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 379-433.
- Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik and U. Bonas (1998). "hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction." Mol Microbiol **29**(6): 1379-90.
- Hutcheson, S. W., J. Bretz, T. Sussan, S. Jin and K. Pak (2001). "Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains." J Bacteriol **183**(19): 5589-98.
- Jackson, M. W. and G. V. Plano (2000). "Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 85-90.
- Jackson, M. W., E. Silva-Herzog and G. V. Plano (2004). "The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein." Mol Microbiol **54**(5): 1364-78.
- Jacob-Dubuisson, F., C. Locht and R. Antoine (2001). "Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins." Mol Microbiol **40**(2): 306-13.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan (1987). "GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." The EMBO Journal **6**: 3901-3907.
- Jin, Q. and S. Y. He (2001). "Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*." Science **294**(5551): 2556-8.
- Johnsson, N. and A. Varshavsky (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10340-4.
- Jones, D. T., W. R. Taylor and J. M. Thornton (1994). "A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology." Biochemistry **33**(10): 3038-49.
- Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi and R. M. Macnab (2001). "Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus." J Bacteriol **183**(5): 1655-62.
- Knoop, V., B. Staskawicz and U. Bonas (1991). "Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is not under the control of hrp genes and is independent of plant factors." J Bacteriol **173**(22): 7142-50.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd and K. M. Peterson (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne and E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-80.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan and S. I. Aizawa (1998). "Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Science **280**(5363): 602-5.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Langosch, D., B. Brosig, H. Kolmar and H. J. Fritz (1996). "Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator." J Mol Biol **263**(4): 525-30.
- Larsen, R. A. and K. Postle (2001). "Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force." J Biol Chem **276**(11): 8111-7.
- Lavander, M., L. Sundberg, P. J. Edqvist, S. A. Lloyd, H. Wolf-Watz and A. Forsberg (2002). "Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion." J Bacteriol **184**(16): 4500-9.
- Lee, C., P. Li, H. Inouye, E. R. Brickman and J. Beckwith (1989). "Genetic studies on the inability of beta-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane." J Bacteriol **171**(9): 4609-16.
- Lee, N., C. Francklyn and E. P. Hamilton (1987). "Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 8814-8.
- Lee, Y. A., M. Hendson, N. J. Panopoulos and M. N. Schroth (1994). "Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase." J Bacteriol **176**(1): 173-88.
- Leeds, J. A. and J. Beckwith (1998). "Lambda repressor N-terminal DNA-binding domain as an assay for protein transmembrane segment interactions in vivo." J Mol Biol **280**(5): 799-810.
- Levengood, S. K., W. F. Beyer, Jr. and R. E. Webster (1991). "TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 5939-43.
- Lewis, D. E. and S. Adhya (2004). "Axiom of determining transcription start points by RNA polymerase in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **54**(3): 692-701.
- Li, C. M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk and 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." Embo J **21**(8): 1909-15.
- Lidell, M. C. and S. W. Hutcheson (1994). "Characterization of the *hrpJ* and *hrpU* operons of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61: similarity with components of enteric bacteria involved in flagellar biogenesis and demonstration of their role in HarpinPss secretion." Mol Plant Microbe Interact **7**(4): 488-97.
- Lobell, R. B. and R. F. Schleif (1990). "DNA looping and unlooping by AraC protein." Science **250**(4980): 528-32.
- Lubkowski, J., F. Hennecke, A. Pluckthun and A. Wlodawer (1999). "Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA." Structure Fold Des **7**(6): 711-22.
- Lucas, R. L., C. P. Lostroh, C. C. DiRusso, M. P. Spector, B. L. Wanner and C. A. Lee (2000). "Multiple factors independently regulate *hlyA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium." J Bacteriol **182**(7): 1872-82.

- Macnab, R. M. (1999). "The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus." *J Bacteriol* **181**(23): 7149-53.
- Manoil, C. (1991). "Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and beta-galactosidase gene fusions." *Methods Cell Biol* **34**: 61-75.
- Manoil, C. and J. Beckwith (1986). "A genetic approach to analyzing membrane protein topology." *Science* **233**(4771): 1403-8.
- Manoil, C., J. J. Mekalanos and J. Beckwith (1990). "Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location." *J Bacteriol* **172**(2): 515-8.
- Marco, G. M. and R. E. Stall (1983). "Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomons campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper." *Plant Dis.* **67**: 779-781.
- Marenda, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher and M. Arlat (1998). "PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells." *Mol Microbiol* **27**(2): 437-53.
- McMurry, J. L., J. S. Van Arnem, M. Kihara and R. M. Macnab (2004). "Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery." *J Bacteriol* **186**(22): 7586-92.
- Menard, R., P. J. Sansonetti and C. Parsot (1993). "Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells." *J Bacteriol* **175**(18): 5899-906.
- Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruyschaert and G. Cornelis (1990). "Secretion of Yop proteins by *Yersinia*." *Infect Immun* **58**(9): 2840-9.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (1999). "Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates." *J Bacteriol* **181**(5): 1388-94.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (2000). "Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching." *J Bacteriol* **182**(17): 4906-14.
- Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). "FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity." *Mol Microbiol* **37**(6): 1494-503.
- Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). "Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates." *Mol Microbiol* **35**(5): 1052-64.
- Minamino, T. and K. Namba (2004). "Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum." *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(1-2): 5-17.
- Minamino, T., J. R. Tame, K. Namba and R. M. Macnab (2001). "Proteolytic analysis of the FliH/FliI complex, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*." *J Mol Biol* **312**(5): 1027-36.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., R. E. G.-f.-g. r. s. d. r. i. and Stall, M. P.-M. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions and -. Interactions 3 (1990). "Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions." *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 41-47.
- Miyada, C. G., L. Stoltzfus and G. Wilcox (1984). "Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(13): 4120-4.

- Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten and T. V. O'Halloran (2000). "Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **182**(20): 5864-71.
- Nilsson, I. and G. von Heijne (1990). "Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids." Cell **62**(6): 1135-41.
- Nilsson, J., B. Persson and G. von Heijne (2000). "Consensus predictions of membrane protein topology." FEBS Lett **486**(3): 267-9.
- Nilsson, P., S. Naureckiene and B. E. Uhlin (1996). "Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* pap operon." J Bacteriol **178**(3): 683-90.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel and U. Bonas (2001). "cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Mol Microbiol **41**(6): 1271-81.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel and U. Bonas (2002). "Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island." J Bacteriol **184**(5): 1340-8.
- Plano, G. V., S. S. Barve and S. C. Straley (1991). "LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response." J Bacteriol **173**(22): 7293-303.
- Popot, J. L. and D. M. Engelman (1990). "Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model." Biochemistry **29**(17): 4031-7.
- Popot, J. L. and D. M. Engelman (2000). "Helical membrane protein folding, stability, and evolution." Annu Rev Biochem **69**: 881-922.
- Porte, D., P. Oertel-Buchheit, M. Granger-Schnarr and M. Schnarr (1995). "Fos leucine zipper variants with increased association capacity." J Biol Chem **270**(39): 22721-30.
- Pourcher, T., E. Bibi, H. R. Kaback and G. Leblanc (1996). "Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis." Biochemistry **35**(13): 4161-8.
- Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou and A. Economou (2003). "Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization." J Biol Chem **278**(28): 25816-24.
- Prinz, W. A., D. H. Boyd, M. Ehrmann and J. Beckwith (1998). "The protein translocation apparatus contributes to determining the topology of an integral membrane protein in *Escherichia coli*." J Biol Chem **273**(14): 8419-24.
- Pugsley, A. P., O. Francetic, K. Hardie, O. M. Possot, N. Sauvonnnet and A. Seydel (1997). "Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria." Folia Microbiol (Praha) **42**(3): 184-92.
- Pühler, A., M. Arlat, A. Becker, M. Göttfert, J. P. Morrissey and F. O'Gara (2004). "What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions?" Curr Opin Plant Biol **7**(2): 137-47.
- Reinders, A., W. Schulze, S. Thaminy, I. Stagljar, W. B. Frommer and J. M. Ward (2002). "Intra- and intermolecular interactions in sucrose transporters at the plasma membrane detected by the split-ubiquitin system and functional assays." Structure (Camb) **10**(6): 763-72.

- Roof, S. K., J. D. Allard, K. P. Bertrand and K. Postle (1991). "Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology by use of PhoA fusions." J Bacteriol **173**(17): 5554-7.
- Rossier, O., G. Van den Ackerveken and U. Bonas (2000). "HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant." Mol Microbiol **38**(4): 828-38.
- Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn and U. Bonas (1999). "The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9368-73.
- Rost, B., R. Casadio and P. Fariselli (1996). "Refining neural network predictions for helical transmembrane proteins by dynamic programming." Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol **4**: 192-200.
- Russ, W. P. and D. M. Engelman (1999). "TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 863-8.
- Rutz, C., W. Rosenthal and R. Schulein (1999). "A single negatively charged residue affects the orientation of a membrane protein in the inner membrane of *Escherichia coli* only when it is located adjacent to a transmembrane domain." J Biol Chem **274**(47): 33757-63.
- Sääf, A., M. Johansson, E. Wallin and G. von Heijne (1999). "Divergent evolution of membrane protein topology: the *Escherichia coli* RnfA and RnfE homologues." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8540-4.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**: 1350-1354.
- Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach and C. A. Boucher (2002). "Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*." Nature **415**(6871): 497-502.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- Sandkvist, M. (2001). "Biology of type II secretion." Mol Microbiol **40**(2): 271-83.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-5467.
- Schneider, D. and D. M. Engelman (2003). "GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane." J Biol Chem **278**(5): 3105-11.
- Schulte, R. and 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." J Bacteriol **174**(3): 815-23.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa and 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**(20): 11638-43.



- Seligman, L. and C. Manoil (1994). "An amphipathic sequence determinant of membrane protein topology." *J Biol Chem* **269**(31): 19888-96.
- Silhavy, T. J. and J. R. Beckwith (1985). "Uses of lac fusions for the study of biological problems." *Microbiol Rev* **49**(4): 398-418.
- Simpson, A. J., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bove, M. R. Briones, M. R. Bueno, A. A. Camargo, L. E. Camargo, D. M. Carraro, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. Costa, C. M. Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A. P. Facincani, A. J. Ferreira, V. C. Ferreira, J. A. Ferro, J. S. Fraga, S. C. Franca, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Furlan, M. Garnier, G. H. Goldman, M. H. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Krieger, E. E. Kuramae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. Madeira, H. M. Madeira, C. L. Marino, M. V. Marques, E. A. Martins, E. M. Martins, A. Y. Matsukuma, C. F. Menck, E. C. Miracca, C. Y. Miyaki, C. B. Monteriro-Vitarello, D. H. Moon, M. A. Nagai, A. L. Nascimento, L. E. Netto, A. Nhani, Jr., F. G. Nobrega, L. R. Nunes, M. A. Oliveira, M. C. de Oliveira, R. C. de Oliveira, D. A. Palmieri, A. Paris, B. R. Peixoto, G. A. Pereira, H. A. Pereira, Jr., J. B. Pesquero, R. B. Quaggio, P. G. Roberto, V. Rodrigues, M. R. A. J. de, V. E. de Rosa, Jr., R. G. de Sa, R. V. Santelli, H. E. Sawasaki, A. C. da Silva, A. M. da Silva, F. R. da Silva, W. A. da Silva, Jr., J. F. da Silveira, M. L. Silvestri, W. J. Siqueira, A. A. de Souza, A. P. de Souza, M. F. Terenzi, D. Truffi, S. M. Tsai, M. H. Tshako, H. Vallada, M. A. Van Sluys, S. Verjovski-Almeida, A. L. Vettore, M. A. Zago, M. Zatz, J. Meidanis and J. C. Setubal (2000). "The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis." *Nature* **406**(6792): 151-7.
- Snyder, W. B. and T. J. Silhavy (1995). "Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **177**(4): 953-63.
- Stall, R. E., D. C. Loschke and J. B. Jones (1986). "Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Phytopathology* **76**: 240-243.
- Sukchawalit, R., P. Vattanaviboon, R. Sallabhan and S. Mongkolsuk (1999). "Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*." *FEMS Microbiol Lett* **181**(2): 217-23.
- Takaya, A., M. Suzuki, H. Matsui, T. Tomoyasu, H. Sashinami, A. Nakane and T. Yamamoto (2003). "Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice." *Infect Immun* **71**(2): 690-6.
- Takaya, A., T. Tomoyasu, A. Tokumitsu, M. Morioka and T. Yamamoto (2002). "The ATP-dependent lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1." *J Bacteriol* **184**(1): 224-32.
- Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai and C. Sasakawa (2000). "Supramolecular structure of the *Shigella* type III

- secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors." *Embo J* **19**(15): 3876-87.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos and M. Kokkinidis (2004). "Conserved features of type III secretion." *Cell Microbiol* **6**(9): 805-16.
- Thaminy, S., D. Auerbach, A. Arnoldo and I. Stagljar (2003). "Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system." *Genome Res* **13**(7): 1744-53.
- Thanassi, D. G., E. T. Saulino and S. J. Hultgren (1998). "The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway." *Curr Opin Microbiol* **1**(2): 223-31.
- Tomoyasu, T., T. Ohkishi, Y. Ukyo, A. Tokumitsu, A. Takaya, M. Suzuki, K. Sekiya, H. Matsui, K. Kutsukake and T. Yamamoto (2002). "The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium." *J Bacteriol* **184**(3): 645-53.
- Tusnady, G. E. and I. Simon (2001). "The HMMTOP transmembrane topology prediction server." *Bioinformatics* **17**(9): 849-50.
- Ujwal, M. L., H. Jung, E. Bibi, C. Manoil, C. Altenbach, W. L. Hubbell and H. R. Kaback (1995). "Membrane topology of helices VII and XI in the lactose permease of *Escherichia coli* studied by lacY-phoA fusion analysis and site-directed spectroscopy." *Biochemistry* **34**(45): 14909-17.
- Valdivia, R. H. and S. Falkow (1997). "Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells." *Science* **277**(5334): 2007-11.
- Valdivia, R. H. and S. Falkow (1998). "Flow cytometry and bacterial pathogenesis." *Curr Opin Microbiol* **1**(3): 359-63.
- Valdivia, R. H., A. E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan and S. Falkow (1996). "Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions." *Gene* **173**(1 Spec No): 47-52.
- Van Arnam, J. S., J. L. McMurry, M. Kihara and R. M. Macnab (2004). "Analysis of an engineered *Salmonella* flagellar fusion protein, FliR-FliH." *J Bacteriol* **186**(8): 2495-8.
- van Geest, M. and J. S. Lolkema (2000). "Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 13-33.
- Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello and 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." *Mol Microbiol* **15**(6): 1095-114.
- Van Gijsegem, F., J. Vasse, R. De Rycke, P. Castello and C. Boucher (2002). "Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly." *Mol Microbiol* **44**(4): 935-46.
- Viprey, V., A. Del Greco, W. Golinowski, W. J. Broughton and X. Perret (1998). "Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*." *Mol Microbiol* **28**(6): 1381-9.
- von Heijne, G. (1986). "The Distribution of Positively Charged Residues in Bacterial Inner Membrane-Proteins Correlates with the Trans-Membrane Topology." *Embo Journal* **5**(11): 3021-3027.

- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." *J Mol Biol* **225**(2): 487-94.
- von Heijne, G. and Y. Gavel (1988). "Topogenic signals in integral membrane proteins." *Eur J Biochem* **174**(4): 671-8.
- Voulhoux, R., G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu and A. Filloux (2001). "Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway." *Embo J* **20**(23): 6735-41.
- Wattiau, P., S. Woestyn and G. R. Cornelis (1996). "Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria." *Mol Microbiol* **20**(2): 255-62.
- Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, R. M., K. T.K., U. Bonas and R. Koebnik (2004). "The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants." *J Bacteriol* **submitted**.
- Wei, Z., J. F. Kim and S. V. Beer (2000). "Regulation of hrp genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS." *Mol Plant Microbe Interact* **13**(11): 1251-62.
- Welply, J. K., A. V. Fowler and I. Zabin (1981). "beta-Galactosidase alpha-complementation. Effect of single amino acid substitutions." *J Biol Chem* **256**(13): 6811-6.
- Wengelnik, K. and 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*." *J Bacteriol* **178**(12): 3462-9.
- Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel and U. Bonas (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**(4): 1061-9.
- Wengelnik, K., O. Rossier and U. Bonas (1999). "Mutations in the regulatory gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all hrp genes." *J Bacteriol* **181**(21): 6828-31.
- Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken and U. Bonas (1996). "HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators." *Mol Plant Microbe Interact* **9**(8): 704-12.
- Williams, A. W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S. I. Aizawa, I. Kawagishi and R. M. Macnab (1996). "Mutations in fliK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **178**(10): 2960-70.
- Williams, J. R., A. G. Morgan, D. A. Rouch, N. L. Brown and B. T. Lee (1993). "Copper-resistant enteric bacteria from United Kingdom and Australian piggeries." *Appl Environ Microbiol* **59**(8): 2531-7.
- Wittke, S., N. Lewke, S. Muller and N. Johnsson (1999). "Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo." *Mol Biol Cell* **10**(8): 2519-30.
- Yamane, K., Y. Akiyama, K. Ito and S. Mizushima (1990). "A positively charged region is a determinant of the orientation of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **265**(34): 21166-71.
- Young, B. M. and G. M. Young (2002). "YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **184**(5): 1324-34.
- Young, G. M., D. H. Schmiel and V. L. Miller (1999). "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6456-61.

---

Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo and R. M. Macnab (2002). "Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella." Biochemistry **41**(30): 9516-24.

## Anhang

### Anhang 1: Medien

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich jeweils immer auf ein Volumen von 1 Liter.

LB-Medium	10 g	Bacto Trypton
	5g	Hefeextrakt
	5g	NaCl
NYG-Medium	10 g	Bakto Pepton
	3 g	Hefe Extrakt
	20 ml	Glycerin
	pH 7,2	
MA-Medium	60 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	33 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7,6 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1,7 mM	Natriumcitrat
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	10 mM	Sacharose
	0,3 % (w/v)	Casaminosäuren
SOC-Medium	2 %	Trypton
	0,5 %	Hefe Extrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,2 %	Glukose
Medium zur Blau-Weiß- Selektion		LB-Medium
	8 µg/ml	IPTG
	40 µg/ml	X-Gal
MacConkey-Medium (bakterielles Dihybridsystem)	50 g/l	Difco
Duale Indikatorplatten (Topoloiestudien)		LB-Medium
	80 µg/ml	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (X-phos; Roth, Karlsruhe)
	100 µg/ml	6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid (Rose-Gal, Applichem)
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,
	80 mM	pH 7,0
Chelex 100	5g/100ml	Bio-Rad, München

## Anhang 2

## Puffer für molekularbiologische Arbeiten

10 x PCR-Puffer	0,5 M	KCl
	0,1 M	Tris (pH 8,3)
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	TritonX-100
	0,1 % (w/v)	Gelatine
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	200 mM	Tris, pH 8,8
	100 mM	KCl
	100 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	TritonX-100
	1 mg/ml	BSA
6 x DNS-Ladepuffer für Agarosegele	15 %	Ficoll 400 Farbstoff: Orange G
1 x TAE-Puffer	40 mM	Tris-Acetat pH 8,0
	1 mM	EDTA

## Puffer für GUS-Aktivitätsbestimmung

1 x MUG-Puffer	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	EDTA
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 g/l	BSA
MUG-Substrat	10 mM	4-Methylumbelliferyl-β-glucuronid in MUG-Puffer
Stop-Puffer (GUS)	0,2 M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
4-MUG-Standard	10 mM	4-Methylumbelliferyl-β-glucuronid in Stop-Puffer

## Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot

2 x Laemmli-Puffer	0,125 M	Tris-HCl pH 6,8
	4 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Glycerin
	10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
1 x Transferpuffer- Puffer für Western Blot	10 mM	3-Cyclohexylamino-1-propane sulfonic Acid (CAPS), pH 11
	10 %	Methanol
1 x TBST	10 mM	Tris-HCl pH 8.0
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Coomassie - Färbelösung	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
ECL-Detektionreagenz	100 mM	Tris-HCl pH 8,5
	225 nM	p-Kumarinsäure
	1,25 mM	3-Aminophtalhydrazid
	0,3 % (v/v)	Wasserstoffperoxid

**Puffer für die Reinigung des Fusionsproteins HrpD5-His<sub>6</sub>**

Lysispuffer	8 M	Harnstoff
	1 M	NaCl
	0,1 %	Triton X-100
	10 mM	Imidazol
	in 100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0
Äquilibrationpuffer	8 M	Harnstoff
	1 M	NaCl
	0,1 %	Triton X-100
	1 mM	Imidazol
	in 50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0
Elutionspuffer	8 M	Harnstoff
	0,5 M	NaCl
	0,1 %	Triton X-100
	in 50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0
	0-250 mM	Imidazol

## Anhang 3: Oligonukleotide

Gen/Genfragment	Primersequenz	Schnittstellen/Eigenschaften
M13 forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	
<b>Oligonukleotide für CuSO<sub>4</sub>-Promotor-Studien</b>		
copper-promoter (VspI)-5'	GCT <u>ATT AAT</u> GCT GCA TCG CCT GCT CCG CCT GC	<u>VspI</u>
copper-promoter (KpnI)-3'	CGG <u>GGT ACC CAT ATG</u> ATC TCC TGC GCG CTC CAT CG	<u>KpnI</u> , <u>NdeI</u>
GUS (aus pIC1)-5'	CGG <u>GGT ACC GTC CGT</u> CCT GTA GAA ACC CCA ACC CG	<u>KpnI</u>
GUS (aus pIC1)-3'	CCG <u>CTC GAG</u> TCA TTG TTT GCC TCC CTG CTG CGG	<u>XhoI</u>
pBBAD22K-hrpB6-5'	CTA <u>GTC TAG AGC</u> TGG CTG AGA CGC CCC TGC TGG AG	<u>XbaI</u>
pBBAD22K-hrpB6-3'	TCG <u>AAA GCT TTC</u> ACG CAT CGT CGG TCA CGC TGG TCA GC	<u>HindIII</u>
<b>Oligonukleotide zur Deletion des lon-Gens</b>		
lon-delta-right -5'	CCA <u>GTC GAC GCG</u> TGC TCG ATC TGG CGT TGG AAC	<u>SalI</u> , <u>MluI</u>
lon-delta-right -3'	GCT CCA <u>TCT AGA</u> GGA CCC ACA TCC ATC AAC CG	<u>XbaI</u>
lon-delta-left -5'	GCT CCA <u>GGA TCC</u> GAA GCT GTT GCA GAA GTG CG	<u>BamHI</u>
lon-delta-left -3'	GCA TAC GCG <u>TGC ACG</u> CGG GAT CAC CAT GTG CGG	<u>MluI</u> , <u>SalI</u>
Lon-5'-500	AGCCCAAGAACGCCATCACC	Kontrolle
Lon-3'-1500	GTC GCC CTT CTT CAG TGC CT	Kontrolle
<b>Oligonukleotide für das Bakterielle Dihybridsystem</b>		
hrcJ-B2H-5' (hrpB3-B2H-5'-XhoI)	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGC <u>TCG AGA</u> GTC AGC AGC TGT ACT CCG GG	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>XhoI</u> ; für pMS604
hrcJ-B2H -3' (hrpB3-B2H-3' -BamHI)	GCA <u>TGG ATC CGT</u> CGACTT ACC CGG CTT TGC CTT TCT TCA AC	<u>BamHI</u> , <u>SalI</u> ; für pMS604
hrcJ-B2H -5' (hrpB3-B2H-5' -Sal)	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGG <u>TCG ACA</u> GTC AGC AGC TGT ACT CCG GG	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u> ; für pDP804
hrcJ-B2H -5' (hrpB3-B2H-3' -BgIII)	GCA <u>TAG ATC TTA</u> CCC GGC TTT GCC TTT CTT CAA CTC	<u>BgIII</u> ; für pDP804
hrcL-B2H -5' (hrpB5-B2H-5' OK)	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGG <u>TCG ACC</u> GTC TGT GGT TGA GGT CAA CG	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u>
hrcL-B2H -3' (hrpB5-B2H-3' OK)	GCA <u>TAG ATC TCG</u> AGT TAG CCA GCA TCC GCC GGC TCC	<u>BgIII</u> , <u>XhoI</u>
hrcN-B2H -5' (hrpB6-B2H-5')	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGG <u>TCG ACA</u> TGG CTG AGA CGC CCC TGC TG	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u>
hrcN-B2H -5' (hrpB6-B2H-3')	GCA <u>TAG ATC TCG</u> AGTAC GCA TCG TCG GTC ACG CTG G	<u>BgIII</u> , <u>XhoI</u>
hrcT-B2H -5' (hrpB8-B2H-5')	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGG <u>TCG ACA</u> ACG ACG CCA CCG AAG CCT TG	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u>
hrcT-B2H -3' (hrpB8-B2H-3')	GCA <u>TAG ATC TCG</u> AGT TAG TGC GTC GCG CCT CCC TTG C	<u>BgIII</u> , <u>XhoI</u>
hrcU-B2H -5' (hrpC1-B2H-5')	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u> AGG <u>TCG ACT</u> CGG AAG AAA AAA CCG AGA AGC C	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u>
hrcU-B2H-Δ1-205-5'	CTA GAG CGG CCG <u>CTC CGG</u>	<u>NotI</u> , <u>BspEI</u> , <u>SalI</u>



(hrpC1-B2H-5' #2)	AGG TCG ACG TGC AGC GCT GGC	
hrcU-B2H-Δ1-264-5' (hrpC1-B2H-5' #3)	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACC CGA CCC ATT ACG CAG TGG CG	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcU-B2H -3' (hrpC1-B2H-3')	GCA TAG ATC TCG AGT TAG CAT GGC AGG GCT CCA TCG C	<i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
hrcV-B2H -5' (hrpC2-B2H-5')	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACC TAG GAG ACC GCG TGC GAG C	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcV-B2H-Δ1-326-5' (hrpC2-B2H-5' #2)	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACC AAC GCG ACA TCA GCG GCA CC	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcV-B2H -3' (hrpC2-B2H-3')	GCA TAG ATC TCG AGT TAC ACC ACC ACT CTA CCG ATC GG	<i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
hrcQ-B2H -5' (hrpD1-B2H-5')	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACG AGT TGC GGA TTG CCG CGC G	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcQ-B2H -3' (hrpD1-B2H-3')	GCA TAG ATC TCG AGT TAG GCA TCT GCA TGC GTG CTC TC	<i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
hrcR-B2H -5' hrpD2-B2H-5'	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACC AGA TGC CTG ACG TCG GCT CG	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcV-B2H-Δ73-155-5' (hrpD2-B2H-5' #2)	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACG CGT TCA AGG CCG CAC AGA AC	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcR-B2H -3' (hrpD2-B2H-3')	GCA TGG ATC CTC GAG TTA CCG ATA GCT CAG AAC CAG GCC	<i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>
hrcR-B2H-Δ73-155-3' (hrpD2-B2H-3' #2)	GCA TGG ATC CTC GAG TTA GAT ACG GAA GGC TTC GGT CAA TTC	<i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>
hrcS-B2H -5' (hrpD3-B2H-5')	CTA GAG CCG CCG CTC CGG AGG TCG ACG ACC ATG ACG ATC TAG TGC GAT TC	<i>NotI</i> , <i>BspEI</i> , <i>Sall</i>
hrcS-B2H -3' hrpD3-B2H-3'	GCA TAG AT CTC GAG T TAT GGG AAC GCC GCC TGC ATC AAT G	<i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
hrpD5-B2H-5'	CTA GAG CCG CCG CAC CGG TGG TCG ACA CCA TGC AGC TTC GCG TAA TGA CA	<i>NotI</i> , <i>AgeI</i> ; <i>Sall</i>
hrpD5-B2H-3'	GCA TAG ATC TCG AGT TAT TGC GCC GT TGC TGC GGC AG	<i>BglII</i> , <i>XhoI</i>

#### Oligonukleotide für die Modifikation der *lexA*-Vektoren pMS604 und pDP804

B2H- <i>lexA</i> reverse	GCA TAC TAG TGG CCA TGG CGG CCG CTT TCA TTC CGC CCC GTG G	<i>SpeI</i> , <i>NotI</i>
B2H- <i>lexA</i> -forward	GCA TAC TAG TTT AAT TAA AGC GTT AAC GGC CAG GCA ACA AG	<i>SpeI</i>
B2H- <i>lexA</i> -up	CTT CCG GCT CGT ATA ATG TGT GC	Sequenzierung
B2H- <i>lexA</i> -down/pDP	GAA CTG CCG GAT GCC TTG TCG	Sequenzierung
B2H- <i>lexA</i> -down/pMS	GCC GGG AAG CTA GAG TAA GTA G	Sequenzierung
pMS- <i>AgeI</i> -Stopp	CCG GCT TAA TAA GGA TCC TGC AG	<i>BamHI</i> , <i>PstI</i> ; Einführung eines Stopp-Codons (kursiv)
pMS- <i>XhoI</i> -Stopp	TCG ACT GCA GGA TCC TTA TTA AG	<i>BamHI</i> , <i>PstI</i> ; Einführung eines Stopp-Codons (kursiv)
pDP- <i>XhoI</i> -Stopp	TCG ACT AAT AAC TGC AGG AAT TC	<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> ; Einführung eines Stopp-Codons (kursiv)
pDP- <i>BglII</i> -Stopp	GAT CGA ATT CCT GCA GTT ATT AG	<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> ; Einführung eines Stopp-Codons (kursiv)

<i>hrpB5</i> -B2H-5' #4	GCA ATT <u>CCA TGG</u> CGC GTC TGT GGT TGA GGT CAA CG	<u>NcoI</u>
<i>hrpB5</i> -B2H-fuse-3' #2	GCA <u>TAC TAG TGC</u> CAG CAT CCG CCG GCT CCT GGG GTG C	<u>SpeI</u>
<i>hrpB6</i> -B2H-fuse-3' #2	GCA <u>TAC TAG TCG</u> CAT CGT CGG TCA CGC TGG TCA GC	<u>SpeI</u>
<i>hrpB8</i> -B2H-fuse-3'	GCA <u>TAC TAG TGT</u> GCG TCG CGC CTC CCT TGC C	<u>SpeI</u>
<i>hrpC1</i> -B2H-fuse-3'	GCA <u>TAC TAG TGC</u> ATG GCA GGG CTC AT CGC C	<u>SpeI</u>
<i>hrpC2</i> -B2H-fuse-3'	GCA <u>TAC TAG TCA</u> CCA CCA CTC TAC CGA TCG GC	<u>SpeI</u>
<i>hrpD1</i> -B2H-fuse-3' #2	GCA <u>TAC TAG TGG</u> CT CTG CAT GCG TGC TCT CCG ACA TGC	<u>SpeI</u>
<i>hrpD2</i> -B2H-fuse-3'	GCA <u>TAC TAG TCC</u> GAT AGC TCA GAA CCA GGC CG	<u>SpeI</u>
<i>hrpD3</i> -B2H-fuse-3'	GCA <u>TAC TAG TTG</u> GGA ACG CCG CCT GCA TCA ATG	<u>SpeI</u>

### Oligonukleotide für die Topologiestudien

Seq-Tn <i>phoA</i> 1	CGC CGG GTG CAG TAA TAT CG	Sequenzierung,
pBBAD-5'	GCA GCA GGG GAT CAT TTT GC	Sequenzierung, (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBBAD-3'	CTC ATC CGC CAA AAC AG	Sequenzierung, (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD-5'	CTGTTTCTC CAT ACC CGTT	Sequenzierung
pBAD-3'	GGC TGA AAA TCT TCT CT	Sequenzierung (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
Topology(pBAD24)-B8-5'	CCG <u>GGA ATT CAC</u> CAT GAA CGA CGC CAC CGA AGC CTT GC	<u>EcoRI</u>
Topology(pBAD24)-B8-3'	CCC <u>AAG CTT</u> AGT GCG TCG CGC CTC CCT TGC CAG ACA G	<u>HindIII</u>
Topo- <i>hrpB8</i> -NheI-5'	CTA <u>GCT AGC</u> AGG AGG AAT TCA CCA TGA ACG ACG CCCA CCG AAG CCT TGC	<u>NheI</u> , für pDT
Topo- <i>hrpB8</i> -337-3'	<u>GCT CTA GAC</u> TGC ACA TTG TTGTAA CCG GC	<u>XbaI</u> , für pDT
Topo- <i>hrpB8</i> -649-3'	<u>GCT CTA GAC</u> GAC GGT TCG AGT TTA TCG GC	<u>XbaI</u> , für pDT
Topo- <i>hrpB8</i> -664-3'	<u>GCT CTA GAG</u> ATT GGC TGA CTC AAG TTC GAC G	<u>XbaI</u> , für pDT
Topology(pBAD24)-C1-5'	CTA <u>GCT AGC</u> AGG AGG AAT TCA CCA TGT CGG AAG AAA AAA CCG AGA AGC CG	<u>NheI</u>
Topology(pBAD24)-C1-3'	CCC <u>AAG CTT</u> AGC ATG GCA GGG CTC CAT CGC CGT CGC CGT GGT C	<u>HindIII</u>
Topology C1-S134-3'	<u>GCT CTA GAC</u> GAA AAG AGT TTC TTG ACC CCG GTT GC	<u>XbaI</u> , für pDT
Topology(pBAD24)- C2(2.Start)-5'	CCG <u>GGA ATT CAC</u> CAT GCG AGC GAC AAG GTA TTT CGC	<u>EcoRI</u>
Topology(pBAD24)-C2-3'	CCC <u>AAG CTT</u> ACA CCA CCA CTC TAC CGA TCG GCT GCA GCT G	<u>HindIII</u>
Topology(pBAD24)-D2-5'	CCG <u>GGA ATT CAC</u> CAT GCA GAT GCC TGA CGT CGG CTC G	<u>EcoRI</u>
Topology(pBAD24)-D2-3'	CCC <u>AAG CTT</u> ACC GAT AGC TCA GAA CCA GGC CGT G	<u>HindIII</u>
Topology(pBAD24)-D3-5'	CCG <u>GGA ATT CAC</u> CAT <u>GGA</u> CCA TGA CGA TCT AGT GCG	<u>EcoRI</u> , <u>NcoI</u>
Topology(pBAD24)-D3-3'	CCC <u>AAG CTT</u> ATG GGA ACG	<u>HindIII</u>

	CCG CCT GCA TCA ATG C	
Topology hrpD3-P86-3'	GCT CTA GAT GGG AAC GCC GCC TGC ATC AAT GC	<u>XbaI</u> ; für pDT
Topology D3-NheI-5'	CTA GCT AGC AGG AGG AAT TCA CCA TGG ACC ATG ACG ATC TAG TGC G	<u>NheI</u>
Topology(pBAD24)-D5-5'	CCG GGA ATT CAC CAT GAC CAT GCA GCT TCG CGT AAT GAC	<u>EcoRI</u>
Topology(pBAD24)-D5-3'	CCC AAG CTT ATT GCG CCG CTT GCT GCG GCA GGG ATG TC	<u>HindIII</u>
Topology hrpD5-C80-3'	GCT CTA GAG CAT AGC ACC AGC GGG CCG AAG CG	<u>XbaI</u> ; für pDT
D5-NheI-5'	CTA GCT AGC AGG AGG AAT TCA CCA TGA CCA TGC AGC TTC GCG TAA TG	<u>NheI</u> ; für pDT
<b>Oligonukleotide zur Herstellung einer HrpD5-Expressionsplasmids</b>		
hrpD5-SD-5'	ATT CCT CGA GGA GGT TCG CCC ATG ACC ATG CAG CTT CGC GTA ATG	<u>XhoI</u>
hrpD5-HIS-3'	GAA TAA GCT TAG TGA TGA TGG TGG TGA TGG CTA GCT TGC GCC GCT TGC TGC GGC AGG GAT GTC	<u>HindIII</u> , His <sub>6</sub> -tag
hrpD5-186-3'	TTG CAC CGT GTC GCT G	für 5'-RACE
hrpD5-256-3'	CAG CAG CAT CGC CAA CGC ATA GCA C	für 5'-RACE

## Anhang 4: Primerkombinationen des bakteriellen Dihybridsystems

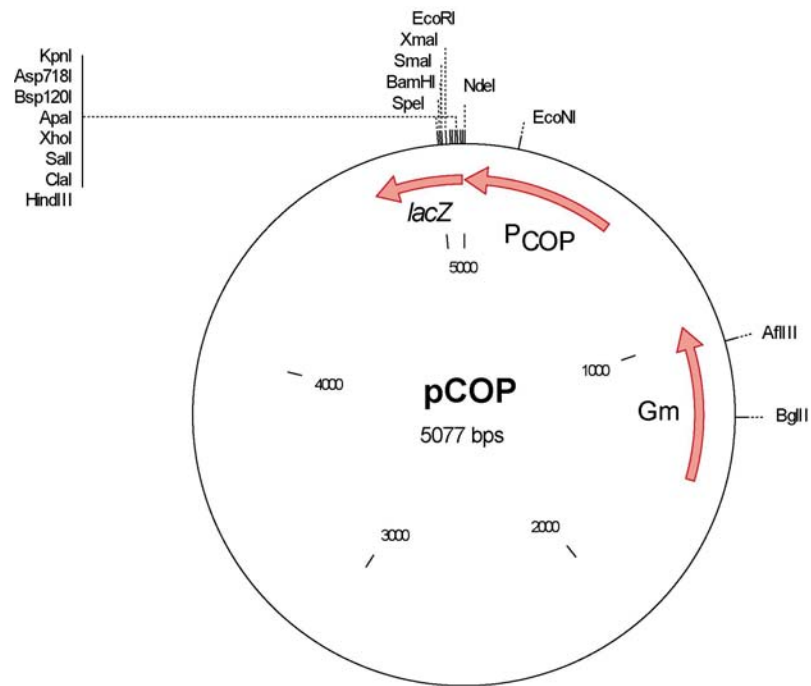
## Vektor pMS604

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Verdau	Vektor (Vektorverdau)
<i>hrpB3 (hrcJ)</i>	hrpB3-B2H-5' - <i>XhoI</i>	hrpB3-B2H-3' - <i>BamHI</i>		
<i>hrpB5 (hrcL)</i>	hrpB5-B2H-5' OK	hrpB5-B2H-3' OK	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpB6 (hrcN)</i>	hrpB6-B2H-5'	hrpB6-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpB8 (hrcT)</i>	hrpB8-B2H-5'	hrpB8-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpC1 (hrcU)</i>	hrpC1-B2H-5'	hrpC1-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpC1#2 (hrcUΔ1-2)</i>	hrpC1-B2H-5'#2	hrpC1-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpC1#3 (hrcUΔ1-264)</i>	hrpC1-B2H-5'#3	hrpC1-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpC2 (hrcV)</i>	hrpC2-B2H-5'	hrpC2-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpC2#2 (hrcVΔ1-326)</i>	hrpC2-B2H-5'#2	hrpC2-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpD1 (hrcQ)</i>	hrpD1-B2H-5'	hrpD1-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpD2 (hrcR)</i>	hrpD2-B2H-5'	hrpD2-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpD2 (hrcR<sub>73-155</sub>)</i>	hrpD2-B2H-5'#2	hrpD2-B2H-3'#2	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpD3 (hrcS)</i>	hrpD3-B2H-5'	hrpD3-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )
<i>hrpD5</i>	hrpD5-B2H-5'	hrpD5-B2H-3'	<i>BspEI-XhoI</i>	pMS604 ( <i>AgeI-XhoI</i> )

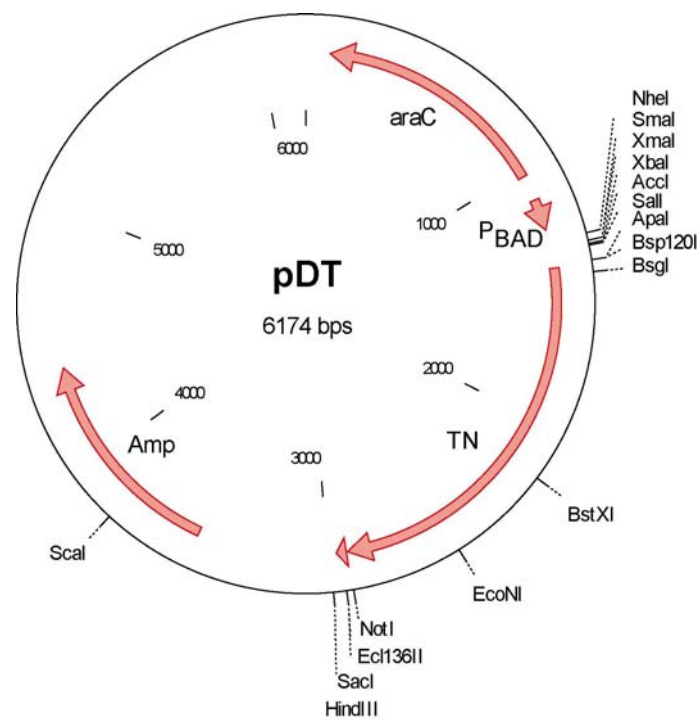
## Vektor pDP804

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Verdau	Vektor (Vektorverdau)
<i>hrpB3 (hrcJ)</i>	hrpB3-B2H-5' - <i>SallI</i>	hrpB3-B2H-3' - <i>BglII</i>	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpB5 (hrcL)</i>	hrpB5-B2H-5'	hrpB5-B2H-3'	<i>XhoI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpB6 (hrcN)</i>	hrpB6-B2H-5'	hrpB6-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpB8 (hrcT)</i>	hrpB8-B2H-5'	hrpB8-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpC1 (hrcU)</i>	hrpC1-B2H-5'	hrpC1-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpC1#2 (hrcUΔ1-205)</i>	hrpC1-B2H-5' #2	hrpC1-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpC1#3 (hrcUΔ1-264)</i>	hrpC1-B2H-5' #3	hrpC1-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpC2 (hrcV)</i>	hrpC2-B2H-5'	hrpC2-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpC2 (hrcVΔ1-326)</i>	hrpC2-B2H-5' #2	hrpC2-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpD1 (hrcQ)</i>	(hrpD1-B2H-5')	hrpD1-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpD2 (hrcR)</i>	hrpD2-B2H-5'	hrpD2-B2H-3'	<i>SallI-BamHI</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpD2 (hrcR<sub>73-155</sub>)</i>	hrpD2-B2H-5'#2	hrpD2-B2H-3'#2	<i>SallI-BamHI</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpD3 (hrcS)</i>	hrpD3-B2H-5'	hrpD3-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )
<i>hrpD5</i>	hrpD5-B2H-5'	hrpD5-B2H-3'	<i>SallI-BglII</i>	pDP804 ( <i>XhoI-BglII</i> )

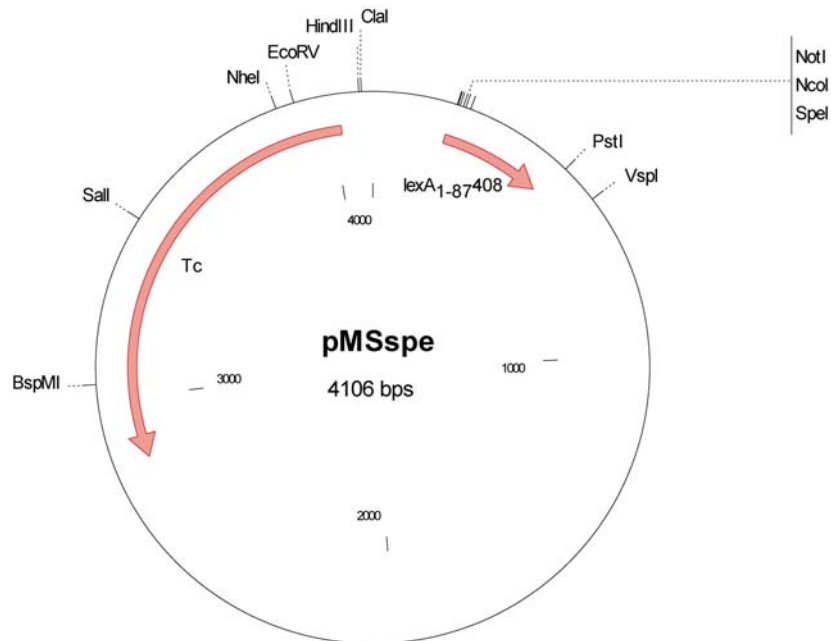
### Anhang 5: Plasmidkarte des Kupfer-induzierbaren Expressionsplasmids pCOP



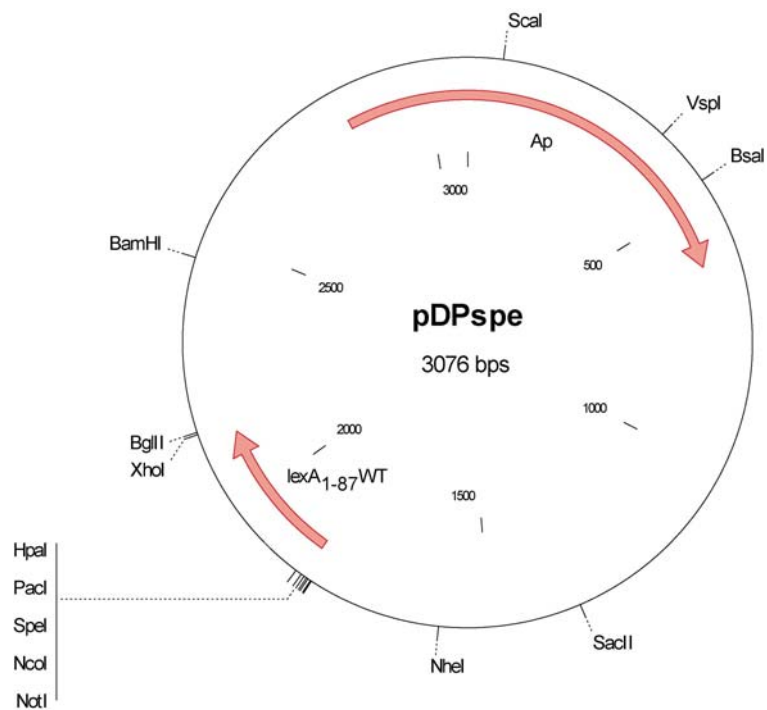
### Anhang 6: Plasmidkarte des Topologiereporterplasmids pDT



### Anhang 7: Plasmidkarte des modifizierten bakteriellen Dihybridvektors pMS604: pMSspe



### Anhang 8: Plasmidkarte des modifizierten bakteriellen Dihybridvektors pDP804: pDPspe



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Carolin Berger  
Anschrift Universitätsring 6a  
06108 Halle  
Geburtstag 15.10.1973  
Geburtsort Gütersloh  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

## Ausbildung

1980-1984 Grundschule Südkirchen  
1984-1993 Gymnasium St. Christophorus, Werne (NRW)  
Abschluss: Abitur  
1993-1995 Ausbildung zur Gärtnerin - Fachsparte Zierpflanzenbau

## Studium

1995-2000 Studium der Agrarwissenschaften – Fachrichtung Gartenbau  
an der Universität Hannover;  
Diplomarbeit im Fachbereich Phytomedizin  
(Pflanzenvirologie)  
Abschluss als *Dipl.-Ing. agr.*  
11/2000-3/2001 Mitarbeit an der „*Ecology and Entomology Group*“ an der  
*Lincoln University, Christchurch, New Zealand*

## Promotion

2001-2004 Promotionsarbeit am Institut für Genetik, Abteilung  
Pflanzengenetik, Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg;  
Thema: „Molekulare Charakterisierung des Typ III-  
Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv.  
*vesicatoria*“

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Koebnik für die Möglichkeit, an dieser interessanten Themenstellung zu arbeiten. Insbesondere bedanke ich mich für seine Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen und sein Interesse am Voranschreiten der Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Bonas möchte ich mich besonders für ihr reges Interesse an meiner Arbeit, ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die erhaltene Unterstützung und die freundliche und nette Arbeitsatmosphäre; bei Ernst und Ute bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Robert und Frank danke ich insbesondere für ihre Unterstützung bei den Computerarbeiten.

Bei Hannelore, Carola, Marina, Angelika und Bianca bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Bei Herrn Dr. Peter Rücknagel möchte ich mich für die Durchführung der N-terminalen Aminosäurebestimmung bedanken.

Bei Dr. Daniela Büttner, Ernst Weber und Tim Schlözer möchte ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit und die konstruktiven Ratschläge bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mich unterstützt hat.

Und nicht zuletzt danke ich Tim für die moralische Unterstützung, das Ertragen meiner Launen in der Endphase der Arbeit und seinen ständigen Zuspruch.



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

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

Halle, den 22.12.2004

Carolin Berger