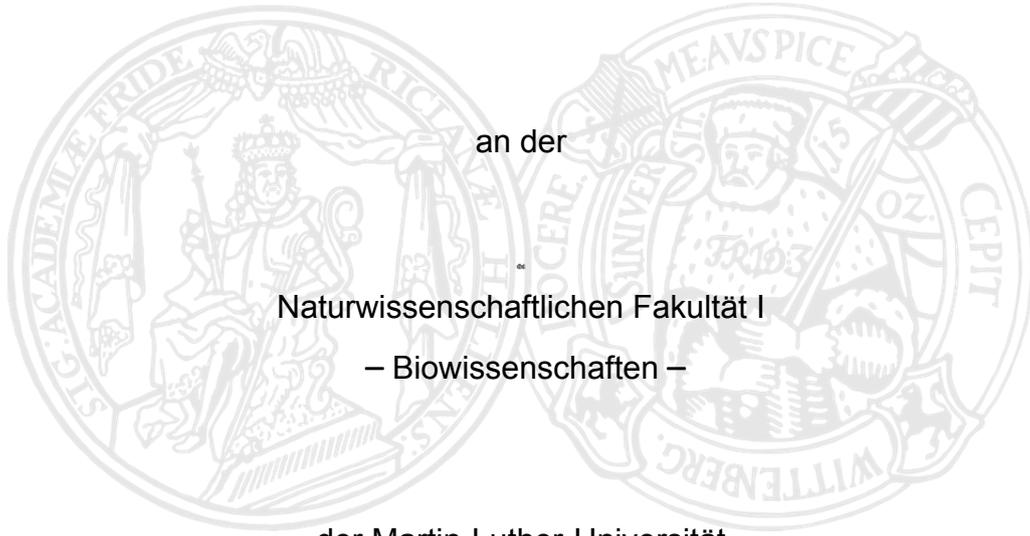

**Funktionelle Charakterisierung von strukturellen und
regulatorischen Komponenten des Typ 3-Sekretionssystems
von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

DISSERTATION

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



an der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sabine Drehkopf geb. Hänsch

geboren am 05.09.1987 in Köthen (Anhalt)

Die experimentellen Daten dieser Promotionsarbeit wurden in der Zeit von Januar 2013 bis Juni 2017 in der Arbeitsgruppe von apl. Prof. Dr. Daniela Büttner in der Abteilung Pflanzengenetik am Institut für Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden in einer Fachzeitschrift publiziert:

Drehkopf, S., Otten, C., Hausner, J., Seifert, T. and Büttner, D.

HrpB7 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is an essential component of the type III secretion system and shares features of HrpO/FliJ/YscO family members. *Cellular Microbiology*. 2020; 22:e13160. <https://doi.org/10.1111/cmi.13160>

Gutachter/-innen:

1. Apl. Prof. Dr. Daniela Büttner
2. Prof. Dr. Gary Sawers
3. Prof. Dr. Jens Boch

Verteidigt am: 28.05.2021

*„Alle Wahrheiten sind einfach zu verstehen, sobald sie entdeckt wurden;
die Schwierigkeit ist sie zu entdecken.“*

Galileo Galilei

Zusammenfassung

Pathogene Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* Spezies, sind verantwortlich für schwere Krankheiten beim Menschen bzw. in der Pflanze weltweit. Essentiell für die Pathogenität vieler Bakterien ist ein Sekretionssystem, das sogenannte Typ 3-Sekretionssystem (T3SS), welches Proteine ins extrazelluläre Milieu sekretiert und zahlreiche Effektoren in die Wirtszelle transloziert. Die Effektoren beeinflussen dort zelluläre Prozesse zum Vorteil für das Bakterium. In dieser Arbeit wurde das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate, als Modellorganismus verwendet um zwei essentielle Komponenten des T3SS, HrcS und HrpB7, sowie ein Kontrollprotein, HpaA, bezüglich ihrer Funktion in der Typ 3-Sekretion (T3S) zu analysieren.

Es wird vermutet, dass der Pathogenitätsfaktor HrcS im Exportapparat des T3SS lokalisiert ist. Diese Hypothese wurde unterstützt durch Ergebnisse aus *in vitro*-Interaktionsstudien mit strukturellen Komponenten des T3SS, welche sich in räumlicher Nähe zum Exportapparat befinden. Zudem zeigten Sekretionsanalysen und weitere Interaktionsstudien mit T3S-Substraten, dass HrcS vermutlich eine Substrat-Akzeptor-Bindungsstelle besitzt und die C-terminale periplasmatische Domäne von HrcS essentiell ist für die Proteinfunktion.

Für die T3S und Pathogenität in *Xcv* ist neben HrcS auch HrpB7 essentiell. Detaillierte Sequenzanalysen wiesen schließlich auf die Zugehörigkeit von HrpB7 zur HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie hin. Dieser Proteinfamilie werden kleine Proteine zugeordnet, welche, wie im Fall von HrpB7, im Genom von tier- und pflanzenpathogenen Bakterien stromabwärts der ATPase des T3SS kodiert vorliegen und α -helikale *coiled-coil* Strukturen ausbilden können. Die *coiled-coil* Struktur dient als Protein-Protein-Bindungsdomäne. In Übereinstimmung mit den *in silico*-Daten waren stabile HrpB7-Proteinkomplexe nachweisbar, sogar in Abwesenheit des T3SS. Die Ergebnisse der Interaktionsstudien deuteten auf Interaktionen mit strukturellen Komponenten des T3SS und des T3S-Chaperons hin. Zudem zeigten Sekretions- und Fraktionierungsanalysen, dass HrpB7 essentiell ist für die T3S und in der Zelle membranlokalisiert vorliegt. Ausgewählte Experimente wurden zusätzlich mit HrpB7-Derivaten durchgeführt. Der Austausch oder die Deletion einzelner Aminosäurereste in HrpB7 beeinflusste die T3S und/oder zeigte einen Effekt auf die Komplexbildung von HrpB7. Es war bereits im Vorfeld bekannt, dass auch HpaA, vermutlich als Kontrollprotein, essentiell die T3S beeinflusst und anschließend in die pflanzliche Wirtszelle T3-abhängig transloziert wird. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sekretions-, Translokations- und Interaktionsstudien deuteten auf essentielle Aminosäuresequenzmotive in HpaA hin, welche die HpaA-Translokation und -Sekretion wesentlich beeinflussen.

Summary

Bacterial pathogens, including species of *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Ralstonia*, and *Xanthomonas* cause serious human or plant diseases worldwide. All these pathogens use a common transport nano-machine, called type 3 secretion system (T3SS), which secretes proteins into the extracellular milieu and translocates numerous bacterial effectors into the host cells to establish the infection. In the host cell the effectors modulate key cellular processes to promote bacterial survival, replication and transmission. In this study, the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, which is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato, is used as a model organism to analyse two essential components of the T3SS, HrcS and HrpB7, and the control protein HpaA in terms of their function in type 3 secretion (T3S).

The pathogenicity factor HrcS is proposed to be a part of the export apparatus. This hypothesis was supported by results of interaction studies with structural components of the T3SS near the export apparatus. Additional secretion and interaction analyses revealed that HrcS presumably contains an acceptor site for T3S substrates and that the periplasmic domain of HrcS is essential for the protein function.

In addition to HrcS also HrpB7 is essential in the T3S process. *In situ* analysis showed that HrpB7 belongs to the HrpO/FliJ/YscO protein family, which are small α -helical coiled-coil proteins encoded downstream of the T3SS-ATPase genes from plant- and animal pathogenic bacteria. The coiled-coil structure is a special feature of proteins and acts as a protein binding domain. In accordance with the *in silico* data, HrpB7 formed stable protein complexes even in the absence of the T3SS. In interaction studies HrpB7 was a putative binding partner of structural components of the T3SS and T3S chaperones. Secretion and fractionation analyses showed that HrpB7 is essential for T3S and associates with the bacterial membrane. The analyses of HrpB7 deletion and point mutant derivatives led to the identification of amino acid residues in HrpB7 that control T3S and/or have an effect on HrpB7 complex formation.

It was previously shown, that HpaA is assumedly as control protein essential for T3S followed by its T3-dependent translocation into the plant cell. Based on secretion and translocation assays as well as interaction studies with HpaA deletion and point mutant derivatives, important sequence motifs were identified in HpaA, which had an influence on HpaA translocation and HrpF secretion.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Der Proteintransport über die Zytoplasmamembran in Prokaryoten.....	1
1.2. Das Typ 3 Sekretionssystem (T3SS)	3
1.2.1. Die Architektur des T3SS von tierpathogenen Bakterien.....	7
1.2.2. Die Logistik: Erkennung der T3S-Substrate und Transport zum T3SS.....	9
1.3. <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>) - ein Modellorganismus zur Analyse des T3SS	11
1.3.1. Das Phytopathogen <i>Xcv</i>	11
1.3.2. Der genetische Bausatz zum Aufbau des T3SS in <i>Xcv</i>	13
1.3.3. Die Hierarchie in der T3-abhängigen Sekretion am Beispiel von <i>Xcv</i>	15
1.4. Die Zielstellung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1. Medien, Antibiotika, Bakterienstämme	20
2.1.1. Medien	20
2.1.2. Puffer und Lösungen	20
2.1.3. Verwendete Antibiotika	21
2.1.4. Verwendete Antikörper	22
2.1.5. Verwendete Bakterienstämme	22
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1. DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.2.2. „Golden-Gate“-Klonierung	24
2.2.3. Herstellung kompetenter Zellen und chemische Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.2.4. Erstellung von Expressionskonstrukten	26
2.2.5. Plasmide und Oligonukleotide	27
2.2.6. Plasmid-Präparation	27
2.2.7. Triparentale Konjugation von <i>Xcv</i>	27
2.2.8. Elektroporation von <i>Xcv</i>	28
2.2.9. Deletionsmutagenese von <i>Xcv</i>	28
2.3. Biochemische Methoden	29
2.3.1. Herstellung von Proteinen in <i>E. coli</i>	29
2.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.3.3. Immunoblot Analyse (Western-Blot).....	30
2.3.4. Coomassie-Färbung	31
2.4. Protein-Analysen: Sekretions- und Interaktionsstudien	31
2.4.1. <i>In-vitro</i> Sekretionsanalysen	31
2.4.2. GST-pull down	31
2.4.3. Koimmunopräzipitation	32
2.4.4. Fraktionierungsanalysen	33
2.4.5. Proteinreinigung von His ₆ -NusA-HrpB7 aus <i>E. coli</i>	33
2.4.6. <i>MicroScale Thermophoresis</i> (MST).....	35

2.5. Infektionsversuche mit Xcv-Stämmen	35
2.5.1. Pflanzen und Anzuchtbedingungen.....	35
2.5.2. Infiltration von Bakterien in Paprikapflanzen	36
2.6. Bioinformatische Analysen	36
3. ERGEBNISSE	38
3.1. Die Funktionelle Charakterisierung des Strukturproteins HrcS.....	38
3.1.1. <i>In silico</i> -Analysen von HrcS: Sequenz-Alignment mit homologen Proteinen.....	38
3.1.2. <i>hrcS</i> ist essentiell für die Pathogenität und Typ 3-Sekretion von <i>Xcv</i>	40
3.1.3. HrcS ist in der Membran lokalisiert.....	44
3.1.4. Identifizierung möglicher HrcS-Interaktoren mittels GST-pull down Analysen <i>in vitro</i> und Koimmunopräzipitation <i>in vivo</i>	45
3.2. Funktionelle Charakterisierung und Lokalisierung von HrpB7.....	48
3.2.1. <i>In silico</i> -Analysen von HrpB7.....	48
3.2.2. <i>hrpB7</i> ist essentiell für die Pathogenität und T3S von <i>Xcv</i>	53
3.2.3. HrpB7 formt hochmolekulare Komplexe, die membranlokalisiert sind.....	56
3.2.4. Identifizierung essentieller Sequenz- und Struktur motive in HrpB7	57
3.2.5. Identifizierung möglicher HrpB7-Interaktoren mittels GST-pull down Analysen <i>in vitro</i>	62
3.2.6. Proteinreinigung und Quantifizierung der Dimerisierung von HrpB7	63
3.3. Funktionelle Analyse von HpaA und Charakterisierung essentieller Sequenzmotive.....	68
3.3.1. HpaA interagiert mit HpaC und wird HpaC-abhängig transloziert.....	69
3.3.2. Die zentrale Region in HpaA ist essentiell für die T3S und Pathogenität von <i>Xcv</i>	71
3.3.3. Die Analyse der zentralen Domäne mit Hilfe von XopA-HpaA-Chimären.....	74
3.3.4. Die zentrale Domäne von HpaA interagiert mit den Komponenten des zytoplasmatischen Komplexes und Exportapparates.....	76
3.3.5. Die NLS-Motive in HpaA beeinflussen die T3S und Pathogenität von <i>Xcv</i>	79
3.3.6. Die NLS-Sequenz in der N-terminalen Region von HpaA beeinflusst die Translokation von HpaA.....	81
4. DISKUSSION.....	84
4.1. HrcS (SctS) von Xcv: eine essentielle T3-Komponente am Eingang des Exportkanals... 84	84
4.1.1. HrcS ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor und interagiert mit T3-Komponenten des Exportapparates und des zytoplasmatischen Komplexes.....	84
4.1.2. Agiert HrcS als Akzeptor für Chaperone und T3-abhängig sekretierte Substrate?	87
4.1.3. Die periplasmatische Domäne von HrcS ist essentiell für die Pathogenität von <i>Xcv</i> und T3S	89
4.2. HrpB7 ist ein Mitglied der Proteinfamilie HrpO/FliJ/YscO.....	91
4.2.1. HrpB7 formt hochmolekulare Komplexe durch die Bildung von intra- und intermolekularen <i>coiled-coil</i> Strukturen	91
4.2.2. HrpB7 besitzt Gemeinsamkeiten zu Vertretern der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie	92
4.2.3. HrpB7 ist Bestandteil des zytoplasmatischen Komplexes im T3SS.....	94
4.2.4. Die Komplexbildung und das Glutamat-reiche Motiv in HrpB7 fördern die T3S und die Pathogenität von <i>Xcv</i>	96
4.3. HpaA interagiert mit zahlreichen Komponenten des T3SS und ist vermutlich essentiell für den Substratspezifitätswechsel.....	98
4.3.1. Die Kontrolle der HpaA-Sekretion und –Translokation.....	98
4.3.2. Die zentrale Proteinregion in HpaA ist essentiell für die Pathogenität von <i>Xcv</i> und HrpF-Sekretion.....	102
4.3.3. Modellvorstellungen der Funktion der <i>gatekeeper</i> -Proteine	104
LITERATURVERZEICHNIS	109

5. ANHANG.....	128
LEBENS LAUF.....	133
DANKSAGUNG	134
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	135

Abkürzungsverzeichnis

3 x c-Myc	dreifaches c-Myc-Epitop	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung		
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	„polymerase chain reaction“
ÄM	äußere Membran	pv.	Pathovar
BSA	Bovines Serumalbumin	RNA	Ribonukleinsäure
bzw.	beziehungsweise	Sct	“secretion and cellular translocation”
C	Carboxy		
C-Ring	zytoplasmatischer Ring	SDS	„Sodiumdodecylsulfat“
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTPs	Desoxyribo- nukleosidtriphosphate	Sec	„secretory pathway“
		spp.	„species“, Arten
ECW	„Early Californian Wonder“	T3	Typ 3
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	T3S	Typ 3-Sekretion
		T3SS	Typ 3-Sekretionssystem
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	T3S4	„T3S substrate specificity switch“
et al.	et altera (und andere)	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GE	Gesamtzellextrakt	TALE	„Transcription activator-like effector“
Hpa	„hrp-associated“	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
HR	hypersensitive Reaktion	TBE	„Tris-buffered EDTA“
Hrp	„hypersensitive response and pathogenicity“	TBST	„Tris-buffered saline“
Hrc	„hrp-conserved“	u. a.	unter anderem
IM	innere Membran	ÜS	Überstand
Kb	Kilobasenpaare	Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
KBE	koloniebildende Einheiten		
kDa	Kilodalton	Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
NYG	„Nitrogen Yeast Glycerol“		
MA	Minimalmedium	Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
mRNA	„messenger“ RNA		
MST	Mikroskalige Thermophorese	Xop	„Xanthomonas outer protein“
N	Amino		
n. a.	nicht analysiert	Yop	„Yersinia outer protein“
NLS	„nuclear localisation signal“	Ysc	„Yersinia secretion complex“
NTP	Nukleotidtriphosphat		

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Aspartat	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleusin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	X	beliebige Aminosäure	
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin			

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vergleich des T3SS aus tierpathogenen Bakterien mit dem Aufbau des Flagellums.	4
Abb. 2: Das <i>hrp</i> -Gencluster von <i>Xcv</i>	14
Abb. 3: Der Substratspezifitätswechsel in <i>Xcv</i>	16
Abb. 4: Der Einfluss der Kontrollproteine <i>HpaC</i> und <i>HpaA</i> und des T3S-Chaperon <i>HpaB</i> auf den Substratspezifitätswechsel.	17
Abb. 5: Das Prinzip der Golden-Gate-Klonierung.	24
Abb. 6: <i>HrcS</i> -Sequenz-Alignment und Topologie.	39
Abb. 7: Phänotypenvergleich der Transformanden bei Verwendung unterschiedlicher Promotoren im Komplementationskonstrukt.	41
Abb. 8: Die Konstrukte für die Komplementationsanalysen mit der <i>hrcS</i> -Deletionsmutante.	41
Abb. 9: Komplementationsstudien mit der <i>hrcS</i> -Deletionsmutante 85-10 Δ <i>hrcS</i>	43
Abb. 10: <i>HrcS</i> ist essentiell für die T3S in <i>Xcv</i>	44
Abb. 11: <i>HrcS</i> ist in der Membran lokalisiert.	45
Abb. 12: <i>HrcS</i> interagiert mit verschiedenen Komponenten des T3SS.	46
Abb. 13: Koimmunopräzipitationsexperimente mit <i>HrcS</i> -c-Myc und <i>HrpB1</i>	47
Abb. 14: Sequenz-Alignments von <i>HrpB7</i> Proteinen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien. ...	51
Abb. 15: Vorhersage der Sekundär- und 3D-Struktur von <i>HrpB7</i> aus <i>Xcv</i>	52
Abb. 16: Komplementationsstudien mit den <i>hrpB7</i> -Deletionsmutanten.	54
Abb. 17: <i>HrpB7</i> ist essentiell für die T3S in <i>Xcv</i>	55
Abb. 18: <i>HrpB7</i> formt stabile und hochmolekulare Komplexe.	56
Abb. 19: Sequenz- und Struktur motive von <i>HrpB7</i> aus <i>Xcv</i>	58
Abb. 20: Komplementationsstudien mit den <i>HrpB7</i> -Derivaten mit Cystein-Alaninsubstitutionen.	59
Abb. 21: Komplementationsstudien mit <i>HrpB7</i> -Derivate.	60
Abb. 22: Der Einfluss der <i>HrpB7</i> -Derivate auf die Typ 3-Sekretion.	62
Abb. 23: <i>HrpB7</i> interagiert mit Kontrollproteinen und Komponenten des T3SS.	63
Abb. 24: Prinzip und Ablauf der MST-Messungen.	64
Abb. 25: Proteinreinigung von His ₆ -NusA- <i>HrpB7</i> und His ₆ -NusA.	66
Abb. 26: Die Selbstinteraktion von His ₆ -NusA- <i>HrpB7</i> gemessen mittels MST.	67
Abb. 27: Einteilung von <i>HpaA</i> in drei funktionelle Domänen.	68
Abb. 28: Die zentrale Domäne von <i>HpaA</i> enthält eine <i>HpaC</i> -Bindungsstelle.	69
Abb. 29: <i>HpaA</i> wird <i>HpaC</i> -abhängig transloziert.	70
Abb. 30: Komplementationsstudien mit den <i>HpaA</i> -Deletionsderivaten.	71
Abb. 31: Die zentrale und C-terminale Region von <i>HpaA</i> sind essentiell für die <i>HrpF</i> -Sekretion.	73
Abb. 32: <i>HpaA</i> _{ΔM} interagiert mit dem Chaperon <i>HpaB</i>	74
Abb. 33: Das <i>XopA</i> - <i>HpaA</i> -Chimär komplementiert nicht die <i>hpaA</i> -Deletionsmutante.	75
Abb. 34: <i>In vitro</i> -Sekretionsanalysen und <i>in vivo</i> -Translokationsanalysen mit <i>XopA</i> - <i>HpaA</i> -Chimäre.	76
Abb. 35: <i>HpaA</i> interagiert mit den Substratbindungsstellen des T3SS.	78
Abb. 36: Komplementationsstudien mit den <i>HpaA</i> -NLS-Mutanten.	80
Abb. 37: Das NLS2-Sequenzmotiv in <i>HpaA</i> ist essentiell für die <i>HrpF</i> -Sekretion.	80
Abb. 38: GST-pull down Analysen der <i>HpaA</i> -Derivate mit GST- <i>HpaB</i>	81
Abb. 39: Die Translokationsanalysen mit <i>HpaA</i> -Derivaten in 85* und 85* Δ <i>hpaB</i>	83
Abb. 40: Modell des SctR ₅ S ₄ T ₁ U ₁ -Komplexes im T3SS.	85
Abb. 41: Modell zur Assemblierung der T3SS.	86
Abb. 42: Modellvorstellung für die Substraterkennung und -weiterleitung am T3SS.	87
Abb. 43: Vergleich der F ₀ F ₁ -ATP-Synthase mit dem Modell des <i>HrpB7</i> - <i>HrcN</i> -Komplexes.	94
Abb. 44: <i>HpaA</i> trägt das Strukturmerkmal der gatekeeper-Proteine.	104
Abb. 45: Modellvorstellung der gatekeeper-Funktion auf der Grundlage der Interaktion mit dem „inner rod“-Protein (nach Cherradi et al., 2013).	105
Abb. 46: Modellvorstellung der gatekeeper-Funktion auf der Grundlage der Interaktion mit SctV (nach Yu et al., 2018; Bange et al., 2010).	107
Abb. 47: Nukleotidsequenz des lacUV5-Promotors im pBRM-Vektor.	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterielle Sekretionssysteme (modifiziert nach Green und Meccas, 2016).....	2
Tabelle 2: Einordnung der T3SS-Komponenten in die Sct-Nomenklatur.	5
Tabelle 3: Verwendete Medien.....	20
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.	21
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.....	22
Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme.....	22
Tabelle 8: PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen.....	23
Tabelle 9: Golden-Gate-Ansatz und Reaktionsbedingungen.	25
Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-Gele.	30
Tabelle 11: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten der homologen Proteine zu HrcS aus Xcv.	38
Tabelle 12: Sequenzidentitäten aus den Alignments der Hrp-Proteine kodiert im hrpB-Operon.....	48
Tabelle 13: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten der homologen Proteine zu HrpB7 aus Xcv.....	49
Tabelle 14: RMSD-Werte der Struktur-Alignments von HrpB7 mit FliJ und CT670.....	52
Tabelle 15: Die Versuchsergebnisse mit den XopA-HpaA-Chimären.....	101
Tabelle 16: Verwendete Plasmide.....	128
Tabelle 17: Verwendete Oligonukleotide.....	130

1. Einleitung

1.1. Der Proteintransport über die Zytoplasmamembran in Prokaryonten

In vielen Lebensformen, wie Bakterien, Archaeen und Eukaryonten, sind das Sec (*secretion*)- und Tat (*twin arginine transporter*)-Proteinsekretionssystem zu finden (Robinson und Bolhuis, 2004; Papanikou *et al.*, 2007). Beide Sekretionssysteme erkennen ihre Substrate anhand einer Signalsequenz am N-terminalen Ende. Zusätzlich vermitteln lösliche Hilfsproteine, sogenannte Chaperone, die Übertragung der zu sekretierenden Proteine aus dem Zytoplasma an das Sekretionssystem (Papanikou *et al.*, 2007; Green und Meccas, 2016). Im Unterschied zum Sec-System werden Proteine vom Tat-System in vollständig gefalteter Form sekretiert (Green und Meccas, 2016). Diese Form des Proteinexports ist bei einigen Proteinen essentiell, da sie posttranslationale Modifikationen besitzen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung, oder gebundene Cofaktoren, welche lediglich im Zytoplasma synthetisiert werden (Palmer und Berks, 2003).

Der Großteil der vom Sec- und Tat-System sekretierten Proteine verbleibt als Membranproteine innerhalb der Zytoplasmamembran oder bei Gram-negativen Bakterien im Periplasma (Green und Meccas, 2016).

Gram-negative und einige Gram-positive Bakterien, wie *Mycobacteria* und *Corynebacteria*, benötigen weitere spezielle Sekretionssysteme für den Transport von Proteinen auch über die äußere Membran (Sekretion) und bei pathogenen Bakterien sogar bis in das Zytosol der eukaryontischen Wirtszelle (Translokation) (Tab. 1). Einige dieser Sekretionssysteme sind zudem vom Sec- oder Tat-System abhängig (Green und Meccas, 2016).

Sec-abhängige Sekretionssysteme sind das Typ 2-, Typ 5- und Typ 9- Sekretionssystem (Tab. 1). Diese Sekretionssysteme übernehmen den Transport von Proteinen aus dem Periplasma über die äußere Membran ins extrazelluläre Milieu (Green und Meccas, 2016).

Das Typ 2-Sekretionssystem (T2SS) ist beispielsweise ein Multiproteinkomplex, welcher die innere und äußere Membran von Gram-negativen Bakterien durchspannt. Die periplasmatischen Proteine werden auf bislang unbekanntem Weg vom T2SS erkannt, welches diese im bereits gefalteten Zustand exportiert (Korotkov *et al.*, 2012).

Über dieses Sekretionssystem wird zum Beispiel das Enzym Pullulanase von dem Bakterium *Klebsiella oxytoca* sekretiert. Dieses spaltet Pullulan, ein von Pilzen produziertes Polysaccharid, in kleine Maltotrioseeinheiten (Pugsley *et al.*, 1997; Korotkov und Sandkvist, 2019).

Die Typ 1-, 3-, 4-, 6- und 7-Sekretionssysteme sekretieren Proteine unabhängig vom Sec-System über die Zytoplasmamembran und äußere Membran der Bakterien (Tab. 1). Sie sind

Multiproteinkomplexe, bei denen, mit Ausnahme des T1SS, neben der Sekretion ins extrazelluläre Milieu auch eine Translokation von Proteinen, welche allgemein als Effektoren bezeichnet werden, in das Zytosol der Wirtszelle erfolgt (Green und Meccas, 2016).

Tabelle 1: Bakterielle Sekretionssysteme (modifiziert nach Green und Meccas, 2016).

Tabellarisch aufgelistet sind die Sekretionssysteme von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Dabei wurden folgende Merkmale gegenübergestellt: die sekretierten Substrate; die vermutete Lokalisation des Sekretionssignals im Substrat; die Sekretionsschritte, d.h. Sekretionssysteme, welche am Export des Substrates beteiligt sind; inwieweit das Substrat gefaltet oder ungefaltet sekretiert wird; die Anzahl der Membranen, die das Substrat mit Hilfe des Sekretionssystems durchquert.

Sekretions-system	Substrat/ Funktion ¹	Sekretions-signal	Sekretions-schritte	Substrat gefaltet?	Anzahl der Membranen	Gram (+) oder Gram(-)
T1SS		C-terminal	1	Nein	2	Gram (-)
T2SS	Sekretiert Toxine und abbauende Enzyme	N-und/oder C-terminal	2 (Sec/TAT-abhängig)	Ja	1	Gram (-)
T3SS	Transloziert Effektorproteine in die Wirtszelle	N-terminal	1	Nein	2-3	Gram (-)
T4SS	Transloziert DNA und/oder Proteine	C-terminal	1	Nein	2-3	Gram (-)
T5SS	Sekretiert Toxine, Rezeptorbinde Proteine, Adhesine, abbauende Enzyme	N-terminal	2 (Sec-abhängig)	Nein	1	Gram (-)
T6SS	Transloziert Effektorproteine in prokaryotische und eukaryotische Zellen	n.a.	1	n.a.	2-3	Gram (-)
T7SS	Sekretiert/transloziert Proteine und/oder DNA	C-terminal	1	Ja	1-3	Gram (+)
T9SS/ PorSS²	Sekretiert Proteine/Virulenzfaktoren	C-terminal	2 (Sec-abhängig)	Ja	1	Gram (-)

¹Referenzen: Büttner und Bonas, 2010; Meuskens *et al.*, 2019; Bernal *et al.*, 2018; Green und Meccas, 2016;

²Por secretion system, Lasica *et al.*, 2017; Pena *et al.*, 2019

Das T4SS beispielsweise ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor für das Gram-negative Bodenbakterium *A. tumefaciens* (Christie, 2016). Die darüber übertragene DNA, die sogenannte T-DNA (Transfer-DNA), inseriert in das Genom der pflanzlichen Wirtszelle und induziert unkontrollierte Zellteilung, was zu krebsartigen Wucherungen im Wurzelhalsbereich der Pflanze führt. Gleichzeitig wird die Pflanze dazu veranlasst Nährstoffe für das Bakterium zu produzieren (Lacroix und Citovsky, 2019).

In anderen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien spielt das T3SS eine wesentliche Rolle. Über das T3SS werden von dem Bakterium Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert, welche in die Immunabwehr und in zelluläre Prozesse des eukaryontischen Wirtes eingreifen und diese zum Vorteil für die Vermehrung des Bakteriums verändern (Büttner, 2012).

Ob ein Sekretionssystem als Pathogenitätsfaktor eingestuft wird oder nicht, hängt im Wesentlichen von der Lebensweise des jeweiligen Bakteriums ab. So ist das T4SS essentiell für die Pathogenität in *A. tumefaciens* während *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* das T4SS verwendet, um sich gegen die mit ihm um den Platz konkurrierenden Bakterien zu wehren (Souza *et al.*, 2015). Für diesen Wettstreit um den gleichen Lebensraum bedienen sich *Klebsiella pneumoniae* oder *Pseudomonas aeruginosa* dem T6SS (Hood *et al.*, 2010; Storey *et al.*, 2020).

Des Weiteren können sich zwei Sekretionssysteme in ihrer Funktion unterstützen. Beispiele hierfür sind unter anderem das T2SS in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), welches über die Sekretion von Lipasen, Proteasen und Amylasen den Aufbau des T3SS und damit die Pathogenität von *Xcv* unterstützt (Szczesny *et al.*, 2010; Solé *et al.*, 2015), oder das T6SS im Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), welches zusätzlich zum T3SS durch die Sekretion von Effektoren noch die angeborene Immunantwort des Wirtes hemmt (Wan *et al.*, 2017).

1.2. Das Typ 3 Sekretionssystem (T3SS)

Das T3SS ist in vielen Gram-negativen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien als auch in einigen nicht-pathogenen Bakterien, wie das symbiotisch lebende Bakterium *Rhizobium* vorhanden (Troisfontaines und Cornelis, 2005; Tampakaki, 2014). Dank der großen Anzahl an T3SS pro Zelle in tierpathogenen Bakterien ist es bereits gelungen, diese zu isolieren und mittels Cryo-Elektronenmikroskopie den Aufbau des T3SS zu analysieren (Abb. 1) (Kubori *et al.*, 1998; Marlovits *et al.*, 2004; Yip *et al.*, 2005; Ogino *et al.*, 2006; Zenk *et al.*, 2007).

Es gibt Grund zu der Annahme, dass das T3SS pflanzenpathogener Bakterien dem der tierpathogenen Bakterien im Aufbau ähnelt. Die Proteine, welche den Aufbau der Ringstrukturen in der inneren und äußeren bakteriellen Membran organisieren, sind in pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konserviert (Bogdanove *et al.*, 1996; Büttner, 2012). Um eine allgemeine Nomenklatur zu schaffen, werden die konservierten Komponenten des T3SS als Sct (Sekretion und zelluläre Translokation; *secretion and cellular translocation*) Proteine bezeichnet (Tab. 2) (Hueck, 1998; Deng *et al.*, 2017).

In seinem strukturellen Aufbau ähnelt das Translokations-assoziierte T3SS dem bakteriellen Flagellum (Abb. 1) (Büttner, 2012; Diepold und Armitage, 2015). Das bakterielle Flagellum ist ein rotierendes Organell von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und dient der

Fortbewegung des Bakteriums (Baron, 1996). Dieser multimere Komplex aus über 30 verschiedenen Proteinen besitzt ähnlich dem Translokations-assoziierten T3SS die Membranringkomponenten, den Exportapparat und eine ATPase auf der zytoplasmatischen Seite (Büttner, 2012). Insgesamt acht Komponenten des Translokations-assoziierten T3SS besitzen homologe Proteine im flagellären T3SS (Abb. 1) (Blair, 1995; Kubori *et al.*, 1998; Büttner, 2012).

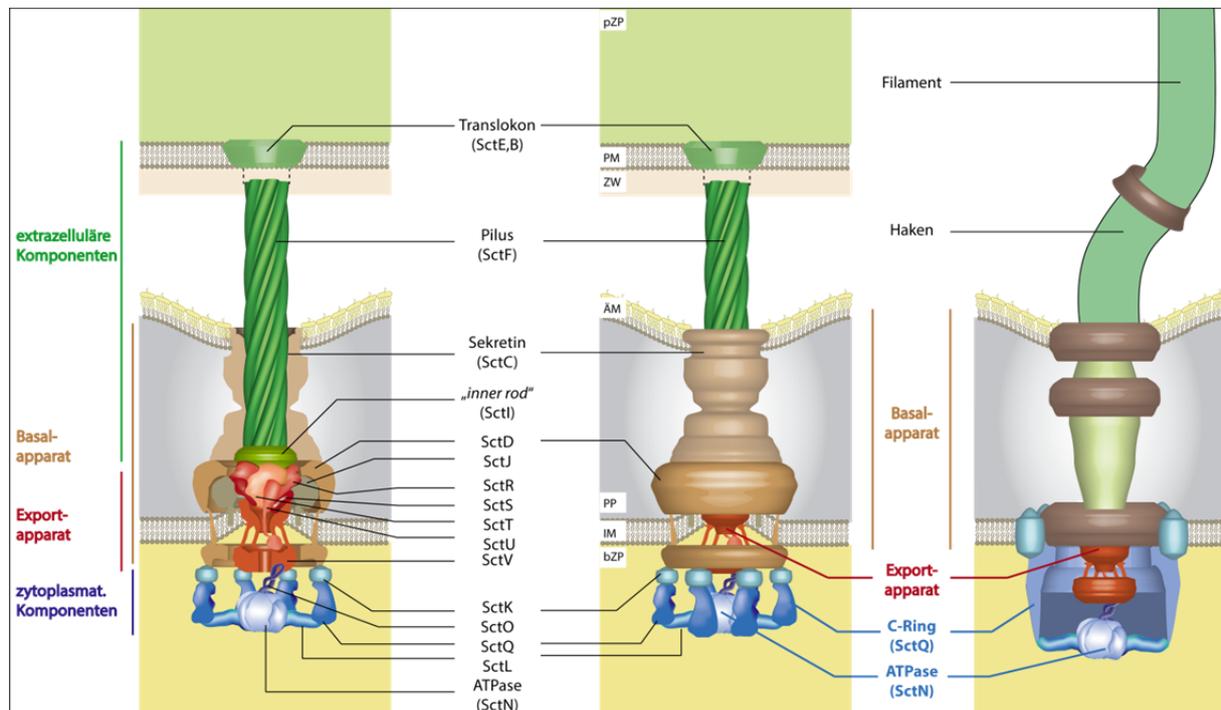


Abb. 1: Vergleich des T3SS aus tierpathogenen Bakterien mit dem Aufbau des Flagellums.

Im linken Bild ist das T3SS in der Frontansicht dargestellt. Im mittleren Bild sind die Ringstrukturen des T3SS zu 180 Grad aufgeschnitten, um die Komponenten Pilus, „inner rod“-Komplex, Exportapparat und ATPase zu zeigen. Die Sct-Nomenklatur ist den einzelnen Komponenten des T3SS zugeordnet. Die Einteilung des T3SS erfolgt in die zytoplasmatischen Komponenten, dem Exportapparat, dem Basalapparat sowie den extrazellulären Komponenten (siehe Farbcode). Im rechten Bild ist das flagelläre T3SS dargestellt. Die zueinander homologen Komponenten (Kernkomponenten) vom Translokations-assoziierten T3SS und flagellärem T3SS sind gekennzeichnet. tZP, tierisches Zytoplasma; PM, Plasmamembran; ÄM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; bZP, bakterielles Zytoplasma. Modell wurde erstellt nach (Worrall *et al.*, 2016; Kuhlen *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2018; Majewski *et al.*, 2019; Torres-Vargas *et al.*, 2019)

Über den Exportapparat des Flagellums werden die Proteine sekretiert, welche am Aufbau der röhrenförmigen axialen Struktur des Flagellums im äußeren Bereich der Zellmembran involviert sind (Minamino und Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008). Die Anzahl und die Anordnung der Flagellen hängen von dem Bakterium ab und können demzufolge auch zur Klassifizierung und Identifizierung des Bakteriums verwendet werden (Baron, 1996).

Tabelle 2: Einordnung der T3SS-Komponenten in die Sct-Nomenklatur.

Sct-Nomenklatur	Putative Funktion	<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.		EPEC und EHEC	<i>Shigella</i> spp.	<i>Chlamydia</i> spp.	Flagellar
						SP-1	SP-2				
Extrazelluläre Komponenten											
SctB	Translokationspore	XopA	XopA	-	YopD	SipC	SseD	EspB	IpaC	CopD	-
SctE		HrpF	PopF1/2	HrpK	YopB	SipB	SseC	EspD	IpaB	CopB	-
SctA	Nadelfilament/-spitze	-	-	-	LcrV	SipD	SseB	EspA	IpaD	CT584	FliC
SctF	Nadel/Pilus	HrpE	HrpY	HrpA	YscF	PrgI	SsaG	EscF	MxiH	CdsF	FlgE
Basalapparat											
SctC	Sekretin, ÄM-Ring	HrcC	HrcC	HrcC	YscC	InvG	SsaC	EscC	MxiD	CdsC	-
-	Pilotin, Stabilisierung von SctC	-	-	HrpT	YscW	InvH	-	-	MxiM	-	-
SctD	IM-Ring, Brücke von IM zu ÄM	HrcD	HrpW	HrpQ	YscD	PrgH	SsaD	EscD	MxiG	CdsD	FliG
SctJ	IM-Ring, Adaptor für SctI	HrcJ	HrcJ	HrcJ	YscJ	PrgK	SsaJ	EscJ	MxiJ	CdsJ	FliF
SctI	„inner rod“	HrpB1/B2	HrpJ	HrpB	YscI	PrgJ	SsaI	EscI	MxiI	-	-
-	Lyt. Transglycosylase	HpaH	-	HrpH and HopP1	-	lagB	-	EtgA	IpgF	-	FlgJ
Exportapparat (IM-Komponenten)											
SctU	Autoprotease, Substraterkennung, Substratspezifitätswechsel	HrcU	HrcU	HrcU	YscU	SpaS	SsaU	EscU	Spa40	CdsU	FliB
SctV	Substratbindungsstelle	HrcV	HrcV	HrcV	YscV	InvA	SsaV	EscV	MxiA	CdsV	FliA
SctR	Translokationspore	HrcR	HrcR	HrcR	YscR	SpaP	SsaR	EscR	Spa24	CdsR	FliP
SctS		HrcS	HrcS	HrcS	YscS	SpaQ	SsaS	EscS	Spa9	CdsS	FliQ
SctT		HrcT	HrcT	HrcT	YscT	SpaR	SsaT	EscT	Spa29	CdsT	FliR

Tabelle 2: Die Zuordnung der T3SS-Komponenten in die Sct-Nomenklatur

Sct-Nomenklatur	Putative Funktion	<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.		EPEC und EHEC	<i>Shigella</i> spp.	<i>Chlamydia</i> spp.	Flagellar
						SP-1	SP-2				
Cytoplasmatische Komponenten											
SctQ	C-Ring	HrcQ	HrcQ	HrcQ	YscQ	SpaO	SsaQ	SepQ	Spa33	CdsQ	FliM/N
SctN	ATPase	HrcN	HrcN	HrcN	YscN	Spa47	InvC	EscN	Spa47	CdsN	FliI
SctL	ATPase-Stabilisator u. -Regulator	HrcL	HrpF	HrpE	YscL	OrgB	SsaK	EscL	MxiN	CdsL	FliH
SctO	ATPase-Stabilisator	(HrpB7)	HrpD	HrpO	YscO	InvI	SsaN	EscO	Spa13	CdsO	FliJ
SctK	Verbinder zwischen IM-Ring und C-Ring	(HrpB4)	-	HrpD	YscK	OrgA	-	EscK	MxiK	-	-
Regulatoren											
SctP	Nadel-Länge-Regulator	HpaC	HpaP	HrpP	YscP	InvJ	SsaP	EscP	Spa32	CdsP	FliK
SctW	Pförtner, <i>gatekeeper</i>	HpaA	HpaA	HrpJ	YopN-TyeA	InvE	SsaL	SepL	MxiC	CopN	-
-	Weitere regulatorische Komponenten	-	-	-	-	-	SpiC	SepD	-	-	-
-	Chaperon für späte Substrate	HpaB	HpaB	u.a. ShcA	u. a. SycE	SicP, SigE, InvB	SrcA, SscB	SpcU, SpcS	IpgE, Spa1, IpgA	SycE	-

Die allgemeine Sekretions- und zelluläre Translokations (Sct)-Nomenklatur wurde 1998 erstmalig vorgeschlagen und 2016 endlich umgesetzt. Die Spezies-spezifischen Namen für jedes Sct-Protein sind in der Tabelle angegeben. Die T3SS-Komponenten der pflanzenpathogenen Bakterien (*Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* und *Pseudomonas syringae*) besitzen nur eine sehr geringe Sequenzidentität zu den T3SS-Komponenten der tierpathogenen Bakterien. Daher erfolgte die Einteilung der Hrp/Hrc-Proteine in die Tabelle zum Teil aufgrund ihrer vorhergesagten Funktion. „-“ zeigt an, dass bisher noch kein funktionelles Homolog identifiziert werden konnte. „()“ gibt an, dass die Analysen diesbezüglich noch nicht abgeschlossen sind. EHEC, Enterohämorrhagische *Escherichia coli*; EPEC, Enteropathogene *Escherichia coli*; SP-1 und 2, *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 und 2. *Salmonella* besitzt zwei Gen-Cluster, welche für je ein T3SS kodieren. Diese Gen-Cluster werden als Pathogenitätsinseln 1 und 2 bezeichnet. Verändert nach (Hueck, 1998; Gazi *et al.*, 2012; Portaliou *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017)

1.2.1. Die Architektur des T3SS von tierpathogenen Bakterien

Die rund 20 unterschiedlichen Sct-Proteine, welche das circa 7 MDa große T3SS aufbauen, werden eingeteilt in die zytoplasmatischen Komponenten (SctK, Q, L, N, O), den Exportapparat (SctR, S, T, U, V), den Basalapparat (SctC, J, D) und die extrazellulären Komponenten (SctF, I, B, E) (Büttner, 2012; Wagner *et al.*, 2018; Diepold, 2019).

Die extrazellulären Komponenten des T3SS

Zu den extrazellulären Komponenten zählt die in tierpathogenen als Nadel bezeichnete Struktur. Es ist bekannt, dass mehr als 100 Kopien von SctF die Nadel aufbauen (Broz *et al.*, 2007). Die vorhergesagte helikale Struktur der Nadel ist circa 40-80 nm lang und hat vermutlich einen Innendurchmesser von nur 20 Å, was lediglich das Passieren von ungefaltetem Protein erlaubt (Loquet *et al.*, 2012).

Die Nadel ist direkt oder indirekt mit dem Translokon verbunden, welches als kanalbildender Komplex in die eukaryontische Plasmamembran inseriert und die Effektortranslokation vermittelt (Mueller *et al.*, 2008; Mattei *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2014). Das Translokon besteht aus multiplen Kopien der zwei Translokonproteine SctB und SctE, während ein zusätzlicher Nadel-„tip“-Komplex (SctA) das Translokon mit dem Nadelfilament verbindet (Broz *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008; Dickenson *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2018).

Das helikale Nadelfilament ist in der inneren Membran mit dem Exportapparat SctRST über einen „inner rod“-Komplex aus sechs Kopien des Proteins SctI verbunden (Marlovits *et al.*, 2006; Dietsche *et al.*, 2016; Zilkenat *et al.*, 2016). SctI wird schwach sekretiert und ist für den Aufbau der extrazellulären Nadel essentiell (Sukhan *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2012; Torres-Vargas *et al.*, 2019).

Der Basalapparat des T3SS

Über den „inner rod“-Komplex ist die Nadelstruktur in dem Basalapparat verankert und mit dem Exportapparat verbunden (Wagner *et al.*, 2018). Der Basalapparat besteht aus dem äußeren Membranring, der vermutlich aus einem Sekretin-Komplex aus 12-15 SctC-Proteine aufgebaut wird, und den äußeren und inneren Innermembranring SctD und SctJ (Abb. 1) (Wagner *et al.*, 2018). SctC interagiert mit dem Innermembranring, bestehend aus 24 SctD-Proteinen (Schraidt *et al.*, 2010; Schraidt und Marlovits, 2011). Im Inneren des SctD-Ringes befindet sich der Ring aus 24 SctJ-Proteinen (Yip *et al.*, 2005; André *et al.*, 2007; Sani *et al.*, 2007; McDowell *et al.*, 2011; Schraidt und Marlovits, 2011).

In vivo-Photocrosslinking-Experimente in *Salmonella* Typhimurium, welche mit dem „inner rod“-Protein SctI durchgeführt wurden, zeigten eine Interaktion des „inner rod“-Proteins mit SctR und SctT mit einer fortlaufenden helikalen Assemblierung von SctI an dem

Exportapparat (Torres-Vargas *et al.*, 2019). Diese experimentellen Daten stimmen überein mit der Annahme, dass auch die Nadelstruktur eine helikale Windung aufweist (Cordes *et al.*, 2003; Loquet *et al.*, 2012).

Der Exportapparat des T3SS

Der Exportapparat umhüllt von dem SctJ-Ring besteht aus fünf hydrophoben Proteinen, die innerhalb der Translokations-assoziierten T3SS der tier- und pflanzenpathogenen Bakterien als auch des flagellären T3SS konserviert sind: SctR, SctS, SctT, SctU und SctV (Büttner, 2012; Kuhlen *et al.*, 2018).

Der Exportapparat baut sich vermutlich zusammen aus fünf SctR-Proteinen, einem SctT-Protein und vier SctS-Proteinen (Kuhlen *et al.*, 2018). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des flagellären Exportapparates lassen vermuten, dass die Proteine SctRST helikal assemblieren (Kuhlen *et al.*, 2018). An diesem Kernkomplex des Exportapparates assembliert ein SctU-Protein und ein Ring aus neun SctV-Proteinen (Kuhlen *et al.*, 2018). Eine Besonderheit der Proteine SctU und SctV sind die großen C-terminalen zytoplasmatischen Domänen, welche für die jeweilige Proteinfunktion essentiell sind. SctV interagiert mit Kontrollproteinen des T3SS sowie Effektorproteinen und wird daher als potentielle Substratbindungsstelle des T3SS definiert (Minamino und Macnab, 2000b; Bange *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2018). SctU besitzt vermutlich eine besondere Funktion im Substratspezifitätswechsel (Williams *et al.*, 1996; Lavander *et al.*, 2002; Edqvist *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2008; Björnfot *et al.*, 2009).

Die zytoplasmatischen Komponenten des T3SS

SctK, SctQ, SctL, SctN und SctO sind die zytoplasmatischen Komponenten des T3SS. Der Komplex aus SctK, SctQ und SctL wird aufgrund seiner Funktion als Substrat-Sortierungsplattform bezeichnet (Lara-Tejero *et al.*, 2011). An diese Plattform binden die T3S-Substrate vor ihrer Sekretion über das T3SS entsprechend ihrer Sekretionshierarchie (Lara-Tejero *et al.*, 2011; Diepold *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2018). Es wird vermutet, dass die Sekretion der Substrate einer Hierarchie unterliegt, da es entscheidend ist, dass zuerst die extrazellulären Komponenten des T3SS sekretiert werden, um anschließend die Sekretion der Effektoren zu ermöglichen (Lara-Tejero *et al.*, 2011; Diepold *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2018). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Substrat-Sortierungsplattform aus *Shigella* und *Salmonella* zeigen sechs im Kreis angeordnete Säulen aus SctQ-Proteinen, die jeweils über ein SctK-Protein an die zytoplasmatische Domäne von je vier SctD-Proteinen an die innere Membran gebunden sind (Abb. 1) (Hu *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017). Ein Homodimer aus SctL verbindet die sechs Säulen mit der zentral gelegenen

hexameren ATPase SctN und dient zugleich als negativer Regulator der ATPase (Blaylock *et al.*, 2006; Notti *et al.*, 2015; Imada *et al.*, 2016; Diepold *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017).

Die ATPase hydrolysiert ATP und setzt dabei vermutlich die Substrate aus dem Chaperon-Substrat-Komplex frei und entfaltet diese (Akedo und Galán, 2005). Die Entfaltung der Proteine ermöglicht den Transport durch den 2-3 nm breiten Sekretionskanal (Blocker *et al.*, 2001).

Es wird vermutet, dass die T3-assoziierte ATPase nur die Energie für den initialen Sekretionsprozess bereitstellt (Akedo und Galán, 2005). Die Sekretion der Substrate durch das T3SS soll hingegen von der protonenmotorischen Kraft (PMF), vermutlich unterstützt durch eine Drehbewegung des Sekretionskanals ähnlich wie beim Flagellum, angetrieben sein (Wilharm *et al.*, 2004; Akedo und Galán, 2005; Minamino und Namba, 2008; Paul *et al.*, 2008; Ohgita *et al.*, 2013; Ohgita und Saito, 2019).

Im Zentrum des ATPase-Hexamers bindet SctO vermutlich als Monomer und stellt eine Verbindung zum Exportapparat her oder dient als Abstandshalter zur zytoplasmatischen Domäne des SctV-Ringes (Minamino und Macnab, 1999; Minamino *et al.*, 2000; Ibuki *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015; Majewski *et al.*, 2019).

1.2.2. Die Logistik: Erkennung der T3S-Substrate und Transport zum T3SS

Die effiziente Sekretion und Translokation vieler T3S-Substrate hängt von T3S-Chaperonen ab (Büttner *et al.*, 2004; Mukaihara *et al.*, 2010). Es existiert die Vermutung, dass sich die T3S-Substrate vorher an der inneren Membran versammeln, dank eines Cardiolipin-Bindungsmotivs in der N-terminalen Region der Effektoren (Prochaska *et al.*, 2018). Dort angekommen, werden sie von einem T3S-Chaperon erkannt und zum Exportapparat des T3SS geführt (Prochaska *et al.*, 2018). Die T3S-Chaperone interagieren mit den T3S-Substraten, stabilisieren sie und erleichtern ihre Erkennung mit den Komponenten des T3SS unter anderem der Substrat-Sortierungsplattform oder der ATPase (Thomas *et al.*, 2005; Lara-Tejero *et al.*, 2011). Die Chaperon-Effektor-Komplexe werden am T3SS ATP-abhängig dissoziiert, der Effektor entfaltet und dieser in die Wirtszelle transloziert (Akedo und Galán, 2005; Lorenz und Büttner, 2009; Galán *et al.*, 2014).

Chaperone werden entsprechend der Funktion ihrer Bindungspartner in drei Typen eingeteilt (Parsot *et al.*, 2003). Die Chaperone, welche Effektoren erkennen und deren Translokation vermitteln, gehören zum Typ 1. Die Typ 2-Chaperone vermitteln die Sekretion der Translokatoren, während die Typ 3-Chaperone die Nadel-aufbauenden Proteine binden und zum T3SS geleiten (Parsot *et al.*, 2003).

Die T3-abhängig sekretierten Substrate besitzen neben der Chaperon-Bindungsstelle, welche vorwiegend in der N-terminalen oder zentralen Region lokalisiert ist, zusätzlich ein N-

terminales Sekretions- und Translokationssignal (Stebbins und Galán, 2001; Büttner *et al.*, 2004; Triplett *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010; Büttner, 2012). Die N-terminale Signalsequenz ist im Fall der T3-abhängig sekretierten Substrate in ihrer Aminosäuresequenz nicht konserviert. Zudem findet keine Prozessierung der sekretierten Proteine statt (Tampakaki *et al.*, 2004; Gürlebeck *et al.*, 2006). Es wurden bislang nur wenige potentielle Merkmale in der N-terminalen Aminosäuresequenz von T3-Effektoren gefunden, die für die T3-abhängige Sekretion entscheidend sind (Mcdermott *et al.*, 2011; Schechter *et al.*, 2012; Galán *et al.*, 2014). Auf der Grundlage von bioinformatischen Analysen besteht die Signalsequenz vermutlich aus einem vermehrten Auftreten von Serinen und Threoninen und ein Fehlen von geladenen oder hydrophoben Aminosäuren wie Leucin in den ersten 20 bis 25 N-terminalen Aminosäuren (Mcdermott *et al.*, 2011; Schechter *et al.*, 2012; Galán *et al.*, 2014). Da die Signalsequenz als Hauptmerkmal unstrukturiert ist, toleriert sie auf der Ebene der Aminosäuresequenz allerdings viele Variationen (Michiels und Cornelis, 1991; Sory *et al.*, 1995; Rüssmann *et al.*, 2002). Interessanterweise sekretiert zum Beispiel das T3SS von *Xanthomonas* auch heterologe Effektorproteine wie PopA von *Ralstonia solanacearum*, AvrB von *Pseudomonas syringae* und YopE von *Yersinia pseudotuberculosis*, was darauf schließen lässt, dass sich der Mechanismus zur Erkennung der Substrate in pflanzen- und tierpathogenen Bakterien vermutlich ähnelt (Rossier *et al.*, 1999; Gürlebeck *et al.*, 2006).

Zusätzlich zum Sekretionssignal liegt in der N-terminalen Region von T3-abhängig sekretierten Effektoren ein separates Translokationssignal zwischen der 30igsten und 70igsten Aminosäure. Es handelt sich hierbei um ein Prolin-/Arginin-reiches Sequenzmotiv, welches unter den Effektoren nahezu konserviert zu sein scheint (Escolar *et al.*, 2001). Die Deletion des Translokationssignals als auch Mutationen in diesem Sequenzmotiv zeigten bereits für die Effektoren AvrBs3, XopE2, XopJ und XopB aus *Xanthomonas*, DspA/E aus *Erwinia amylovora* sowie YopE und YopH aus *Yersinia enterocolitica*, dass diese noch T3-abhängig sekretiert aber nicht mehr in die Wirtszelle transloziert werden können (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Triplett *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010; Scheibner *et al.*, 2017; Prochaska *et al.*, 2018; Scheibner *et al.*, 2018).

Neben dem T3S- und Translokationssignal wird in einigen Effektoren ein weiteres „minimalistisches Translokationssignal“ in- und außerhalb der N-terminalen Region vermutet. Dieses „minimalistische Translokationssignal“ unterstützt vermutlich die Translokation des T3S-Substrates auch in Abwesenheit des Chaperons bzw. noch inaktivem Zustand des Chaperons in der frühen Phase der Wirt-Pathogen-Interaktion (Triplett *et al.*, 2009; Lonjon *et al.*, 2016; Scheibner *et al.*, 2018).

1.3. *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) - ein Modellorganismus zur Analyse des T3SS

1.3.1. Das Phytopathogen *Xcv*

Das Phytopathogen *Xcv* wird für funktionelle Analysen am T3SS als Modellorganismus verwendet. 1914 wurden in Südafrika zum ersten Mal Flecken auf Tomate, hervorgerufen von dem Bakterium *Xcv*, beobachtet (Doidge, 1920). Eine weitere Wirtspflanze von *Xcv* ist Paprika. *Xcv* ist ein Gram-negatives, aerobes, pflanzenpathogenes Bakterium mit einer stäbchenförmigen Gestalt und einem am Pol lokalisiertem Flagellum, welches der Fortbewegung dient (Büttner und Bonas, 2010). Mit Hilfe des Flagellums dringt das Bakterium in das pflanzliche Gewebe über natürliche Öffnungen, wie Hydathoden, Spaltöffnungen oder Wunden, ein. Im pflanzlichen Gewebe angekommen, vermehrt sich *Xcv* lokal im Interzellularraum von anfälligen (suszeptiblen) Pflanzen zu hohen Zelldichten (Büttner und Bonas, 2010). Der Befall der Pflanze wird nach einigen Tagen zunächst als wässrige Läsion und später als nekrotische Flecken sichtbar (Jones *et al.*, 1998). Die Ausbildung der Fleckenkrankheit und zugleich Vermehrung von *Xcv* wird begünstigt bei Temperaturen von 24 bis 30 °C und einer hohen Luftfeuchtigkeit, was vor allem in Anbaugebieten mit feucht-warmen Klima ein ökonomisches Problem darstellt (Bradbury, 1984).

Die erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze ist abhängig von einem oder einer Kombination aus verschiedenen bakteriellen Sekretionssystemen, welche Proteine in das extrazelluläre Milieu sekretieren können oder Proteine und/oder DNA direkt ins Zytosol der Wirtszelle translozieren (Tab. 1, Abschnitt 1.1.) (Gerlach und Hensel, 2007). Es ist bisher bekannt, dass im Genom von *Xcv* acht unterschiedliche Sekretionssysteme kodiert vorliegen: das Sec- und Tat-Sekretionssystem, sowie die Sekretionssysteme Typ 1 bis Typ 6 (T1SS-T6SS) (Büttner und Bonas, 2010). Die Kombination aus T3SS und T2SS hat nicht nur einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum in der Pflanze, sondern steigert auch die Pathogenität von *Xcv* (Szczeny *et al.*, 2010). Über den Einfluss der anderen Sekretionssysteme auf die Pathogenität von *Xcv* ist bisher nichts bekannt.

Essentiell für die Pathogenität von *Xcv* ist in erster Linie das T3SS, welches über 30 verschiedene Effektoren in das Zytosol der pflanzlichen Wirtszelle transloziert und dort die Stoffwechselprozesse der Pflanzenzelle manipuliert (Büttner und Bonas, 2010; Büttner, 2016). Die Pflanze hat ihre eigene Strategie entwickelt, um sich gegen diese phytopathogenen Bakterien zu wehren. Zur pflanzlichen Immunantwort gehören als primärer Schritt die PAMP/MAMP-abhängige Immunität (PTI; „PAMP-triggered immunity“; MTI; „MAMP-triggered immunity“) und die Effektor-abhängige Immunität (ETI; „effector-triggered

immunity“) (Jones und Dangl, 2006). Im Fall der PTI aktivieren membranständige Rezeptoren durch die Erkennung pathogener Strukturen (PAMPs/MAMPs; „pathogen-/microbe-associated molecular patterns“) intrazelluläre Signalkaskaden, induzieren den Einstrom von Calcium-Ionen in das Zytosol, fördern reaktive Sauerstoffspezies und die Expression spezifischer Abwehrgene (Asai *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; Zipfel, 2008). Bei der ETI werden die in die Pflanzenzelle translozierten Effektoren des Pathogens detektiert durch sogenannte Resistenz (R)-Proteine und lösen eine entsprechende Immunreaktion aus (Jones und Dangl, 2006). Dabei besitzt ein R-Protein eine hohe Spezifität und kann jeweils nur einen bestimmten Effektor detektieren (Dangl und McDowell, 2006). Die Erkennung des bakteriellen Effektors in der pflanzlichen Wirtszelle durch ein R-Protein induziert zumeist eine hypersensitive Reaktion (HR) (Scheel, 1998; Gill *et al.*, 2015). Die HR ist der programmierte Zelltod pflanzlicher Zellen am Infektionsort, um das bakterielle Wachstum im Pflanzengewebe zu verhindern und dient demnach als Abwehrreaktion der Pflanze (Büttner und Bonas, 2010).

Die von der PTI und ETI induzierten Abwehrmechanismen sollen die Ausbreitung eingedrungener Pathogene in der Pflanze verhindern. Zeitgleich erfolgt eine Immunisierung des restlichen Pflanzengewebes (SAR; „systemic acquired resistance“) (Verhagen *et al.*, 2004; Choudhary *et al.*, 2007; Romera *et al.*, 2019). Dabei übernehmen vor allem Phytohormone wie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen die Regulation weiterer Signalwege (Bigeard *et al.*, 2015).

Die Analyse einzelner Effektoren von *Xcv* zeigte, dass das Phytopathogen mit Hilfe von Effektoren dazu in der Lage ist, die pflanzliche Immunantwort zu hemmen. Zu den bereits analysierten Effektoren gehören unter anderem XopJ und XopD. Während XopJ die Proteasom-Aktivität inhibiert und den SA (*salicylic acid*)-Gehalt in der Zelle reduziert, greift XopD auf transkriptionaler Ebene ein (Üstün *et al.*, 2013). XopD reduziert die SA-, JA (*jasmonic acid*)- und Ethylen-induzierte Transkription von Genen, welche für die Immunantwort entscheidend sind, und unterstützt dabei die Vermehrung des Bakteriums (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

Effektoren können aber auch die Expression spezifischer pflanzlicher Gene aktivieren, wie es für die Avr-Proteine gezeigt wurde (Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). Der wohl bekannteste Vertreter ist AvrBs3 aus *Xcv*. Er fungiert als Transkriptionsaktivator pflanzlicher Gene und wird daher auch als TAL (*transcription activator like*)-Effektor bezeichnet (Boch *et al.*, 2009; Scholze und Boch, 2010, 2011). Der TAL-Effektor lässt sich in drei Domänen einteilen. Über die zentrale Region bindet der Effektor direkt an ein konserviertes Promotor-Element von Zielgenen, welche UPA-Gene (*upregulated by AvrBs3*) genannt werden (Kay *et al.*, 2007; Boch und Bonas, 2010). Zur Induktion der Transkription im pflanzlichen Zellkern trägt AvrBs3 in der C-terminalen Region Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization*

signals) und eine saure transkriptionaktivierende Domäne (Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Die N-terminale Region von AvrBs3 enthält Signale, welche essentiell sind für die T3-abhängige Sekretion und Translokation des Effektors in die Wirtszelle (Büttner *et al.*, 2004; Scheibner *et al.*, 2018).

1.3.2. Der genetische Bausatz zum Aufbau des T3SS in *Xcv*

Die T3SS-Gene von pflanzenpathogenen Bakterien sind in dem circa 23 kb großen chromosomalen *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*)-Gencluster lokalisiert (Büttner und Bonas, 2002). Das *hrp*-Gencluster in *Xcv* besitzt insgesamt 25 Gene, welche auf acht Operone aufgeteilt sind (Abb. 2). Unter den 25 Genen zählen 11 Gene im Vergleich zu den tier- und/oder anderen pflanzenpathogenen Bakterien als konserviert, welche daher als *hrc* (*hrp conserved*)-Gene bezeichnet werden, und sieben Gene als nicht konserviert, kurz *hrp*-Gene (Büttner und Bonas, 2002). Die Genprodukte sowohl der *hrc*- als auch der *hrp*-Gene sind essentiell für die Pathogenität von *Xcv* (Büttner *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2012; Hartmann und Büttner, 2013; Hausner *et al.*, 2013). Die *hrc*-Gene kodieren vermutlich die Kernkomponenten des T3SS auf Grund der hohen Nukleinsäureidentität zu den Genen aus tierpathogenen Bakterien (Abb. 2) (Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 2000). Die *hrp*-Gene sind beteiligt am Aufbau der periplasmatischen „inner rod“-Struktur (HrpB1 und HrpB2), des Translokons (HrpF) und des Pilus (HrpE) (Weber und Koebnik, 2005; Weber *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013). Die Funktion der *hrp*-Gene *hrpB4*, *hrpB7* und *hrpD6* ist noch unklar.

Weitere sieben Gene des *hrp*-Genclusters werden als *hrp*-assoziierte Gene bezeichnet, kurz *hpa*-Gene. Diese Gene kodieren Proteine, welche die T3S und Translokation kontrollieren, wie im Fall von HpaA, HpaB und HpaC (Büttner und Bonas, 2002; Büttner *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2008b).

Die Expression der *hrp*-Gene wird in der Pflanze oder in einem speziellen Minimalmedium aktiviert (Schulte und Bonas, 1992a, b). Dabei hängt die Aktivierung von zwei regulatorischen Proteinen ab, HrpG und HrpX, welche außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert sind (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996b). Die Regulation erfolgt nach dem Prinzip des Zwei-Komponentensystems. Dabei ist eine bislang unbekannte Histidinkinase der Rezeptor eines extrazellulären Signals und aktiviert HrpG bei Signalerkennung (Wengelnik *et al.*, 1999).

HrpG aktiviert die Genexpression des *hrpA*-Operons und *hrpX* (Wengelnik *et al.*, 1996b). HrpX, ein Transkriptionsaktivator, welcher zur AraC-Familie gehört, induziert in Folge die Genexpression der Operone *hrpB* bis *hrpF* und einiger Effektor-Gene (Wengelnik und Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996a; Koebnik *et al.*, 2006).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (85-10)

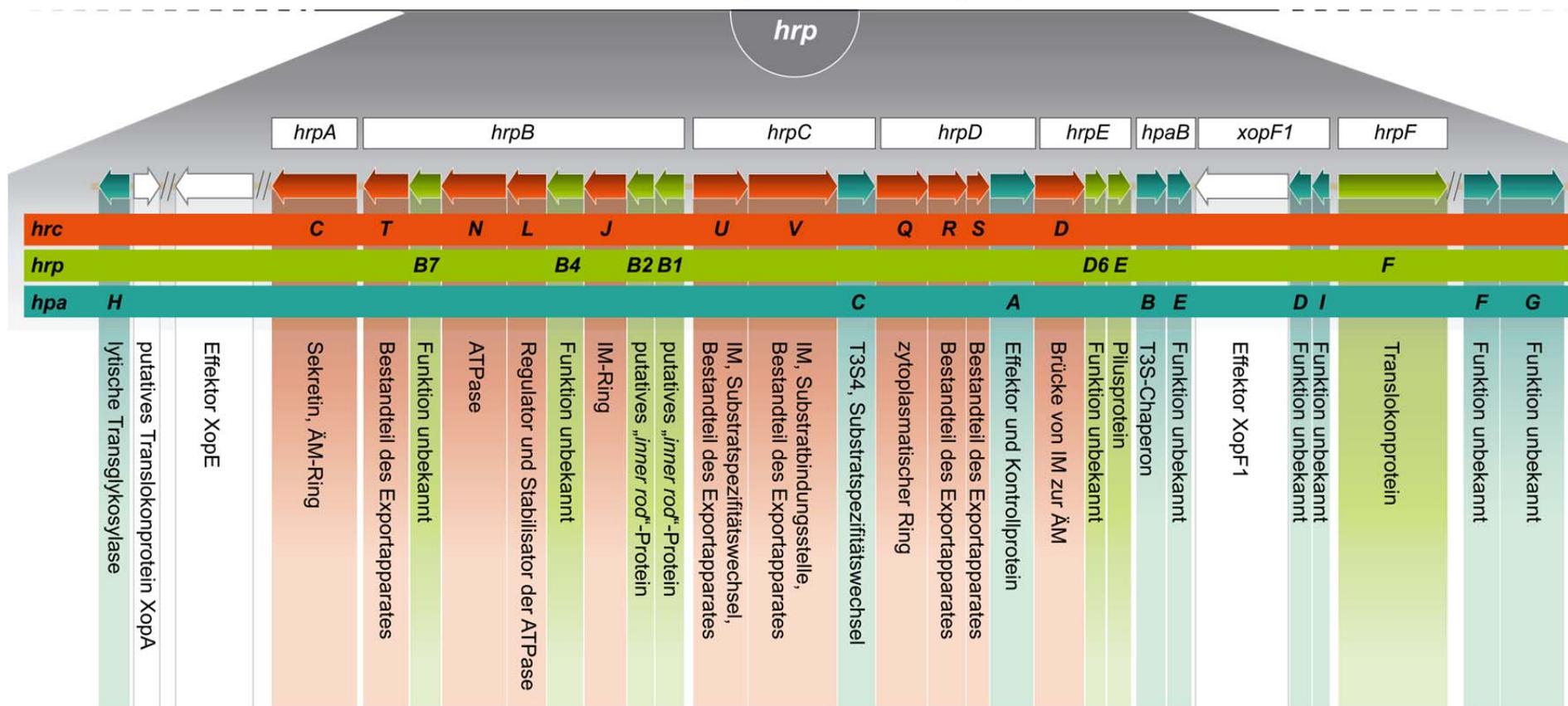


Abb. 2: Das *hrp*-Gencluster von *Xcv*.

Das *hrp*-Gencluster umfasst 25 Gene, die in acht Transkriptionseinheiten, den Operonen *hrpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* und *hpaB* sowie *xopF1* zusammengefasst sind (weiße Kästen). Die Gene *hpaH* und *xopA* befinden sich in der flankierenden Region des *hrp*-Genclusters. Die 11 konservierten *hrc*-Gene sind orange unterlegt, die *hrp*-Gene in grün und die *hpa*-Gene in blau dargestellt. Pfeile weisen auf Gene hin und geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. Im unteren Abschnitt der Abbildung ist die mögliche Funktion der Genprodukte aus dem *hrp*-Gencluster angegeben. *hrc*, *hrc*-Gene (orange); *hrp*, *hrp*-Gene (grün); *hpa*, *hpa*-Gene (blau)

1.3.3. Die Hierarchie in der T3-abhängigen Sekretion am Beispiel von *Xcv*

Zu den Substraten des T3SS zählen die extrazellulären Komponenten des T3SS und die Effektoren (Rossier *et al.*, 2000; Büttner und Bonas, 2002). Die Sekretion der Substrate unterliegt höchstwahrscheinlich einer Hierarchie, deren Kontrolle bisher nicht vollständig analysiert ist (Rossier *et al.*, 2000; Büttner *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2008b; Lorenz und Büttner, 2011). Eine Funktion in der Sekretionskontrolle werden in *Xcv* bisher vier zum Teil essentielle Proteine zugeschrieben: HrcU, HpaA, HpaB und HpaC (Büttner *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2008b; Lorenz und Büttner, 2011). Die Interaktion der Kontrollproteine HrcU (SctU) und HpaC leitet vermutlich den ersten Substratspezifitätswechsel vom „*inner rod*“- Protein HrpB2 (SctI) zur Sekretion der Translokonproteine ein (Abb. 3) (Lorenz und Büttner, 2011).

HpaC ist das T3S4 („*type 3 secretion substrate specificity switch protein*“)-Protein (Lorenz *et al.*, 2008b). Die C-terminal gelegene putative T3S4-Domäne ist essentiell für die Interaktion mit HrcU_C, jedoch nicht hinreichend, um den *hpaC*-Phänotyp zu komplementieren (Schulz und Büttner, 2011). HpaC wird nicht sekretiert anders als seine analogen T3S4-Proteine in tierpathogenen oder flagellärem T3SS (Büttner *et al.*, 2006).

Der erste Substratspezifitätswechsel

Das „*inner rod*“-Protein HrpB2, welches für die Pilusassemblierung in *Xcv* essentiell ist, ist vermutlich eines der ersten T3-abhängig sekretierten Substrate und interagiert ebenso wie HpaC mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (HrcU_C) des FlhB/YscU-Homologs HrcU (SctU) (Rossier *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2008b). HrcU_C wird autoproteolytisch gespalten (Lorenz und Büttner, 2011). Die autoproteolytische Spaltung von HrcU_C erfolgt im NPTH-Motiv (Abkürzung für die Aminosäuren Asn-Pro-Thr-His) vermutlich zwischen dem Asparagin und dem Prolin. Die Spaltung fördert die Sekretion von Translokonproteinen sowie Effektorproteinen und damit die Pathogenität von *Xcv* (Lorenz und Büttner, 2011). Eine Interaktion von HrcU_C mit Pilus- und Effektorproteinen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Lorenz *et al.*, 2008b).

Auf die Sekretion von HrpB2 hat die autoproteolytische Spaltung von HrcU_C keinen Einfluss, weshalb der Start der HrpB2-Sekretion bereits vor der HrcU_C-Spaltung vermutet wird (Abb. 3) (Lorenz und Büttner, 2011; Hausner und Büttner, 2014). HrcU-Derivate, welche Mutationen oder Deletionen im NPTH-Motiv besitzen, interagieren nicht mit HrpB2 und dem Kontrollprotein HpaC (Hausner und Büttner, 2014). HrpB2 und HpaC könnten daher um die gleiche Bindungsstelle an HrcU_C konkurrieren (Lorenz und Büttner, 2011; Hausner und Büttner, 2014). Das putative „*inner rod*“-Protein HrpB2 wird zunächst sekretiert und HpaC fördert wahrscheinlich die autoproteolytische Spaltung und/oder Konformationsänderung von

HrcU_C (Lorenz und Büttner, 2011; Hausner und Büttner, 2014). Das Spaltprodukt bietet vermutlich keine effektive Substratbindungsstelle für HrpB2 (Lorenz und Büttner, 2011). Zusätzlich inhibiert HpaC die weitere HrpB2-Sekretion wahrscheinlich über die Interaktion mit zytoplasmatischen HrpB2-Proteinen (Abb. 3) (Lorenz und Büttner, 2011).

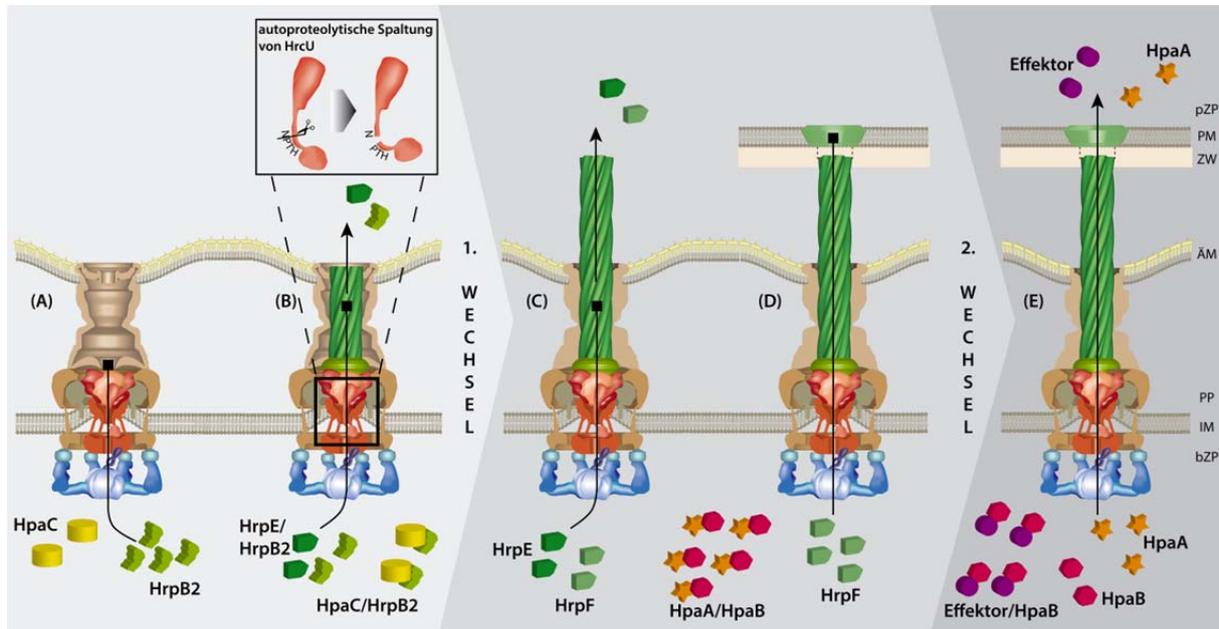


Abb. 3: Der Substratspezifitätswechsel in *Xcv*.

(A) HrpB2 interagiert mit HrcU_C und wird sekretiert für den Aufbau des „inner rod“-Komplexes. HpaC interagiert ebenfalls mit HrcU_C. (B) Die autoproteolytische Spaltung erfolgt zwischen dem Asparagin (N) und Prolin (P) im NPTH-Motiv. HpaC interagiert mit HrpB2 und inhibiert dessen Sekretion. (C) Nach dem ersten Substratspezifitätswechsel werden vermutlich das Pilusprotein HrpE und das Translokonprotein HrpF sekretiert. Das Chaperon HpaB wird von dem Kontrollprotein HpaA blockiert, (D) welches gleichzeitig die HrpF-Sekretion fördert. (E) Mit dem zweiten Substratspezifitätswechsel ist das T3SS vermutlich aufgebaut und HpaA wird als erster Effektor in die Pflanzenzelle transloziert. Das Chaperon HpaB interagiert mit weiteren Effektoren und geleitet sie zum T3SS für die Translokation ins Zytoplasma der Pflanzenzelle. rot, Exportapparat; blau, zytoplasmatische Komponenten; braun, Basalapparat; grün, extrazellulären Komponenten; pZP, pflanzliches Zytoplasma; PM, Plasmamembran; ZW, Zellwand; ÄM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; bZP, bakterielles Zytoplasma

Für dieses Modell spricht die Tatsache, dass in einer *hpaC*-Deletionsmutante die Sekretion von Translokon- und Effektorproteinen reduziert ist, während HrpB2 vermehrt sekretiert und sogar transloziert wird (Abb. 4) (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz und Büttner, 2011; Hausner und Büttner, 2014). Des Weiteren wurde eine HrcU-Mutante mit einer Punktmutation in der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne gefunden, welche den *hpaC*-Phänotyp von *Xcv* supprimiert vermutlich aufgrund der veränderten Konformation der HrcU-Mutante. Diese Mutante aktiviert sogar in Abwesenheit von HpaC die Sekretion von späten Substraten (Lorenz und Büttner, 2011).

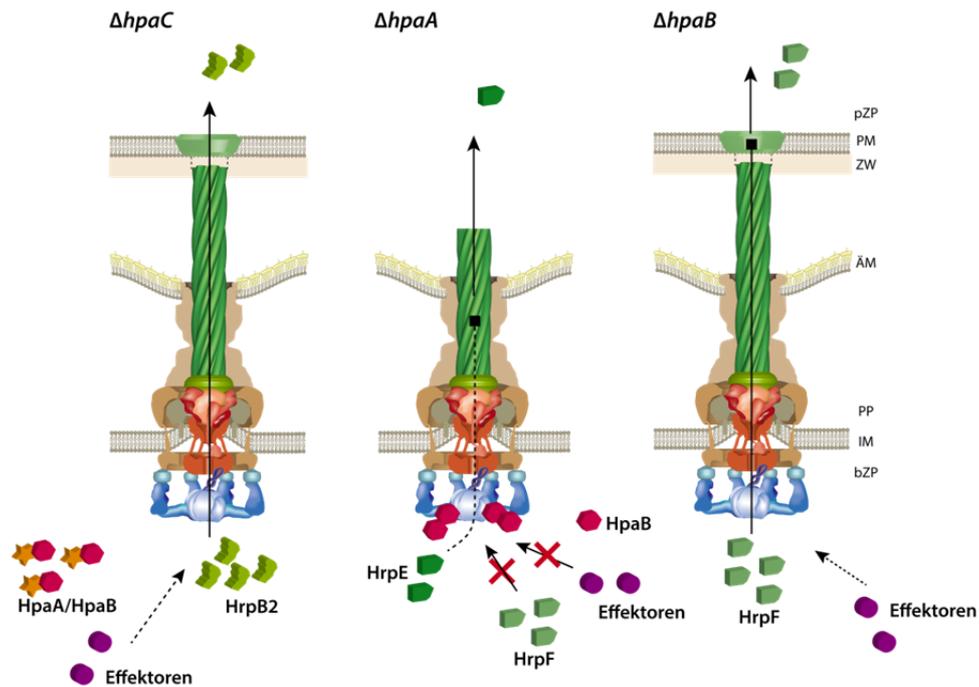


Abb. 4: Der Einfluss der Kontrollproteine HpaC und HpaA und des T3S-Chaperon HpaB auf den Substratspezifitätswechsel.

($\Delta hpaC$) Das T3SS wird assembliert trotz reduzierter HrpF-Sekretion. Die Sekretion von HrpB2 wird bei fehlendem HpaC nicht gestoppt, sodass nach der Assemblierung des T3SS HrpB2 in die Wirtszelle transloziert wird. Die Sekretion der Effektoren ist stark reduziert, da weiterhin das T3S-Chaperon HpaB größtenteils von HpaA blockiert wird. ($\Delta hpaA$) Die Sekretion des Pilusproteins HrpE ist stark reduziert. Das freie T3S-Chaperon HpaB blockiert vermutlich bei fehlendem HpaA das T3SS. Das Translokonprotein HrpF und die Effektoren können nicht sekretiert bzw. transloziert werden. ($\Delta hpaB$) Das T3SS wird assembliert. Die Sekretion von HrpF wird bei fehlendem HpaA nicht gestoppt und nach vollendeter Assemblierung des T3SS in die Wirtszelle transloziert. Die Effektortranslokation ist reduziert.

Der zweite Substratspezifitätswechsel

Der zweite Substratspezifitätswechsel hemmt die Translokosekretion und fördert die Effektortranslokation (Abb. 3). In diesem Wechsel sind vermutlich die Kontrollproteine HpaA und HpaB involviert (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008a). HpaA fördert die Sekretion des Pilusproteins und ist essentiell für die Sekretion der Translokonproteine und die Translokation von Effektorproteinen (Abb. 4) (Weber *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2008a). Zudem konnte gezeigt werden, dass HpaA selber T3-abhängig sekretiert und in die eukaryontische Wirtszelle transloziert wird. Eine Funktion für HpaA als Effektorprotein konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). Die Sekretion und Translokation von HpaA erfolgt HpaB-abhängig. Diese Abhängigkeit beruht vermutlich auf einer HpaB-Bindungsstelle in der C-terminalen Region von HpaA (Lorenz *et al.*, 2008a). Interessanterweise wird HpaA jedoch bei deletierter HpaB-Bindungsstelle weiterhin HpaB-abhängig sekretiert (Lorenz *et al.*, 2008a).

HpaB ist ein kleines Leucin-reiches Protein mit einem sauren isoelektrischen Punkt, was typische Merkmale für T3S-Chaperone sind (Feldman und Cornelis, 2003; Parsot *et al.*,

2003; Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). Protein-Protein-Interaktionsstudien und *in vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass HpaB mit Effektoren interagiert und die Effektorsekretion unterstützt (Büttner *et al.*, 2004). In einer *hpaB*-Deletionsmutante werden die Translokonproteine sekretiert und sogar in die eukaryontische Wirtszelle transloziert (Abb. 4) (Büttner *et al.*, 2004). Die Überexpression von *hpaB* bewirkt wiederum eine Reduktion der Translokon- und Effektorsekretion, ähnlich dem Phänotyp einer *hpaA*-Deletionsmutante (Büttner *et al.*, 2004).

Aufgrund der Daten über HpaA und HpaB existiert das Modell, dass HpaA zunächst das T3S-Chaperon HpaB bindet und damit die Effektorsekretion blockiert. Die Pilus- und Translokonproteine werden sekretiert bis zur vollständigen Assemblierung des T3SS und ein unbekanntes Signal die Sekretion und Translokation von HpaA als ersten Effektor initiiert. Das freie HpaB kann nun seine Aufgabe als T3S-Chaperon nachgehen (Abb.3). (Lorenz *et al.*, 2008a; Büttner, 2012)

Eine mögliche Hierarchie in der Effektortranslokation

Es ist durchaus denkbar, dass nicht nur die Sekretion der Komponenten des T3SS einer Hierarchie folgt, sondern auch nach der vollständigen Assemblierung des T3SS die Translokation der Effektoren kontrolliert wird. Hinweise diesbezüglich zeigen experimentelle Daten von pflanzenpathogenen und tierpathogenen Bakterien (Büttner *et al.*, 2006; Lara-Tejero *et al.*, 2011).

So erfolgt in *Xcv* die Einteilung der Effektoren in Klasse A und Klasse B (Büttner *et al.*, 2006). Die Effektoren der Klasse A werden HpaB-abhängig transloziert. Zugleich unterstützt HpaC deren Translokation. Die Klasse B-Effektoren werden HpaB- und HpaC-unabhängig transloziert. Interessanterweise interagieren die Effektoren beider Klassen mit HpaB und HpaC (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). Es ist bisher unbekannt, wie HpaB und HpaC zwischen den Klasse A- und B-Effektoren unterscheiden, noch welche als erstes transloziert werden (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006).

Womöglich erfolgt die Differenzierung der Effektoren über die zur Verfügung stehenden Substratbindungsstellen des T3SS. HpaB und HpaC bilden Komplexe mit den Effektoren und interagieren mit der zytoplasmatischen Domäne von HrcV (HrcV_C) (Büttner *et al.*, 2006; Hartmann und Büttner, 2013) oder den Komponenten der Substrat-Sortierungsplattform bestehend aus den Proteinen SctK, SctQ und SctL (Lara-Tejero *et al.*, 2011; Lorenz *et al.*, 2012). In *Xcv* konnte HrcQ (SctQ) nur bezüglich seiner Interaktion zu HpaC, sowie frühe (HrpB2) und späte Substrate (Effektoren) positiv getestet werden (Lorenz *et al.*, 2012). Eine Interaktion zwischen HrcQ und HpaB war bisher nicht nachweisbar (Lorenz *et al.*, 2012).

In tierpathogenen Bakterien wurde die Substrat-Sortierungsplattform zum Beispiel in *Salmonella* Thyphimurium ausführlich analysiert (Lara-Tejero *et al.*, 2011). Die Ergebnisse

zeigen, dass die T3SS-assoziierten Chaperone essentiell sind für Interaktion der Effektoren mit der Substrat-Sortierungsplattform. Daher existiert das Modell, dass unterschiedliche Affinitäten der Effektor-Chaperon-Komplexe zur Substrat-Sortierungsplattform eine Hierarchie in der Effektorsekretion festlegen könnten (Lara-Tejero *et al.*, 2011).

1.4. Die Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der T3SS-assoziierten Proteine HrcS, HrpB7 und HpaA von *Xcv*.

HrcS zeigt zu Vertretern der YscS-Proteinfamilie eine hohe Sequenzähnlichkeit (YscS, 57 %). Die Vertreter der YscS-Proteinfamilie sind Transmembranproteine und ein wesentlicher Bestandteil des Exportapparates im T3SS. Topologiestudien zeigten, dass das Protein HrcS vermutlich eine Transmembrandomäne besitzt, welche von einer N-terminalen zytoplasmatischen und einer C-terminalen periplasmatischen Domäne flankiert wird (Berger *et al.*, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die C-terminale periplasmatische Region von HrcS hinsichtlich ihrer Proteinfunktion analysiert werden. Zur Lokalisierung von HrcS im T3SS sollten Fraktionierungsstudien und *in vitro*-Interaktionsstudien mit HrcS durchgeführt werden.

Neben HrcS sollte in dieser Arbeit auch HrpB7 näher charakterisiert werden. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine *hrpB7*-Deletionsmutante nicht pathogen ist und keine T3S-Pili aufbaut (Weber *et al.*, 2005). Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung essentieller Sequenzmotive in HrpB7, welche für die Funktion des Proteins entscheidend sind. Aus den bioinformatischen Analysen sollten HrpB7-Derivate erstellt und mittels Infektions- und *in vitro*-Sekretionsstudien funktional analysiert werden. Lokalisierungsstudien und *in vitro*-Interaktionsstudien sollten weitere Hinweise auf die mögliche Funktion von HrpB7 in der T3S geben.

Ein weiteres Thema dieser Arbeit war das Kontrollprotein HpaA von *Xcv*. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die N-terminalen Aminosäuren 1-25 von HpaA für die T3-Effektorsekretion essentiell sind, während die C-terminalen Aminosäuren 225-275, welche zugleich als HpaB-Bindungsstelle identifiziert wurden, für die Sekretion der extrazellulären Komponenten des T3SS entscheidend sind (Lorenz *et al.*, 2008a). Im Fokus dieser Arbeit lag die Untersuchung weiterer essentieller Regionen und Sequenzmotive in HpaA und deren Beteiligung an der Kontrolle des zweiten Substratspezifitätswechsels.

Durch *in vitro*-Interaktionsstudien sollten weitere Interaktionspartner von HpaA identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Medien, Antibiotika, Bakterienstämme

2.1.1. Medien

Tabelle 3: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung		
LB	<i>lysogenic broth</i>	(Miller, 1972)	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; pH 7,5
NYG	<i>nutrient-yeast-glycerol</i>	(Daniels <i>et al.</i> , 1984)	0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,3 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 2% (w/v) Glycerin; pH 7,2
MA	Minimalmedium A	(Ausubel, 1996)	60 mM K ₂ HPO ₄ ; 33 mM KH ₂ PO ₄ ; 7,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1,7 mM Natriumacetat; 10 mM Saccharose; 0,3 % (w/v) Casamino-säuren; 1 mM MgSO ₄ ; pH 7,0 oder 5,3

Alle Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert (Tabelle 3). *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme wurden in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung der *Xcv*-Stämme erfolgte in NYG-Medium oder MA-Medium bei 30 °C. Unter Zugabe von 1,5 % (w/v) Agarose bzw. 1 % (w/v) Agarose bei der triparentalen Konjugation (Kapitel 2.2.7) wurden die Medien zur Herstellung von Nährplatten verwendet. Zur selektiven Kultivierung der Bakterien wurden die Medien mit entsprechenden Antibiotika (Kapitel 2.1.3) versetzt.

2.1.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	
TFBI	30 mM KOAc; 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM RbCl, pH 5,8, steril filtriert; 10 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin
TFBII	10 mM NaMops, pH 7; 75 mM CaCl ₂ , steril filtriert; 10 mM RbCl; 15 % Glycerin
DNA-Analysen	
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0
10 x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) Gelatine
5 x DNA-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) SDS (Sodiumdodecylsulfat); 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Proteinanalysen	
2 x Laemmli-Puffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
1 x TBST-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
1 x Tank-Puffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver; 3 % (w/v) BSA-Albumin Fraktion V in 1 x TBST
p-Cumarsäure	29,6 mg in 2 ml DMSO
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	88 mg in 2 ml DMSO
Detektionslösung/ECL-Lösung	100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,5 % (v/v) Luminol; 0,25 % (v/v) p-Cumarsäure; 0,116 % (v/v) H ₂ O ₂
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250; 30 % (v/v) Methanol; 6 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
1 x PBS-Puffer	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ Dihydrat; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Reduziertes Glutathion	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM reduziertes Glutathion
Aufschlusspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 10 % Glycerin; 0,05 % (v/v) Tween-20
Puffer B	100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 250 mM NaCl; 10 % Glycerin; 0,05 % (v/v) Tween-20
MST-Messpuffer	1 x PBS, pH 7; 0,05 % (v/v) Tween-20

2.1.3. Verwendete Antibiotika

Die Nähragarplatten und Flüssigmedien enthielten für das selektive Wachstum der Bakterien verschiedene Antibiotika. Die Antibiotika und verwendeten Endkonzentrationen sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.

Medienzusätze	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml (Nährplatten) 50 µg/ml (Flüssigkultur)
Gentamicin (Gent)	15 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	10 µg/ml

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid)	0,004% (w/v)
--	--------------

2.1.4. Verwendete Antikörper

Die Immundetektion Epitop-markierter, mit einem Tag versehene oder nicht markierter Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot Verfahren. Die Antikörper wurden in 1 x TBST verdünnt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Endkonzentration
Primäre Antikörper	
Anti-c-Myc (A-14; Santa Cruz)	1 μ g/ml
Anti-c-Myc (Roche Applied Science)	0,2 ng/ μ l
Anti-GST (Amersham Pharmacia Biotech)	0,5 μ g/ml
Anti-His (Qiagen GmbH)	0,1 ng/ μ l
Anti-HrpB7	Nicht bestimmt (1:500 verwendet)
Anti-HrpF (Büttner <i>et al.</i> , 2002)	Nicht bestimmt (1:3000 verwendet)
Anti-HrpB1 (Rossier <i>et al.</i> , 1999)	Nicht bestimmt (1:2000 verwendet)
Anti-HrpB2 (Rossier <i>et al.</i> , 1999)	Nicht bestimmt (1:1000 verwendet)
Anti-HrcJ (Rossier <i>et al.</i> , 2000)	Nicht bestimmt (1:4000 verwendet)
Anti-HrcN (Rossier <i>et al.</i> , 2000)	Nicht bestimmt (1:500 verwendet)
Anti-AvrBs3 (Knoop <i>et al.</i> , 1991)	Nicht bestimmt (1:10.000 verwendet)
Sekundäre Antikörper	
Anti-Maus (GE Healthcare)	1:10.000 verwendet
Anti-Kaninchen (GE Healthcare)	1:10.000 verwendet
Anti-Ziege (Sigma Aldrich)	1:10.000 verwendet

2.1.5. Verwendete Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der Tabelle 7 aufgelisteten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
OneShot® Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HB101	Helferstamm für die Konjugation. pRK2013 trägt die <i>tra</i> -Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates, Kan ^R	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
Dh5 α (λ pir)	<i>recA hsdR17</i> (rK mK +) ϕ 80/ <i>lacZ</i> M15[λ pir]	(Ménard <i>et al.</i> , 1993)

BI21star(DE3)	<i>r, F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen GmbH
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Paprika-Wildtypstamm (enthält <i>avrBs1</i> jedoch nicht <i>avrBs3</i>), Rif ^R	(Bonas <i>et al.</i> , 1989)
85*	Derivat von 85-10 mit Punktmutation in <i>hrpG</i> (<i>hrpG</i> *). Bedingt konstitutive Aktivierung der <i>hrp</i> -Gene. Rif ^R	(Wengelnic <i>et al.</i> , 1999)
85-10Δ <i>hrcN</i>	Derivat von 85-10, chromosomale Deletion von <i>hrcN</i> , Rif ^R	(Lorenz und Büttner, 2009)
85-10Δ <i>hrcS</i>	Derivat von 85-10, chromosomale Deletion von <i>hrcS</i> , Rif ^R	Diese Arbeit
85*Δ <i>hrcS</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hrcS</i> , Rif ^R	Diese Arbeit
85-10Δ <i>hrpB7</i>	Derivat von 85-10, chromosomale Deletion von <i>hrpB7</i> , Rif ^R	(Drehkopf <i>et al.</i> , 2020)
85*Δ <i>hrpB7</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hrpB7</i> , Rif ^R	(Drehkopf <i>et al.</i> , 2020)
85-10Δ <i>hpaA</i>	Derivat von 85-10, chromosomale Deletion von <i>hpaA</i> , Rif ^R	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
85*Δ <i>hpaA</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hpaA</i> , Rif ^R	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)
85*Δ <i>hpaB</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hpaB</i> , Rif ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
85*Δ <i>hpaC</i>	Derivat von 85*, chromosomale Deletion von <i>hpaC</i> , Rif ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
85*Δ <i>hrp</i>	Derivat von 85*, Deletion des <i>hrp</i> -Genclusters, Rif ^R	(Hausner <i>et al.</i> , 2019)

Str - Streptomycin, Rif - Rifampicin, Kan - Kanamycin, ^r - resistent

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können gezielt DNA-Fragmente amplifiziert und/oder DNA-Abschnitte spezifisch mutiert werden. Dazu werden spezifische Oligonukleotide und hitzestabile DNA-Polymerasen benötigt. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten (FlexCycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Kolonie-PCR an *E. coli* oder *Xcv* erfolgte durch Zugabe von Bakterienzellen mit der Pipettenspitze, ohne vorhergehende DNA-Isolation, direkt in dem Reaktionsansatz mit der *taq*-Polymerase (DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*) und den spezifischen Oligonukleotiden.

Um PCR-Fehler zu minimieren wurde für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten im Klonierungsprozess die *Phusion*-Polymerase (Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) eingesetzt. Über die verwendeten Oligonukleotide wurden gezielt Mutationen oder Deletionen in spezifische DNA-Abschnitte eingebracht.

Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen.

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
taq-PCR			
10 x PCR-Puffer	2 µl	2-4 min	95 °C
2 mM dNTPs	2 µl	30 s	95 °C
10 mM Primer for	1 µl	30 s	57 °C
10 mM Primer rev	1 µl	1 min/kb	72 °C
DMSO	1,4 µl	4 min	72 °C
1 U <i>taq</i> DNA-Polymerase	0,25 µl	∞	10 °C

H ₂ O	12,35 µl		
<i>template</i>			
Phusion-PCR			
5 x GC-Puffer	10 µl	2-4 min	98 °C
2 mM dNTPs	5 µl	15 s	98 °C
10 mM Primer for	2,5 µl	15 s	57 °C
10 mM Primer rev	2,5 µl	30 s/kb	72 °C
1 U <i>Phu</i> -Polymerase	0,8 µl	4 min	72 °C
H ₂ O	28,4 µl	∞	4 °C
<i>template</i>			

2.2.2. „Golden-Gate“-Klonierung

Die *Golden-Gate*-Klonierung bietet die Möglichkeit in einem Schritt bis zu neun DNA-Fragmente in einem Zielvektor gerichtet zu transferieren (Engler *et al.*, 2008). Dazu werden Gen und Zielvektor mit Typ IIs-Restriktionsschnittstellen (*Bsal*, *Bpil* oder *Esp3I*) versehen. Typ IIs-Restriktionsenzyme schneiden außerhalb ihrer Erkennungssequenz und generieren einen Überhang von vier Nukleotiden. Diese vier Nukleotide werden so gewählt, dass die Assemblierung der DNA-Fragmente in den Zielvektor gerichtet erfolgt über die Hybridisierung der komplementären Nukleotidüberhänge. Das Prinzip der *Golden-Gate*-Klonierung ist in der Abbildung 4 dargestellt.

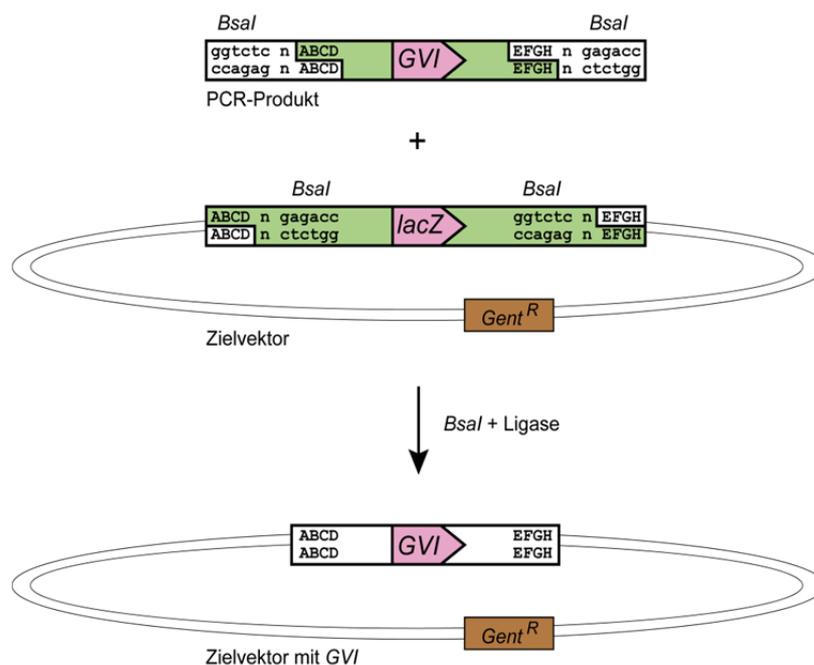


Abb. 5: Das Prinzip der Golden-Gate-Klonierung.

Mittels *Phusion*-PCR wurden DNA-Fragmente synthetisiert mit dem Gen von Interesse (GVI) flankiert von der Erkennungssequenz des Typ IIs-Restriktionsenzym *Bsal* mit spezifischen Oligonukleotiden. Die *Golden-Gate*-

Reaktion erfolgt in einem Reaktionsgefäß durch die Zugabe von *Bsal*, der Ligase und dem Zielvektor. Der Zielvektor besitzt das Gen *lacZα*, welches ebenfalls von *Bsal*-Erkennungssequenzen flankiert ist. Die Restriktion mit *Bsal* generiert einen Überhang von vier Nukleotiden (ABCD und EFGH sind beliebige Nukleotide), welche so gewählt wurden, dass die Insertion des DNA-Fragmentes in den Zielvektor über die Hybridisierung der komplementären Nukleotidüberhänge gerichtet erfolgt. Das ligierte DNA-Fragment kann von dem Restriktionsenzym nicht mehr aus dem Zielvektor ausgeschnitten werden. Nach erfolgter Restriktion und Ligation mit dem GVI ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich, da das Gen *lacZα* ausgeschnitten wurde. Der Zielvektor trägt für weitere Selektionsschritte zudem eine Antibiotika-Resistenz ($Gent^R$ – Gentamicin-Resistenz).

Tabelle 9: Golden-Gate-Ansatz und Reaktionsbedingungen.

Komponente	Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen	
10 x T4-DNA-Ligasepuffer	1 µl	2 min	37 °C
T4-DNA-Ligase	1 µl	5 min	15 °C
<i>Bsal</i>	1 µl	2 min	37 °C
Zielvektor	100 ng	20 min	65 °C
PCR-Fragment	100 ng	∞	4 °C
H ₂ O	aufgefüllt auf 10 µl		

Das Restriktionsenzym *Bsal* wurde von NEB und die T4-DNA-Ligase von *Thermo Scientific* bezogen. Die *Golden-Gate*-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten (FlexCycler, Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen für die *Golden-Gate*-Reaktion sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

2.2.3. Herstellung kompetenter Zellen und chemische Transformation von *E. coli*

Herstellung kompetenter Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit einem *E. coli*-Stamm (Top10, BI21 star (DE3) oder Dh5αpir) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 mit LB-Medium verdünnt und erneut bei 37 °C angezogen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5. Die *E. coli*-Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem TFBII-Puffer (15 ml auf 50 ml Zellkultur) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit gekühltem TFBII-Puffer (2 ml auf 50 ml Zellkultur) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Chemische Transformation von E. coli

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der „*Golden-Gate*“-Ansatz vollständig zu den kompetenten Zellen

hinzugegeben und dieses Gemisch mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec und sofortiger Inkubation auf Eis für 2 min erfolgte die Aufnahme der Bakterien in 600 bis 800 µl LB-Medium und Inkubation für 1 h bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde auf eine LB-Nähragarplatte ausplattiert, welche ein zur Selektion entsprechendes Antibiotikum enthielt.

2.2.4. Erstellung von Expressionskonstrukten

Die in dieser Arbeit generierten Expressionskonstrukte sind in der Tabelle 16 im Anhang aufgeführt. Für die Erstellung von Konstrukten zur Expression Protein-kodierender Gene wurden die auf pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) basierenden *Golden-Gate*-Vektoren pBRM verwendet. Die DNA-Fragmente *hrcS*, *hrpB7*, *hpaA* und entsprechende Derivate wurden mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide vom Genom des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert. Die Klonierung des DNA-Fragmentes in den Zielvektor erfolgte über *BsaI*-Restriktionsschnittstellen nach dem *Golden-Gate*-Prinzip. Das Fragment wurde direkt vor einer c-Myc-Epitop-kodierenden Sequenz oder einem STOPP-Codon inseriert.

Erstellung von Reporterkonstrukten zur Analyse der HpaA-Translokation

Zur Analyse von Translokationsereignissen wurden verschiedene Domänen des T3S-Substrates HpaA translational an den AvrBs3Δ2-Reporter (Noël *et al.*, 2003) fusioniert. Dazu wurden die DNA-Fragmente der Domänen von HpaA mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide vom Genom des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden von der *BsaI*-Erkennungssequenz flankiert. In einer *Golden-Gate*-Reaktion wurden die PCR-Fragmente in den Zielvektor pBR356 kloniert, dabei wurden die DNA-Fragmente stromaufwärts einer AvrBs3Δ2-kodierenden Sequenz inseriert.

Generierung der Expressionskonstrukte zur Expression von hpaA_{NLS}-Derivaten

Für die Amplifizierung der DNA-Fragmente *hpaA_{NLS1m}* und *hpaA_{NLS2m}* wurden *hpaA*-spezifische Oligonukleotide und als *template* der Vektor pDGW4M*hpaA_{NLS1m}* bzw. pDGW4M*hpaA_{NLS2m}* von C. Lorenz (unpubliziert) verwendet. Das pDGW4M-Konstrukt ist ein GATEWAY-kompatibles pDSK602-Derivat mit vierfacher c-Myc-Epitop kodierender Sequenz. Die Klonierung der DNA-Fragmente in den Zielvektor pBRM bzw. pBR356 erfolgte über *BsaI*-Restriktionsschnittstellen nach dem *Golden-Gate*-Prinzip.

Generierung von Expressionskonstrukten mit phosphorylierten Primern

Die Expressionskonstrukte der pBRM*hrpB7*_{Δ144-154}, pBRM*hrpB7*_{144-154mut}, pBRM*hrpB7*_{Δ81-100} und das Expressionskonstrukt pBR356*hpaA*_{Δ231-240} wurden mit Hilfe von phosphorylierten

Oligonukleotiden erstellt. Als *template* für die PCR wurde pBRM*hrpB7* bzw. pBRM*hpaA* verwendet. Die Reaktion wurde im Thermozykler durchgeführt. Während eines Zyklus wurde das Ausgangsplasmid vollständig repliziert, wobei die phosphorylierten Oligonukleotide, welche die Mutation trugen, mit eingebaut wurden. Im Anschluss wurde ein *DpnI*-Verdau zum Abbau des Ausgangsplasmids (*template*) für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Das synthetisierte, mutierte Plasmid wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase für 2 h bei 16 °C ligiert.

Erstellung von Expressionskonstrukten zur Generierung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Das *hrcS*-DNA-Fragment wurde aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstellen, von pGEX-2TKM kloniert. Stromaufwärts der inserierten *hrcS*-Sequenz ist eine GST-kodierende Sequenz im Zielvektor bereits vorhanden.

Zur Generierung der GST-Fusion von *HrpB7* wurde das *hrpB7*-DNA-Fragment aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde in einer *Golden-Gate*-Reaktion zusammen mit dem pUC57-Derivat, welches den *tac*-Promotor und *gst* flankiert von *BsaI*-Schnittstellen enthielt, in den Zielvektor pBRM-P(Stopp) kloniert.

Erstellung des Expressionskonstruktes zur Proteinexpression von His₆-NusA-HrpB7

Der Zielvektor pGGE10 ist *Golden-Gate*-kompatibel. Das DNA-Fragment *hrpB7* wurde aus dem *Xcv*-Stamm 85-10 mittels PCR amplifiziert und in die *BsaI*-Schnittstellen stromabwärts der His₆-NusA-Epitop-kodierenden Sequenz in den Zielvektor kloniert.

2.2.5. Plasmide und Oligonukleotide

Die im Anhang befindlichen Tabellen 16 und 17 weisen die Plasmide und Oligonukleotide auf, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.2.6. Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Isolierung aus 5 ml *E. coli*-Übernachtskultur erfolgte mittels *GeneJet Plasmid Minipräp Kit* (Fisher Scientific, Germany GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben.

2.2.7. Triparentale Konjugation von *Xcv*

Ein Plasmid wurde von einem *E. coli*-Stamm (Donor) auf einem *Xcv*-Stamm (Rezeptor) mittels triparentaler Konjugation übertragen. Der Donor und der Rezeptor wurden zusammen mit dem *E. coli*-Helferstamm HP101 im Verhältnis von ca. 1:2:1 gemischt und auf einer 1 %-

igen NYG-Platte über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Bakterienmisch in 600 µl NYG-Medium resuspendiert und 200 µl der Bakteriensuspension auf selektive NYG-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.8. Elektroporation von *Xcv*

Mit Hilfe der Elektroporation wurden Plasmide aus der Lösung in einem *Xcv*-Stamm transferiert. Der *Xcv*-Stamm wurde mit einer OD₆₀₀ von 1 zunächst mit eisgekühltem sterilem Wasser dreimal gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 8000 g. Die Zellen wurden in 50 µl 10 %-iger Glycerinlösung resuspendiert. Die *Xcv*-Suspension wurde mit 1-2 µl Plasmid-DNA gemischt und in einer eisgekühlten 2 mm Elektroporationsküvette einen elektrischen Puls gegeben und transformiert (*Electro Pulser*, BioRad GmbH, München). Anschließend wurden 600 µl NYG-Medium zugegeben und für 2 h bei 30 °C inkubiert. 200 µl der Bakterienlösung wurden auf NYG-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.9. Deletionsmutagenese von *Xcv*

Zur Erstellung von *Xcv*-Deletionsmutanten wurde das „*Golden-Gate*“-kompatible pOK1-Derivat pOGG2 verwendet (Schulze *et al.*, 2012). Dieser Vektor besitzt das *lacZ*-Gen, welches von *BsaI*-Restriktionsschnittstellen flankiert ist. Für Selektionszwecke besitzt pOGG2 ein Spectinomycin-Resistenzgen und das Gen für die Levansucrase SacB aus *Bacillus subtilis* (Pelicic *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde der proteinkodierende Bereich von *hrcS* und *hrpB7* in *Xcv* 85-10 und 85* deletiert. Dazu wurden die 651 bp 5' und 974 bp 3' von *hrcS* bzw. 839 bp 5' und 860 bp 3' von *hrpB7* mittels *Phusion*-PCR amplifiziert. Durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (Kapitel 2.2.5) wurden den DNA-Amplifikaten entsprechende *BsaI*-Schnittstellen angefügt und die Überhänge so gewählt, dass beide Teilfragmente, 5' und 3' des zu deletierenden Gens, zusammen in einer „*Golden-Gate*“-Reaktion in den Suizidvektor pOGG2 kloniert werden konnten. Die pOGG2-Konstrukte wurden in chemisch kompetente Dh5α(λpir)-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.3) und die Transformanten auf LB-Nähragarplatten, die Spectinomycin und X-Gal enthielten, selektiert. Anschließend erfolgte eine Verifizierung der positiven Klone durch Kolonie-PCR sowie die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente. Die resultierenden Plasmide pOGG2:*hrcS* und pOGG2:*hrpB7* wurden mittels triparentaler Konjugation in *Xcv* 85-10 bzw. 85* eingeführt (Kapitel 2.2.7). Die Selektion auf eine erfolgreiche Deletion des Gens basierend auf zwei Rekombinationsereignisse erfolgte nach Huguet *et al.* 1998 (Huguet *et al.*, 1998). Im ersten

Rekombinationsereignis kommt es auf Grund der homologen Sequenzbereiche zwischen dem Deletionskonstrukt und dem Chromosom von *Xcv* zur spezifischen Integration des Suizidplasmids ins Chromosom. Die erhaltenen Transkonjuganden wurden auf NYG-Platten, die Rifampicin, Rifampicin und Spectinomycin bzw. Rifampicin und 5% Saccharose enthielten, angezogen. Kolonien mit erfolgreicher Integration des Suizidplasmids ins Chromosom zeigten auf Grund der *sacB*-Expression eine reduzierte Zellvermehrung auf NYG-Platten mit Rifampicin und 5% Saccharose. 10 Kolonien, welche positiv auf die *sacB*-Expression getestet wurden, wurden gemischt, in 1 ml NYG resuspendiert und in zwei verschiedenen Verdünnungen auf NYG-Platten mit Rifampicin und 5% Saccharose plattiert. Dadurch wird der Selektionsdruck auf das zweite Rekombinationsereignis erhöht. Das Suizidplasmid rekombiniert aus dem Chromosom wieder heraus. Im Idealfall rekombiniert das zu deletierende Gen zusammen mit dem Suizidvektor. Allerdings wird in 50 % der Fälle auch der Ausgangszustand wiederhergestellt. Positive Transkonjuganden wuchsen auf NYG-Platten, die Rifampicin und Rifampicin und 5% Saccharose enthielten nicht aber auf Rifampicin und Spectinomycin. Die jeweilige Deletion als Ergebnis des Doppelrekombinationsereignisses wurde dreimal per PCR mit spezifischen Oligonukletiden überprüft.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Herstellung von Proteinen in *E. coli*

Die Herstellung der GST-markierten und c-Myc-markierten Proteine für die Interaktionsstudien erfolgte in *E. coli* Top 10 oder BL21 (DE3) Star-Zellen. Die *E. coli*-Zellen wurden in 5 ml Flüssig-LB-Medium und Antibiotikum über Nacht bei 37°C vorgezogen. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur von 200 ml Flüssig-LB-Medium und Antibiotikum mit der gesamten 5 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 130 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 wurde die Proteinherstellung in den *E. coli*-Zellen mit 2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden weitere 2 Stunden bei 37°C und 130 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden geerntet durch Zentrifugation 10 min bei 3.200 g und 4°C. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Protein-Extraktion aus *Xcv* wurden die Stämme einen Tag auf NYG-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und anschließend über Nacht in Flüssigkulturen bei 30 °C

angezogen. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Übernachtskulturen am Photometer gemessen und angeglichen. Es wurden 750 µl der Übernachtskulturen geerntet und die Zellen in 30 µl 2 x Laemmli resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min im Wasserbad gekocht und bis zum Auftragen auf ein SDS-Gel bei -20 °C gelagert.

Mit Hilfe einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Es wurden 15 µl von den Protein-Extrakten auf das SDS-Gel geladen.

Die SDS-PAGE wurde in einer vertikalen Apparatur für Mini-Gele (Mighty Small II, Amersham Pharmacia Biotech AB, San Francisco, USA) durchgeführt. Es wurden 4 %-ige Sammelgele und 10 bzw. 15 %-ige Trenngele verwendet (Tab. 10). Als Laufpuffer in der SDS-PAGE diente 1 x Tank. Als Größenstandard wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas GmbH, Deutschland) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 130 V.

Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Komponente	10 %-iges Trenngel	4 %-iges Sammelgel
H ₂ O	11,9 ml	9 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	7,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	3,75 ml
30 % (v/v) Acrylamid	10 ml	2 ml
10 % (w/v) SDS	0,3 ml	0,15 ml
10 % (w/v) APS	0,3 ml	0,15 ml
TEMED	0,012 ml	0,009 ml

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

2.3.3. Immunoblot Analyse (Western-Blot)

Der Western-Blot erfolgte im Transfer-Puffer auf eine Nitrocellulosemembran *Whatman* (Protran®, Schleicher und Schuell GmbH) bei 90 V, 400 mA und 4 °C für 95 Minuten. Um freie Bindungsstellen auf der Oberfläche der geblotteten Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran anschließend für mindestens 30 min in eine Blockierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimal Waschen für 5 min mit 1 x TBST wurde der Primärantikörper zur Inkubation über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1 x TBST gewaschen bevor der Sekundärantikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben wurde. Nach drei Waschschrritten wurde die Membran für eine Minute mit der ECL-Lösung (Tabelle 4) inkubiert, in Folie eingeschlagen und auf einen Film (Kodak, BioMaxx Light Film, Rochester, USA) gelegt. Der Film wurde mit Entwicklerlösung (Kodak) entwickelt und abschließend mittels Fixierlösung (Kodak) fixiert.

2.3.4. Coomassie-Färbung

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Page. Anschließend wurden die SDS-Gele kurz mit *aqua dest.* gespült und für 20 min in die Coomassie-Färbelösung (Tabelle 4) bei leichtem Schütteln gelegt. Die Gele wurden entfärbt mit der Entfärbelösung bis der Hintergrund des Gels farblos war.

2.4. Protein-Analysen: Sekretions- und Interaktionsstudien

2.4.1. *In-vitro* Sekretionsanalysen

Die *in vitro*-Sekretionsanalysen wurden in Anlehnung an Rossier *et al.* 1999 durchgeführt (Rossier *et al.*, 1999). Für die Versuche wurde der 85*-Stamm oder Derivate von diesem verwendet, da hier die *hrp*-Gene konstitutiv exprimiert vorliegen, was auf eine Mutation in *hrpG* (*hrpG**) zurückzuführen ist. Die *Xcv*-Stämme wurden in 4 ml MA-Medium pH 7,0 über Nacht bei 30 °C angezogen. Am nächsten Tag wurden diese *Xcv*-Stämme mit einer End-OD₆₀₀ von 0,2 in 4 ml MA-Medium pH 5,35 (für Sekretionsanalysen mit HpaA 6 ml) transferiert. Zum Medium wurden zusätzlich 10 µg/ml Thiamin (Serva, Heidelberg) sowie 50 mg/ml gereinigtes BSA (New England Biolabs) zugegeben und die Kulturen bei 30 °C in einem Rotator für 2 h (für Sekretionsanalysen mit HpaA 4 h) inkubiert. Anschließend wurden 750 µl von der Kultur pelletiert und als Gesamtzellextrakt in 40 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min gekocht. Der Rest der Zellkultur wurde filtriert (0,45 µm HT Tuffryn-Membran, Acrodisc 25 mm Syringe Filter, Pall GmbH, Dreieich, Deutschland) und in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorfgefäß mit 200 µl Trichloressigsäure gefüllt. Die Proteinfällung wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine für 10 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem (-20°C) 100%-igem Ethanol überdeckt. Die Proben wurden erneut für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und in 25 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min im Wasserbad gekocht. Alle Proben des Gesamtzellextraktes und der sekretierten Proteine wurden anschließend in äquivalenten Proteinmengen auf ein SDS-Gel geladen.

2.4.2. GST-pull down

Der Glutathion-S-transferase (GST)-*pull down* ist eine gängige und schnelle Methode für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* (Büttner *et al.*, 2004; Hartmann und Büttner, 2013; Cherradi *et al.*, 2014). Die Generierung der Zellpellets, in denen die

gewünschten Proteine überexprimiert vorliegen, ist in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die Zellpellets von 50 ml *E. coli*-Zellkulturen wurden in 3 ml 1 x PBS-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit der „*French Pressure Cell Press*“ (SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 800 psi in einer kleinen Zelle (20K, Thermo Electro Corporation). Zur Erhöhung der Effizienz wurde der Zellaufschluss einmal wiederholt. Die Zelltrümmer und unlöslichen Proteine wurden mittels Zentrifugation (10 min, 4 °C, 15 000 rpm) aus der Proteinlösung entfernt. Es wurden in der Regel 600 µl des Zelllysates eingesetzt. In Abhängigkeit von der Proteinstabilität und Expressionsstärke wurde das Volumen neu angepasst. GST oder GST-Fusionsprotein enthaltene *E. coli*-Lysate wurden zu 80 µl Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gegeben und bei 20 °C und 950 rpm für 20 min inkubiert. Freies GST und die GST-Domäne der Fusionsproteine binden an dem Glutathion an der Sepharose-Matrix. Unspezifisch gebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS-Puffer von der Matrix entfernt. Anschließend wurde ein *E. coli*-Lysat, welches einen potentiellen Interaktionspartner mit einer c-Myc-Epitopmarkierung enthielt, auf die Matrix gegeben. Das Gemisch wurde in einem Überkopfschüttler für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde viermal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 60 µl reduziertem Glutathion (Tabelle 4) unter Schütteln (1150 rpm) bei 20 °C für 2 h inkubiert. Reduziertes Glutathion konkurriert mit dem Glutathion der Sepharose-Matrix um die Glutathion-Bindungsstelle an GST und eluiert GST oder das GST-Fusionsprotein mit Interaktor von der Matrix. *E. coli*-Zelllysate (10 µl) des potentiellen Interaktionspartners und die Eluate (20 µl) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

2.4.3. Koimmunopräzipitation

Die *Xcv*-Stämme wurden in 50 ml Minimalmedium (MA) pH 7,0 und 5,35 unter Schütteln bei 30 °C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der Zellkulturen bestimmt und alle Zellkulturen an die Zellkultur mit der niedrigsten optischen Dichte durch die Zugabe von MA-Medium angepasst. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 3200 x g für 25 min und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 x PBS-Puffer mit Proteinaseinhibitor (PIC, *proteinase inhibitor cocktail*, Roche, Mannheim, Deutschland) resuspendiert und mittels „*French Pressure Cell Press*“ (SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 800 psi in einer kleinen Zelle (20K, Thermo Electro Corporation) aufgeschlossen. Um die Membranproteine aus den Zelltrümmern zu lösen wurde 0,1 % Nonidet-P40 (AppliChem) zum Zelllysate gegeben. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert bei 7000 x g und 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde für 1 h mit 20 µl Protein G-Agarose (Roche, Mannheim, Deutschland) bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Mittels

Zentrifugation (700 x g, 90 sec, 4 °C) wurde die Protein G-Agarose mit den unspezifisch gebundenen Proteinen aus der Proteinlösung entfernt. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen (ca. 450 µl) auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. In beiden Aliquots wurden 60 µl Protein G-Agarose hinzugegeben. In einem Aliquot wurden zusätzlich 15 µl Anti-c-Myc-Antikörper (Roche, Sekundärantikörper: Anti-Maus) pipettiert. Die c-Myc-Epitop markierten Proteine im Zelllysate mit ihren Interaktoren interagieren mit Hilfe des Anti-c-Myc-Antikörpers an die Protein G-Agarose. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension bei 8000 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 40 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 5 min im Wasserbad gekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot unter Verwendung des anti-c-Myc-Antikörpers (Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen) und weiteren proteinspezifischen Antikörpern analysiert.

2.4.4. Fraktionierungsanalysen

Die 85*-Stämme wurden in 50 ml MA-Medium pH 7,0 und 5,35 unter Schütteln bei 30 °C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden von den Zellkulturen die Zelldichten OD₆₀₀ gemessen und alle Zelldichten durch die Zugabe von MA-Medium aneinander angeglichen. Die Zellkulturen wurden zentrifugiert bei 3200 x g und 4 °C für 25 min. Die Resuspension der Zellpellets erfolgte in 2 ml 100 mM HEPES-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mittels der „French Pressure Cell Press“ aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden zentrifugiert bei 8.000 x g und 4 °C für 5 min. Von den Überständen wurde die optische Dichte OD₆₀₀ gemessen und alle Proben durch Zugabe von HEPES-Puffer aneinander angeglichen. Jeweils 1 ml der Überstände wurde zentrifugiert bei 200.000 x g und 4 °C für 90 min. Der resultierende Überstand war die zytoplasmatische Fraktion. Es wurden 80 µl Überstand mit 20 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet, welches die Membranfraktion darstellte, wurde in 1 ml 100 mM HEPES-Puffer resuspendiert. 80 µl der Membranfraktion wurden mit 20 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben mit Laemmli-Puffer wurden im Wasserbad für 5 min gekocht und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.4.5. Proteinreinigung von His₆-NusA-HrpB7 aus *E. coli*

Der Expressionsvektor pGGE10 hrpB7 (Abschnitt 2.2.4) wurde in chemisch kompetente BL21star(DE3)-Zellen mittels Hitzeschock transformiert (Abschnitt 2.2.3). Mit dem

Transformationsansatz wurde eine 5 ml Vorkultur angesetzt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur zum Animpfen einer 500 ml Hauptkultur verwendet mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1, Kanamycin und 1 % Glucose. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Anschließend erfolgte die Proteinexpression bei Raumtemperatur für 5 h durch die Zugabe von 2 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) zur Hauptkultur. Die Hauptkultur wurde bei 3.200 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 25 ml Aufschlusspuffer (Tabelle 4) gewaschen und erneut zentrifugiert für 20 min. Das Pellet wurde in 10 ml Aufschlusspuffer mit Proteinaseinhibitor (PIC, *proteinase inhibitor cocktail*, Roche, Mannheim, Deutschland) resuspendiert und die Zellen mit drei verschiedenen Methoden aufgeschlossen. Zunächst erfolgte der Zellaufschluss mittels „*French Pressure Cell Press*“. Anschließend wurde ein enzymatischer Zellaufschluss mit 0,1 mg/ml Lysozym für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass nahezu alle Zellen lysiert sind, wurde das Verfahren der Frost-Tau-Lyse angewandt bis das Zelllysate klar und dickflüssig war. Ein anschließender RNA-/DNA-Verdau (RNaseA, DNase I, 0,02 mg/ml) bei Raumtemperatur bis das Zelllysate flüssig war erhöhte die Konzentration an Protein in Lösung. Die Zelltrümmer wurden entfernt mittels Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C für 40 min. Die Proteinreinigung von His₆-NusA-HrpB7 bzw. His₆-NusA aus dem Überstand erfolgte im „*batch*“-Verfahren. Es wurden 3 ml von dem Säulenmaterial His60 Ni Superflow Resin (Clontech) in eine Filtersäule (Qiagen GmbH) gegeben und zunächst zweimal mit 6 ml Aufschlusspuffer mit PIC equilibriert. Im Anschluss wurden 5 ml Zelllysate aufgetragen und die Filtersäule für 1 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die nicht gebundenen Proteine wurden in drei Waschschrritten mit 6 ml Aufschlusspuffer von der „*batch*“-Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit je 12 ml Aufschlusspuffer mit ansteigender Imidazolkonzentration (20 mM bis 600 mM) in fünf Stufen eluiert. Proben (10 µl) der einzelnen Elutionsfraktionen (10 Fraktionen zu je 6 ml) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Elutionsfraktionen, die His₆-NusA-HrpB7 bzw. His₆-NusA enthielten und wenig Fremdprotein, wurden vereinigt, mit einer Amicon NMW50-Einheit (Merck Millipore) konzentriert und über Nacht bei 4 °C mittels Dialyse in Puffer B (Tabelle 4) überführt. Dazu wurden 1-2 ml Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und dieser rotierend über Nacht in ein Becherglas mit 5 l Puffer B gelegt. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung zentrifugiert bei 20.000 x g und 4 °C für 10 min um unlösliches Protein zu entfernen. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte am NanoDrop ND1000 Spektrophotometer (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurth, Deutschland). Die Proteinlösung wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.6. *MicroScale Thermophoresis (MST)*

Mit Hilfe der *MicroScale Thermophoresis (MST)* wurde die Selbstinteraktion von HrpB7 gezeigt und quantifiziert. Die thermophoretischen Messungen erfolgten am Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland). Ein Teil der gereinigten Proteine His₆-NusA-HrpB7 und His₆-NusA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS markiert. Die Fluoreszenzmarkierung von 100 µl einer 2 - 20 µM Proteinlösung erfolgte mittels *Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS* (NanoTemper, München, Deutschland) nach Herstellerangaben. In diesem Schritt erfolgte zugleich eine Umpufferung in dem MST-Messpuffer (1 x PBS-Puffer, pH 7, 0,05 % Tween-20). Die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung wurde überprüft am Monolith NT.115 anhand der Messung der Fluoreszenzintensität. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten von drei unterschiedlichen Verdünnungen der fluoreszenzmarkierten Proteinlösungen gemessen, um die optimale Proteinkonzentration und zugehörige LED-Power (*light emitting diode power*) für die nachfolgenden Messungen zu bestimmen.

Die Messung

Nicht markiertes His₆-NusA-HrpB7 mit variierenden Konzentrationen von 0,061 nM bis 4 µM wurde mit 5 nM des markierten His₆-NusA-HrpB7 bei Raumtemperatur für 5 min in 1 x PBS-Puffer (pH 7) mit 0,05 % Tween-20 inkubiert. Die Proben wurden in Monolith NT.115 Premium Kapillaren geladen. Die Messung erfolgte bei 23 °C, einer LED-Power von 55 % und einer MST-Power von 40 % (entspricht einem Temperaturgradienten von ca. 4 °C). Als Negativkontrolle wurde zusätzlich die Interaktion zwischen fluoreszenzmarkiertem His₆-NusA und nicht markiertem His₆-NusA-HrpB7 gemessen. In dieser Messung wurden 26 nM His₆-NusA und variierende Konzentrationen von 0,0641 nM bis 2,1 µM an His₆-NusA-HrpB7 eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 21 °C, einer LED-Power von 40 % und einer MST-Power von 40 %. Die Messreihen wurden jeweils zweimal wiederholt. Die Datenanalyse wurde in der NanoTemper-Analyse-Software durchgeführt.

2.5. Infektionsversuche mit *Xcv*-Stämmen

2.5.1. Pflanzen und Anzuchtbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendete Paprikapflanze (*Capsicum annuum*) gehört der nahezu isogenen Linien „*Early Californian Wonder*“ (ECW), ECW-10R und ECW-30R an (Minsavage *et al.*, 1990; Kousik und Ritchie, 1998). Das Paprikakultivar ECW-10R trägt das Resistenzgen *Bs1*, ECW-30R-Pflanzen das Resistenzgen *Bs3*, welche die bakteriellen Effektoren AvrBs1 bzw. AvrBs3 erkennen und eine hypersensitive Reaktion (HR) auslösen.

Die Anzucht der Paprikapflanzen erfolgte im Gewächshaus unter Standardbedingungen (65 % relative Luftfeuchte, 16 h Photoperiode, 25 °C) (Bonas *et al.*, 1991). Nach der Infiltration der Pflanzen mit *Xcv*-Stämmen wurden diese in die Phytokammer (Series 101, Percival Scientific, USA) überführt. In der Phytokammer war eine relative Luftfeuchte von 65 %, eine 16/8 h Tag/Nacht-Rhythmus sowie 26 °C Tages- bzw. 22 °C Nachttemperatur vorherrschend.

2.5.2. Infiltration von Bakterien in Paprikapflanzen

Die *Xcv*-Stämme wurden am Vortag auf selektiven NYG-Nähragarplatten ausgestrichen und bei 30 °C angezogen über Nacht. Für das Infektionsexperiment wurden die Bakterien in 1 ml 1 mM MgCl₂ resuspendiert und mittels Spektrophotometer auf eine OD₆₀₀ von 0,1 (entspricht 10⁸ kbE/ml) eingestellt. Die Infiltration der Bakteriensuspensionen erfolgte mit einer 1 ml Einwegspritze ohne Kanüle in die Blattunterseite. Die zu vergleichenden Bakterienstämme wurden in vergleichbare Blattpositionen infiltriert. Die Dokumentation erfolgte fotografisch bei der Hypersensitiven Reaktion (HR) auf den resistenten Pflanzen zwei bis drei Tage, die Krankheitssymptome auf den suszeptiblen Paprikapflanzen sechs bis sieben Tage nach Inokulation. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die entsprechenden Blätter in 70 %-igem Ethanol bei 65 °C noch gebleicht.

2.6. Bioinformatische Analysen

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Zur Berechnung der Sequenzidentitäten von den HrpB7-Homologen innerhalb der *Xanthomonas* spp. wurde der *Alignment-Server* Blast (Altschul *et al.*, 1990) verwendet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

EMBOSS Needle

Zur Berechnung der Sequenzidentitäten von den HrpB7-Homologen und HrcS-Homologen wurde der *Alignment-Server* *EMBOSS Needle* (Chojnacki *et al.*, 2017) verwendet (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

ClustalWS Version 2.1

Jalview ist eine online frei verfügbare Arbeitsplattform mit der multiple Sequenz-*Alignments* ausgeführt werden können (<http://www.jalview.org/>; (Waterhouse *et al.*, 2009). Es wurden die Aminosäuresequenzen homologer Proteine von HrcS bzw. HrpB7 in die Arbeitsplattform eingefügt und das Programm *ClustalWS Version 2.1* (Larkin *et al.*, 2007) als *Alignment-Werkzeug* ausgewählt. Das Sequenz-*Alignment* wurde anschließend noch beschriftet und als *png*-Datei exportiert.

Jpred4

Jpred4 ist ein frei verfügbarer Server, der die Sekundärstruktur von Proteinen anhand deren Aminosäuresequenz vorhersagt (Drozdetskiy *et al.*, 2015). In dieser Arbeit wurde das Programm verwendet um die Sekundärstruktur von HrpB7 vorherzusagen.

SWISS-MODEL

Mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers (Arnold *et al.*, 2006) wurde anhand der Aminosäuresequenz von HrpB7 ein 3D-Model des Proteins erstellt. SWISS-MODEL ist frei verfügbar über <http://swissmodel.expasy.org>.

PyMOL

Die 3D-Grafiksoftware PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.0.5 Schrödinger, LLC, <http://pymol.org>) wurde zur Darstellung und Bearbeitung des HrpB7-Proteinmodells verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Funktionelle Charakterisierung des Strukturproteins HrcS

HrcS ist auf Grund seiner Sequenzhomologie (Ähnlichkeit zu 57 %) zu YscS vermutlich ein Vertreter der YscS-Proteinfamilie (Berger *et al.*, 2010). Diese werden als ein Bestandteil des Exportapparates im T3SS beschrieben und liegen als transmembrane Proteine lokalisiert in der inneren Membran vor (Fields *et al.*, 1994; Ohnishi *et al.*, 1997; Ghosh, 2004; Diepold und Wagner, 2014). Berger *et al.* konnten 2010 mit Hilfe der PhoA-LacZ α -Reporter-Analysen die Topologie von HrcS entschlüsseln. Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass HrcS vermutlich eine Transmembranhelix besitzt, die N-terminal eine zytoplasmatische und C-terminal eine periplasmatische Domäne aufweist (Abb. 6 B) (Berger *et al.*, 2010). Eine weitere Funktion von HrcS, neben der möglichen Funktion als Strukturprotein im T3SS, ist unbekannt.

3.1.1. *In silico*-Analysen von HrcS: Sequenz-Alignment mit homologen Proteinen

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von HrcS aus *Xcv* und seinen homologen Proteinen aus *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovorum*, *Shigella flexneri* und *Yersinia pestis* zeigte gemeinsame Sequenzmotive des konservierten Proteins (Abb. 6). In der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne von HrcS ist vermutlich das hydrophobe Sequenzmotiv A₁₃-(X)₄-L₁₈ konserviert.

Tabelle 11: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten der homologen Proteine zu HrcS aus *Xcv*.

Es wurden Sequenz-Alignments mittels Blast durchgeführt. In der Tabelle sind die Sequenzidentitäten und – Ähnlichkeiten der HrcS-homologen Proteine aus pflanzenpathogenen Bakterien (*R. solanacearum*, *Er. carotovorum*), tierpathogenen Bakterien (*S. flexneri*, *Y. pestis*) und dem flagellären T3SS (*E. coli*).

		Sequenzidentität	Sequenzähnlichkeit
FliQ (<i>E. coli</i>)	AAC36860	24,4 %	53,3 %
HrpU (<i>R. solanacearum</i>)	CAB58246	62,8 %	79,1 %
MopD (<i>Er. carotovorum</i>)	CAA51477	23,3 %	50,0 %
Spa9 (<i>S. flexneri</i>)	BAA02830	28,6 %	48,4 %
YscS (<i>Y. pestis</i>)	AAB72202	36,0 %	57,0 %

Die Transmembrandomäne der homologen Proteine weist überwiegend hydrophobe Aminosäuren auf und endet einheitlich mit einem Glutamin (Q₃₉) (Erhardt *et al.*, 2017). In der periplasmatischen Domäne ist ein weiteres konserviertes Sequenzmotiv (K₅₄-(X)₃-V₅₈-(X)₃-I/L₆₂-(X)₅-W₆₈) lokalisiert. Für das flagelläre T3SS konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation von K₅₄ im HrcS-homologen Protein FliQ die Motilität des Bakteriums inhibiert

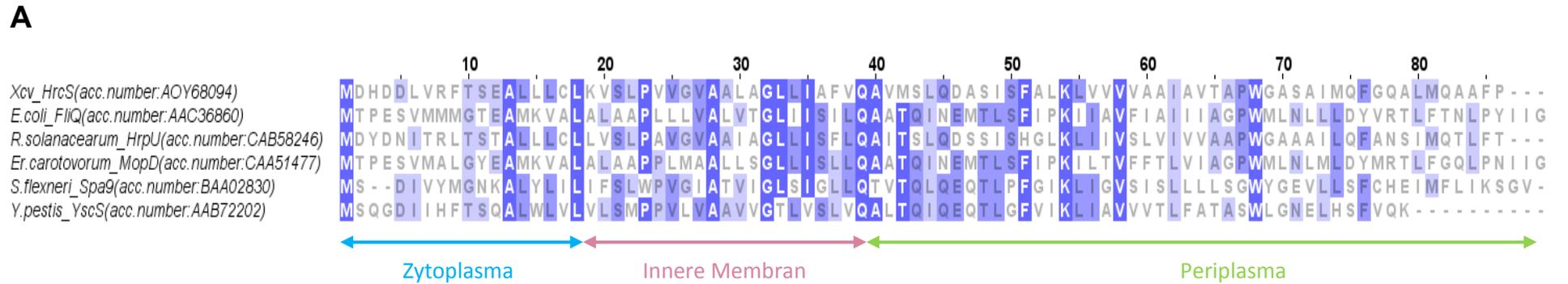
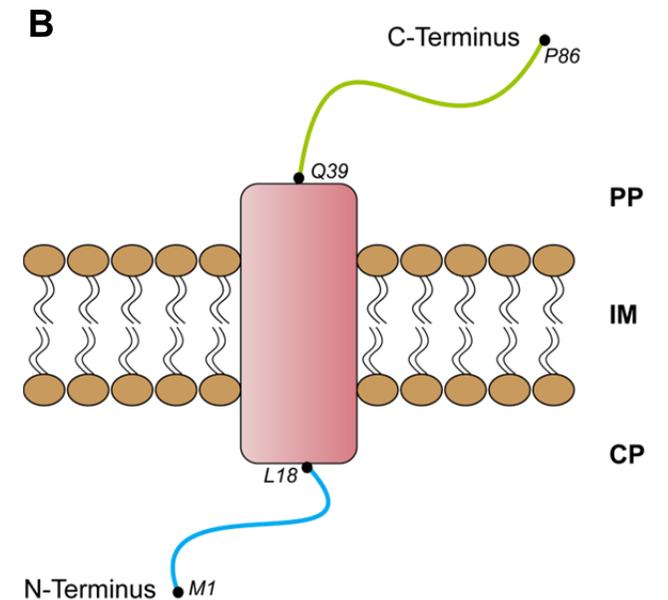


Abb. 6: HrcS-Sequenz-Alignment und Topologie

(A) HrcS ist in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien ein konserviertes Protein. Das Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm ClustalWS Version 2.1 durchgeführt. Dazu wurde HrcS aus *Xcv* verglichen mit dem homologen Protein aus dem flagellären System in *E. coli* FliQ, aus dem T3SS in den pflanzenpathogenen Bakterien *R. solanacearum* HrpU und *Er. carotovorum* MopD sowie aus dem T3SS in den tierpathogenen Bakterien *S. flexneri* Spa9 und *Y. pestis* YscS. In blau bis dunkelblau (skaliert nach der Konservierung, dunkelblau entspricht stark konserviert) sind die konservierten Aminosäuren hervorgehoben. Unter dem Sequenz-Alignment wurde die experimentell bestätigte Topologie nach Berger *et al.* (2010) mit Pfeilen veranschaulicht. (B) Schematische Darstellung der HrcS-Topologie nach Berger *et al.* (2010). Der N-Terminus von HrcS liegt im Zytoplasma (CP) des Bakteriums (blau). HrcS zeigt in den Experimenten nur eine Transmembranhelix (rot). Der C-Terminus von HrcS ist im Periplasma (PP; grün) lokalisiert. IM, innere Membran



(Erhardt *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018). Ein Einfluss der konservierten Aminosäuren und Sequenzmotive auf die Funktion von HrcS in *Xcv* ist noch zu beweisen. Die Sequenzidentitäten von HrcS aus *Xcv* und seinen homologen Proteinen liegen zwischen 23 % wie im Fall von MopD aus *E. carotovorum* und 62 % wie im Fall von HrpU aus *R. solanacearum* (Tab. 11). Die entsprechenden Sequenzähnlichkeiten erstrecken sich von 48 % bis 79 %.

3.1.2. *hrcS* ist essentiell für die Pathogenität und Typ 3-Sekretion von *Xcv*

Die Bedeutung von *hrcS* für die Pathogenität von *Xcv* sollte in *in planta*-Infektionsexperimenten und in *in vitro*-Sekretionsanalysen untersucht werden. Die phänotypischen Analysen erfolgten in den *Xcv*-Wildtypstämmen 85-10 und 85*. Es war bereits bekannt, dass eine *hrcS*-Mutante, in der Codon 44 bis 80 von *hrcS* deletiert sind, nicht pathogen ist (Huguet *et al.*, 1998). Das gleiche Ergebnis wurde für eine vollständige *hrcS*-Deletion erhalten (Abb. 7). Die *hrcS*-Mutante 85* Δ *hrcS* induzierte in Infektionsexperimenten keine Krankheitssymptome auf suszeptiblen „Early Californian Wonder“ (ECW) bzw. keine hypersensitive Reaktion (HR) auf resistenten ECW-10R Paprikapflanzen (Abb. 7). Der Stamm 85* besitzt eine Mutation in *hrpG*. Das daraus resultierende HrpG-Protein ist konstitutiv aktiv und aktiviert die Expression der *hrp*-Gene auch unter nicht-induzierten Bedingungen (Rossier *et al.*, 1999; Wengelnik *et al.*, 1999). Dies ermöglicht die Analyse der T3-abhängigen Sekretion *in vitro*.

Um den Verlust der Pathogenität des *Xcv*-Stammes auf die vollständige Deletion von *hrcS* zurückführen zu können, wurde überprüft, ob durch ektopische Expression von *hrcS-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors der mutante Phänotyp komplementiert wird. Dieses Expressionskonstrukt in den *hrcS*-Deletionsmutanten stellte jedoch nicht in allen Transformanten den Wildtyp-Phänotyp vollständig wieder her (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Expressionskonstrukte aus den Transformanten isoliert und sequenziert. Das Komplementationskonstrukt besaß eine Deletion von 92 Nukleotiden im *lac*-Promotor. Diese Deletion war zufällig im Verlauf der Transformation entstanden und erfolgte aufgrund einer Sequenzwiederholung von 7 Basenpaaren im Abstand von 85 Basenpaaren im *lac*-Promotor (Anhang, Abb. 47). Zur Kontrolle wurden die isolierten Plasmide in den Stamm 85* Δ *hrcS* retransformiert und die Transformanten in Paprikapflanzen infiltriert. Die Infiltration des Stammes 85* Δ *hrcS*, welcher *hrcS-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors ektopisch exprimiert, löste reduzierte Krankheitssymptome in suszeptiblen ECW-Paprikapflanzen aus. Die Expression von *hrcS-c-myc in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors mit der Deletion (Δ *lac*-Promotor) im Stamm 85* Δ *hrcS* stellte den Wildtyp-Phänotypen vollständig wieder her (Abb. 7). Der Verlust der Pathogenität von Stamm 85* Δ *hrcS* ist demnach auf die Deletion von *hrcS* zurückzuführen.

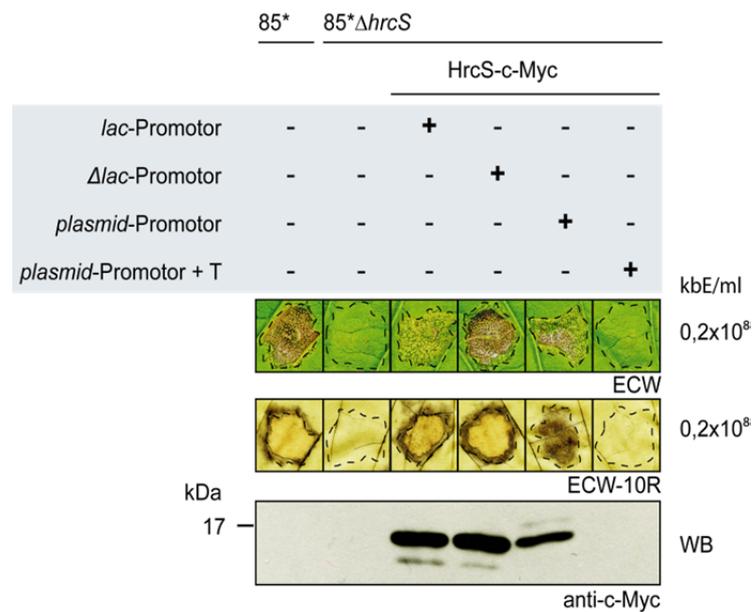


Abb. 7: Phänotypenvergleich der Transformanden bei Verwendung unterschiedlicher Promotoren im Komplementationskonstrukt.

Es wurden die Stämme 85* und 85* $\Delta hrcS$ ohne Konstrukt, sowie 85* $\Delta hrcS$ mit den in Abb. 8 beschriebenen vier unterschiedlichen Expressionskonstrukten in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von $0,2 \times 10^8$ kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6-7 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

lac, *lac*-Promotor; Δlac , Deletion von 92 Nukleotiden im *lac*-Promotor; *plasmid*, unbekannter Promotor im Expressionsvektor; T, vor dem Gen eingebauter *rnbT1*-Terminator aus *E. coli*

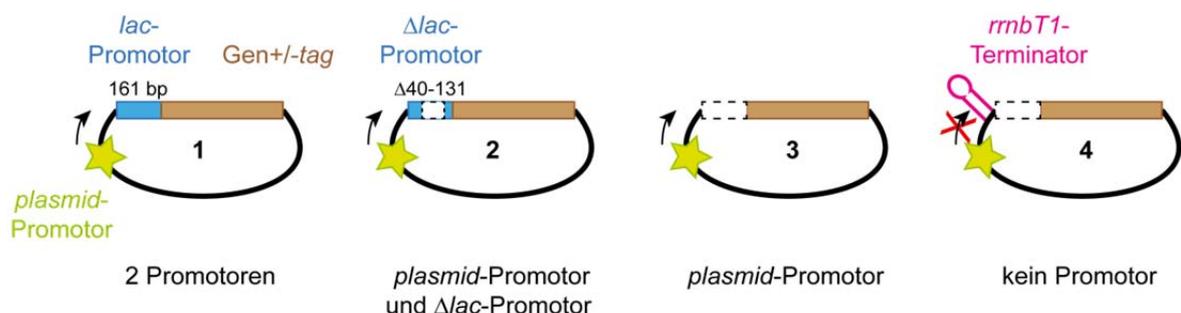


Abb. 8: Die Konstrukte für die Komplementationsanalysen mit der *hrcS*-Deletionsmutante.

Für die Komplementationsanalyse mit der *hrcS*-Deletionsmutante wurden vier pBRM*hrcS*-Vektoren kloniert, die sich ausschließlich in der Promotorregion unterschieden. Im Vektor 1 sind zwei Promotoren vor dem Gen positioniert. Zum einen der *lac*-Promotor und zum anderen ein unbekannter *plasmid*-Promotor im Vektor. Im Vektor 2 ist der essentielle Bereich für die Ausführung der Funktion als Promotor im *lac*-Promotor deletiert, sodass man hier davon ausgehen kann, dass nur der *plasmid*-Promotor als Promotor des *hrcS*-Gens agiert. Auch im Vektor 3 ist der *plasmid*-Promotor der Promotor des *hrcS*-Gens. Allerdings ist der Abstand zwischen dem Promotor und dem Startcodon um 69 Nukleotide kürzer als im Vektor 2. Der Vektor 4 ist die Negativkontrolle. Hierbei wurde der *rnbT1*-Terminator aus *E. coli* vor dem Gen kloniert. Der Terminator (T) verhindert die Transkription des *hrcS*-Gens.

Um die Bedeutung des Promotors bei der ektopischen Expression von *hrcS* in der *hrcS*-Deletionsmutante für die Komplementation des mutanten Phänotyps analysieren zu können, wurden zwei weitere pBRM*hrcS*-Vektoren generiert, die zum einen kein *lac*-Promotor und zum anderen einen *rnbT1*-Terminator (T) stromaufwärts des *hrcS*-Gens besaßen (Abb. 8). Die generierten Vektoren wurden in 85* Δ *hrcS* transformiert und zusammen mit 85* und 85* Δ *hrcS* in susceptible und resistente ECW-Paprikapflanzen infiltriert (Abb. 7). Das Experiment zeigte, dass die ektopische Expression von *hrcS-c-myc* unter der Kontrolle des *plasmid*-Promotors den Phänotyp der *hrcS*-Mutante nur partiell komplementierte. Die Negativkontrolle 85* Δ *hrcS*, die den pBRM-Vektor mit dem eingebauten *rnbT1*-Terminator stromaufwärts vom *hrcS*-Gen besaß, löste wie erwartet keine makroskopischen Reaktionen auf den Blättern der Paprikapflanzen aus. Der Vergleich der synthetisierten Proteinmengen an HrcS-c-Myc in den vier *Xcv*-Stämmen zeigte keinen detektierbaren Unterschied im Fall der Expression von *hrcS-c-myc in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und des Δ *lac*-Promotors, während die resultierende Proteinmenge an HrcS-c-Myc im Fall des *plasmid*-Promotors vergleichsweise geringer war. In der Negativkontrolle war kein HrcS-c-Myc nachweisbar (Abb. 7).

Für die weiteren Komplementationsversuche der *hrcS*-Deletionsmutanten wurde in dieser Arbeit der Δ *lac*-Promotor verwendet.

Die Infektionsexperimente mit dem *Xcv*-Wildtypstamm 85-10 und der daraus resultierenden *hrcS*-Deletionsmutante 85-10 Δ *hrcS* zeigten, dass die ektopische Expression von *hrcS-c-myc* und *hrcS* unter der Kontrolle des Δ *lac*-Promotors den Wildtyp-Phänotypen vollständig wiederherstellt (Abb. 9). Der Verlust der Pathogenität vom Stamm 85-10 Δ *hrcS* ist demnach auf die Deletion von *hrcS* zurückzuführen. Die Überexpression von *hrcS-c-myc in trans* unter der Kontrolle des Δ *lac*-Promotors in 85-10 hatte keinen Einfluss auf die Virulenz des Wildtyp-Stammes 85-10. HrcS-c-Myc wurde immunologisch durch einen c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Die Infektionsexperimente mit der *hrcS*-Mutante, bei der *hrcS* vollständig deletiert ist, bestätigten erneut, dass *hrcS* essentiell ist für die Pathogenität von *Xcv* (Huguet *et al.*, 1998). Es wurde eine *hrcS*-Deletionsmutante generiert, deren mutanter Phänotyp mit *hrcS* oder *hrcS-c-myc in trans* unter der Kontrolle des Δ *lac*-Promotors komplementiert wurde. Die Überexpression von *hrcS-c-myc* in 85-10 zeigte keinen Effekt auf die Virulenz des *Xcv*-Stammes.

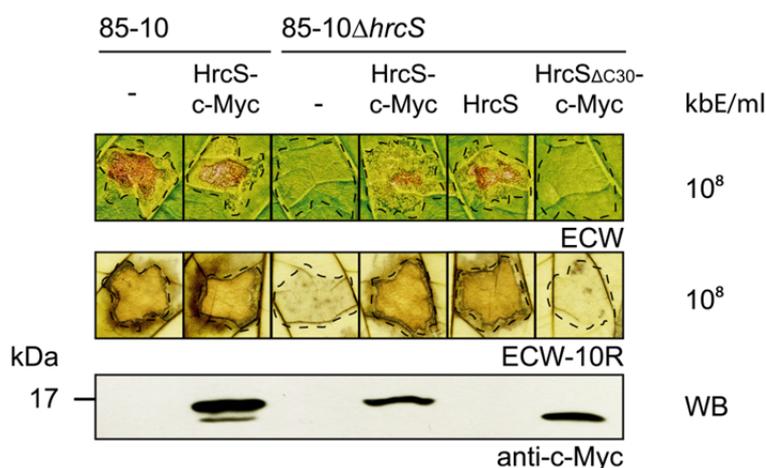


Abb. 9: Komplementationsstudien mit der *hrcS*-Deletionsmutante 85-10 Δ *hrcS*.

Die Stämme 85-10, 85-10 *hrcS-c-myc*, 85-10 Δ *hrcS* sowie 85-10 Δ *hrcS*, welcher ein Plasmid mit *hrcS-c-myc*, *hrcS* oder *hrcS* Δ C30-*c-myc* enthielt, wurden in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von 1×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6-7 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Um die Bedeutung der C-terminalen periplasmatischen Domäne von HrcS für die Proteinfunktion zu analysieren, wurde *hrcS* Δ C30-*c-myc* (HrcS-Deletionsderivat ohne die 30 C-terminalen Aminosäuren) ektopisch in 85-10 Δ *hrcS* exprimiert und auf die Fähigkeit hin untersucht, den Phänotyp der *hrcS*-Deletionsmutante zu komplementieren. Die *hrcS*-Mutante mit *hrcS* Δ C30-*c-myc* *in trans* unter der Kontrolle des Δ *lac*-Promotors zeigte keine makroskopischen Reaktionen auf susceptible oder resistente Paprikapflanzen (Abb. 9). Die fehlende Komplementation durch HrcS Δ C30-*c-Myc* ist nicht auf Proteininstabilität zurückzuführen, wie die erfolgreiche immunologische Detektion des HrcS-Derivates zeigt (Abb. 9).

Um den Einfluss von HrcS auf die T3-abhängige Sekretion zu analysieren, wurden *in vitro*-Sekretionsanalysen mit den Stämmen 85* und 85* Δ *hrcS* durchgeführt. Die erhaltenen Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das c-Myc-Epitop von HrcS, das Translokonprotein HrpF, das putative „inner rod“ Protein HrpB2 und die nicht-sekretierten Proteine HrcJ und HrpB1 (Hausner *et al.*, 2013) analysiert (Abb. 10).

Die Proteine HrpF und HrpB2 wurden erwartungsgemäß vom Wildtyp-Stamm 85* sekretiert (Rossier *et al.*, 2000), waren aber nicht im Kulturüberstand der *hrcS*-Deletionsmutante nachweisbar. Die Sekretionsdefizienz konnte durch die ektopische Expression von *hrcS-c-myc* *in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, des Δ *lac*-Promotors oder des *plasmid*-Promotors, nicht aber von *hrcS* Δ C30-*c-myc* unter der Kontrolle des Δ *lac*-Promotors

komplementiert werden. Das putative Transmembranprotein HrcS-c-Myc war nicht im Kulturüberstand detektierbar und wird daher vermutlich nicht sekretiert.

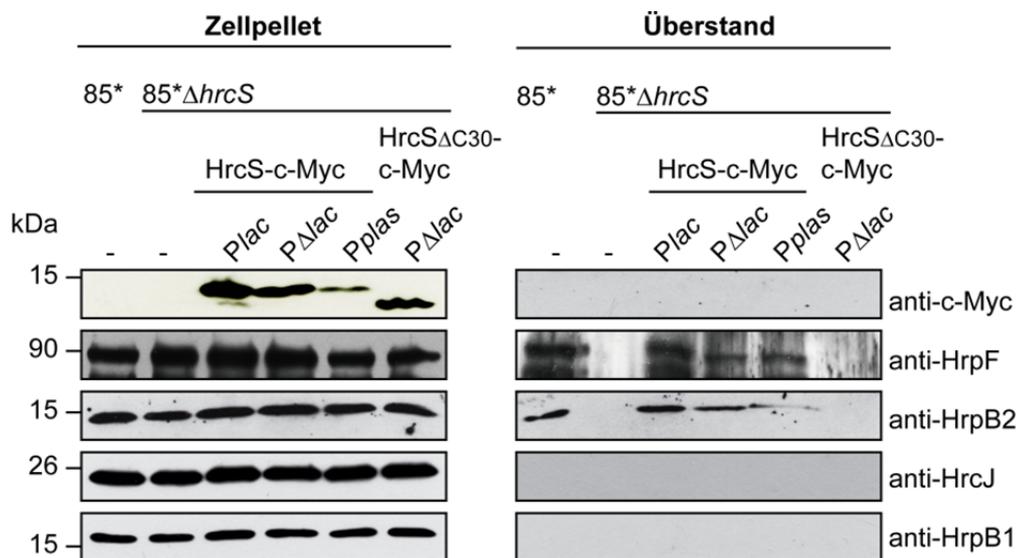


Abb. 10: HrcS ist essentiell für die T3S in *Xcv*.

Es wurden die folgenden Stämme in Sekretionsmedium inkubiert: 85*, 85*ΔhrcS und 85*ΔhrcS, welcher *hrcS-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (P_{lac}), Δlac -Promotors ($P_{\Delta lac}$) bzw. *plasmid*-Promotors (P_{plac}) exprimiert oder *hrcS $\Delta C30$ -c-myc* exprimiert unter der Kontrolle des Δlac -Promotors ($P_{\Delta lac}$). Die Gesamtzellextrakte (Zellpellet) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Das Experiment wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Die *in vitro*-Sekretionsanalysen deuten darauf hin, dass HrcS essentiell ist für die T3S-abhängige Sekretion der T3S-Substrate. Insbesondere die periplasmatische Domäne von HrcS besitzt eine essentielle Bedeutung für die Funktion des Proteins.

3.1.3. HrcS ist in der Membran lokalisiert

HrcS-homologe Proteine, wie FliQ aus dem flagellären T3SS in *Salmonella* Typhimurium, sind membranlokalisiert. Bislang wurde noch kein Fraktionierungsassay für HrcS aus *Xcv* beschrieben, obwohl die erfolgreiche Durchführung der PhoA-LacZ α -Reporter-Analysen von Berger *et al.* 2010 bereits auf eine Membranlokalisation von HrcS in *Xcv* schließen lassen. Für die Lokalisierungsstudien von HrcS wurden in dieser Arbeit Fraktionierungsanalysen an *Xcv* durchgeführt. Als Kontrolle für den erfolgreichen Verlauf des Experimentes wurde HrcN in den Fraktionierungsanalysen mit einbezogen (Lorenz und Büttner, 2009). Für die Detektion von HrcN konnte ein HrcN-spezifischer Antikörper verwendet werden (Rossier *et al.*, 2000).

Der *Xcv*-Stamm 85*, welcher *hrcS-c-myc* ektopisch exprimiert wurde, wurde in ein T3SS-inaktivierendes bzw. aktivierendes Medium inkubiert. Anschließend wurden die Lysate

mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels Western-Blot (Abb. 11).

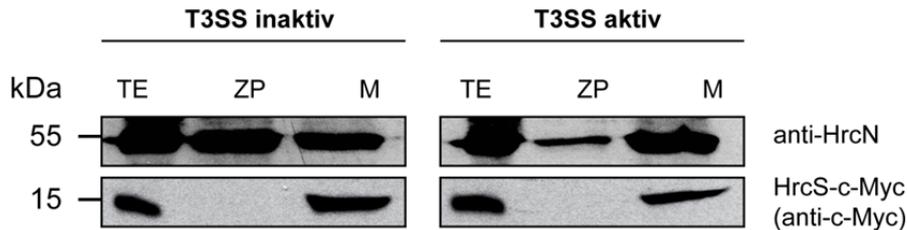


Abb. 11: HrcS ist in der Membran lokalisiert.

Die Stämme 85* und 85*, welcher *hrcS-c-myc* ektopisch exprimierte, wurden über Nacht in zwei unterschiedlichen MA-Medien, zum einen mit pH 7.0, wo das T3SS inaktiv ist, und zum anderen mit pH 5.3 und den Additiven BSA und Thiamin, wo das T3SS aktiv ist, inkubiert. Die Zellen beider Kulturen wurden am nächsten Tag mit einer French Press lysiert. Die Lysate (TE, Totalextrakt) wurden mittels Ultrazentrifugation fraktioniert in Pellet (M, Membranfraktion) und Überstand (ZP, zytoplasmatische Fraktion). Proben der Fraktionen und des vorangegangenen Gesamtzellextraktes wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung der spezifischen Antikörper analysiert. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert.

Das Protein HrcN konnte, wie bereits von Lorenz *et al.* 2009 gezeigt, nach Aktivierung des T3SS vermehrt in der Membranfraktion detektiert werden. HrcS-c-Myc wurde in der Membranfraktion detektiert unabhängig von der Aktivität des T3SS. Die Fraktionierungsanalysen bestätigen die Hypothese, dass HrcS in der Membran lokalisiert ist.

3.1.4. Identifizierung möglicher HrcS-Interaktoren mittels *GST-pull down* Analysen *in vitro* und Koimmunopräzipitation *in vivo*

HrcS ist für die Sekretion von T3S-Substraten essentiell (siehe Abschnitt 3.1.2). In Protein-Protein-Interaktionsstudien sollte untersucht werden, inwieweit HrcS mit T3-abhängig sekretierten Proteinen oder anderen essentiellen Komponenten des T3SS interagiert. Als potentielle HrcS-Interaktoren wurden Komponenten des Exportapparates (HrcU und HrcV), periplasmatische (HrpB1 und HrpB2) und zytoplasmatische (HrcQ, HrcN, HrcL, HrpB7) Komponenten des T3SS, Kontrollproteine (HpaA, HpaB und HpaC) sowie Effektoren (XopJ und XopF1) getestet.

Hierfür wurden *GST-pull down* Analysen durchgeführt, bei denen ein Interaktionspartner mit einem *GST-tag* an Glutathion-Sepharose immobilisiert ist und mit einem *E. coli*-Lysat, welches den zweiten Interaktionspartner enthält, inkubiert wird.

Zunächst wurden die potentiellen Interaktoren als GST-Fusionsproteine über ihr *GST-tag* an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches C-terminal c-Myc-Epitop-markiertes HrcS enthielt (Abb. 12 A). HrcS-c-Myc coeluierte mit den GST-Fusionsproteinen HrcV, HrpB1, HrcN, HrcL, HrpB7, den Kontrollproteinen und Effektoren. In

weiteren GST-pull down Analysen unter Verwendung von GST-HrcS konnte eine mögliche Interaktion zu HpaA, HpaB und HrcL reproduziert werden (Abb. 12 B).

Zusammenfassend deuten die GST-pull down Analysen darauf hin, dass HrcS mit den Proteinen HpaA, HpaB, HpaC, HrcN, HrcL, HrcV, HrpB7, HrpB1 und den Effektorproteinen XopF1 und XopJ interagiert. Es war keine Interaktion von HrcS mit sich selbst und zwischen HrcS und HrcQ bzw. HrcU nachweisbar. Eine mögliche Interaktion zwischen HrcS und HrpB2 war nicht eindeutig nachweisbar. Die Interaktion von HrcS mit HpaC, HrcV, XopJ und XopF1 konnte bei den GST-pull down Analysen unter Verwendung des N-terminal GST-tag-markierten HrcS nicht bestätigt werden, da vermutlich die Interaktion durch das große N-terminale tag GST sterisch verhindert wird. Die Analyse der Interaktion von HrcS und HrcR, HrcT sowie der zytoplasmatischen Domäne von HrcU steht noch aus. Die Interaktion zwischen HrcS und dem putativen „inner rod“-Protein HrpB1 sollte genauer betrachtet werden, da diese Interaktion womöglich der Verbindungsanker zwischen Exportapparat und Basalapparat sein könnte.

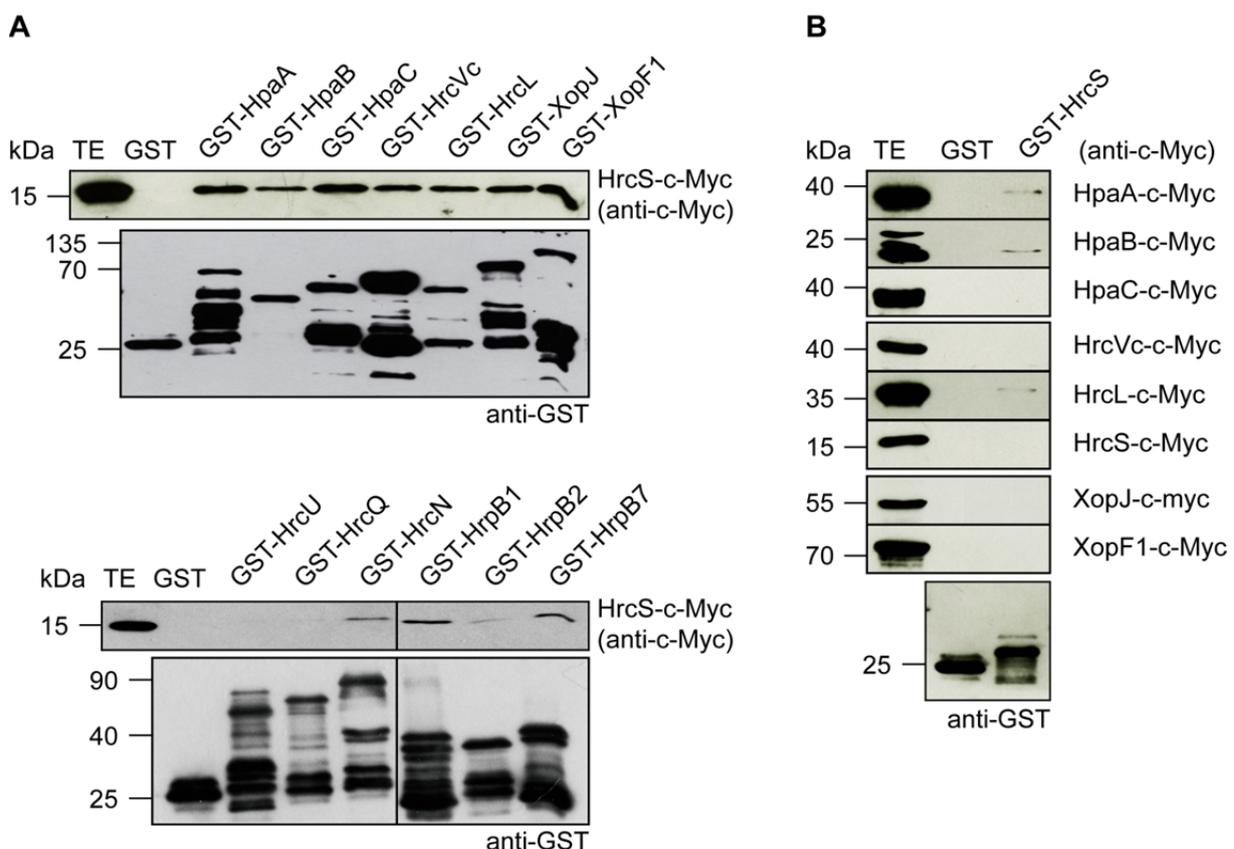


Abb. 12: HrcS interagiert mit verschiedenen Komponenten des T3SS.

(A) GST-pull down Analysen mit HrcS-c-Myc. Die GST-Fusionsproteine und GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat, welches HrcS-c-Myc enthielt, inkubiert. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließend Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert. (B) GST-pull down Analysen mit GST-HrcS. GST-HrcS und GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten, welches HpaA-c-Myc, HpaB-c-Myc, HpaC-c-Myc, HrcVc-c-Myc (zytoplasmatische Domäne

von HrcV), HrcL-c-Myc, HrcS-c-Myc, XopJ-c-Myc bzw. XopF1-c-Myc enthielt, inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte wie unter (A) beschrieben. Die Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

Zusätzlich zu GST-*pull down* Analysen wurde eine mögliche Interaktion von HrcS mit HrpB1 mittels Koimmunopräzipitation *in vivo* überprüft. Dazu wurden die *Xcv*-Stämme 85*, in dem die T3SS-Gene konstitutiv exprimiert sind, die *hrpB1*-Mutante (85* Δ *hrpB1*) als Negativkontrolle und die *hrpB2*-Mutante (85* Δ *hrpB2*) zur Charakterisierung der HrcS-HrpB1-Interaktion bei Fehlen des zweiten putativen „*inner rod*“-Proteins HrpB2 (Hausner *et al.*, 2013), verwendet. Mangels HrcS-spezifischer Antikörper wurde *hrcS* mit einem C-terminalen *c-myc*-Epitop ektopisch in den *Xcv*-Stämmen exprimiert. Die Bakterien wurden in einem T3SS-induzierenden Medium angezogen, lysiert und HrcS-c-Myc mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper, der an Protein G-Agarose gekoppelt war, immunpräzipitiert. Western-Blot-Analysen zeigten, dass HrpB1 im Präzipitat von HrcS-c-Myc, nicht jedoch in Abwesenheit des c-Myc-spezifischen Antikörpers oder in Abwesenheit von HrpB1 detektierbar war (Abb. 13).

Basierend auf den Ergebnissen der Koimmunopräzipitation kann eine Interaktion zwischen dem Transmembranprotein HrcS und dem putativen „*inner rod*“-Protein HrpB1 in *Xcv* vorhergesagt werden. Die Interaktion wurde im Wildtypstamm 85* und in der *hrpB2*-Mutante nachgewiesen und ist damit unabhängig von dem zweiten putativen „*inner rod*“-Protein HrpB2.

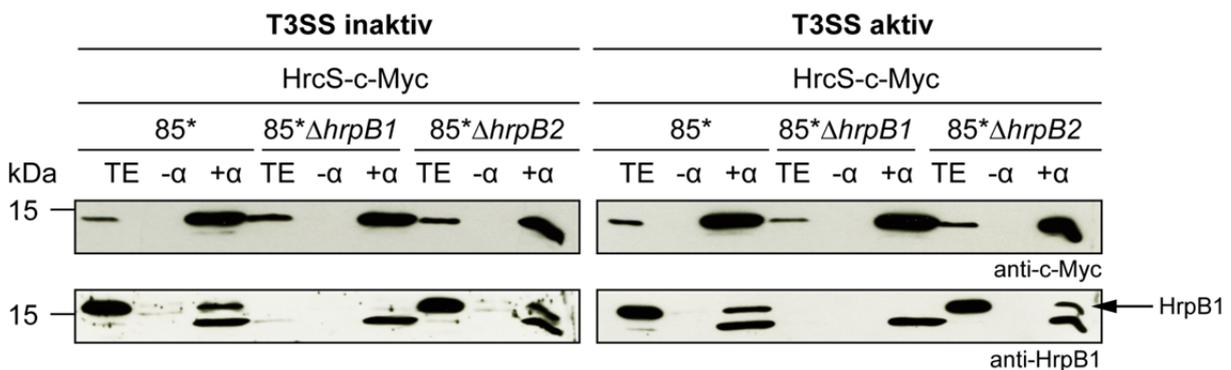


Abb. 13: Koimmunopräzipitationsexperimente mit HrcS-c-Myc und HrpB1.

Es wurden drei *Xcv* Stämme, 85* (WT), 85* Δ *hrpB1* (Negativkontrolle) und 85* Δ *hrpB2* (Deletion der zweiten putativen „*inner rod*“-Komponente), welche *hrcS-c-myc* exprimierten, in T3SS-inaktiven und aktiven Medium angezogen. Die Kulturen wurden anschließend vollständig lysiert. Die eine Hälfte des Zelllysates [TE] wurde mit Protein G-Agarose [-α] und die zweite Hälfte zusätzlich mit c-Myc-Antikörper [+α] inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot unter Verwendung von c-Myc- und HrpB1-spezifische Antikörpern analysiert. Das untere Signal im anti-HrpB1-Blot ist das Signal für HrcS-c-Myc. Das Ergebnis wurde zweimal reproduziert.

3.2. Funktionelle Charakterisierung und Lokalisierung von HrpB7

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass eine *hrpB7*-Mutante, die von Codon 28 bis 125 in *hrpB7* deletiert ist, nicht pathogen ist und keine T3S-Pili aufbaut (Weber *et al.*, 2005). Warum HrpB7 einen solchen Einfluss auf die Ausbildung der T3S-Pili besitzt, wurde bisher nicht weiter untersucht. Lokalisations- und Sekretionsstudien mit HrpB7 und ausgewählter HrpB7-Derivate sollten Hinweise auf die mögliche Funktion des Proteins in der T3S geben.

3.2.1. *In silico*-Analysen von HrpB7

Das *hrpB*-Operon kodiert vier Hrp-Proteine: HrpB1, HrpB2, HrpB4 und HrpB7. Auffällig sind die geringen Sequenzidentitäten der Hrp-Proteine zu den Homologen aus *X. campestris* pv. *campestris* im Vergleich zu den anderen untersuchten *Xanthomonas*-Arten. HrpB7 besitzt von diesen vier Proteinen die geringste Sequenzidentität zu seinen homologen Proteinen innerhalb der *Xanthomonas* spp. (Tab. 12).

Tabelle 12: Sequenzidentitäten aus den Alignments der Hrp-Proteine kodiert im *hrpB*-Operon

Es wurden Sequenz-Alignments mit den Hrp-Proteinen, welche im *hrpB*-Operon kodiert vorliegen, mittels BLAST durchgeführt. In der Tabelle sind die Sequenzidentitäten der homologen Proteine innerhalb der *Xanthomonas* spp. und *R. solanacearum* zusammengefasst. HrpB1 (Xcv: CAJ22058; Xcc: NP_636605; Xoo: AAF61286; Xac: AAM35298; Xag: AOY64638; R.s.: CAB58252), HrpB2 (Xcv: CAJ22059; Xcc: NP_636606; Xoo: AAF61285; Xac: AAM35299; Xag: AOY64637; R.s.: CAB58253); HrpB4 (Xcv: CAJ22061; Xcc: NP_636608; Xoo: AAF61283; Xac: AAM35301; Xag: AOY64635; R.s.: CAB58255); HrpB7 (Xcv: CAJ22064; Xcc: NP_636611; Xoo: AAF61280; Xac: AAM35304; Xag: AOY64632; R.s.: CAB58258)

	<i>Xanthomonas</i> spp.					<i>R. solanacearum</i>
	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	
HrpB1	100 %	84 %	97 %	96 %	96 %	38 %
HrpB2	100 %	71 %	98 %	97 %	97 %	32 %
HrpB4	100 %	68 %	96 %	95 %	95 %	34 %
HrpB7	100 %	67 %	95 %	92 %	92 %	18 %

Um zu untersuchen, ob die vier Hrp-Proteine innerhalb der pflanzenpathogenen Bakterien konserviert sind, wurde als Vertreter das Bakterium *R. solanacearum* für das Sequenz-Alignment ausgewählt. Die Proteine HrpB1, HrpB2 und HrpB4 zeigen eine Sequenzidentität zwischen 32 % und 38 % zu den homologen Proteinen aus *R. solanacearum*. HrpB7 besitzt nur eine Sequenzidentität von 18 %.

In den Sequenz-Alignments fällt auf, dass in den Aminosäuresequenzen von HrpB7 und seinen homologen Proteinen Heptadenmuster (*heptad repeat motifs*) in der N- und C-

terminalen Region lokalisiert sind (Abb. 14 A). In diesem Sequenzmotiv sind die erste und die vierte Aminosäure eines aus sieben Aminosäuren umfassenden Motivs hydrophob, zumeist ein Leucin, während die fünfte und die siebente Aminosäure polar sind. Heptadenmuster sind in *coiled-coil* Strukturen zu finden. In einem *coiled-coil* sind zwei bis fünf α -Helices von demselben Biomolekül stammend oder weitere zu einer linksgedrehten Helix gewunden (Mason und Arndt, 2004). Auffällig ist, dass die Heptadenmuster in der N-terminalen Region von HrpB7 vorwiegend ein Cystein in der vierten Position besitzen. Cysteine an der vierten Position im Heptadenmuster erhöhen die Stabilität der *coiled-coil* Struktur durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den α -Helices (Zhou *et al.*, 1993). Die Cysteine sind innerhalb der *Xanthomonas* spp. konserviert (Abb. 14 A). Die Aminosäuren eines Heptadenmusters werden allgemein als **abcdefg** bezeichnet. Diese allgemeine Bezeichnung diene als Markierung der Heptadenmuster in der Aminosäuresequenz von HrpB7 in der Abb. 14 A. In der C-terminalen Region von HrpB7 ist ein Glutamat-reiches Motiv, das in den *Xanthomonas* spp. und in *R. solanacearum* zu finden ist. Inwieweit diese beiden Sequenzmotive essentiell sind für die Funktion von HrpB7, sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Funktionsanalysen klären.

Es wurde weiterhin ein Sequenz-*Alignment* zwischen HrpB7 aus *Xcv* und homologen Proteinen aus den tierpathogenen Bakterien *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Shigella flexneri* und *Yersinia pestis* durchgeführt (Abb. 14 B). Dazu wurden jeweils die Proteine verwendet, die, wie im Fall von HrpB7 aus *Xcv*, im Genom der tierpathogenen Bakterien stromabwärts der T3SS-ATPase kodiert sind. Diese Proteine werden in der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie zusammengefasst und werden nach der Sct-Nomenklatur als SctO bezeichnet (Tab. 2). Weitere Merkmale dieser Proteine sind, eine *coiled-coil* Struktur und eine geringe Sequenzidentität untereinander (Evans *et al.*, 2006; Gazi *et al.*, 2008; Cherradi *et al.*, 2014).

Die Aminosäuresequenzidentitäten der HrpB7-homologen Proteine zu HrpB7 aus *Xcv* sind unter 25 % (Tab. 13).

Tabelle 13: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten der homologen Proteine zu HrpB7 aus *Xcv*.

Es wurden Sequenz-*Alignments* mittels BLAST durchgeführt. In der Tabelle sind die Sequenzidentitäten und – Ähnlichkeiten der HrpB7-homologen Proteine aus tierpathogenen Bakterien (*E. coli*, *C. trachomatis*, *S. flexneri*, *Y. pestis*) und dem flagellären T3SS (*S. Typhimurium*) zu HrpB7 aus *Xcv*.

		Sequenzidentität	Sequenzähnlichkeit
FliJ (<i>S. Typhimurium</i>)	APF14132	19,2 %	34,1 %
EscO (<i>E. coli</i>)	AMF91845	13,8 %	32,0 %
CT670 (<i>C. trachomatis</i>)	WP_009872042	15,5 %	33,0 %
Spa13 (<i>S. flexneri</i>)	AAP79013	12,0 %	21,0 %
YscO (<i>Y. pestis</i>)	AAB72198	23,5 %	38,5 %

Abb. 14: Sequenz-Alignments von HrpB7 Proteinen aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien.

(A) Sequenz-Alignment von HrpB7 der *Xanthomonas* spp. und *R. solanacearum*. Das Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm ClustalWS Version 2.1 durchgeführt. Es wurde HrpB7 aus *Xcv* mit HrpB7 aus *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), aus *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), aus *X. citri* pv. *citri* (*Xac*) und aus *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) miteinander verglichen. Des Weiteren wurde das potentiell homologe Protein HrpD aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *R. solanacearum* mit in das Sequenz-Alignment mit einbezogen. Die Sequenzidentitäten sind in der Tabelle 12 aufgelistet. In blau bis dunkelblau (skaliert nach der Konservierung, dunkelblau entspricht stark konserviert) sind die konservierten Aminosäuren hervorgehoben. Das Cystein-reiche Sequenzmotiv ist orange und das Glutamat-reiche Motiv ist grün eingerahmt. Das Heptadenmuster ist mit der allgemein gültigen Bezeichnung **abcdefg** markiert, wobei in blau die hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnet sind. (B) Sequenz-Alignment von HrpB7 aus *Xcv* mit homologenen Proteinen aus tierpathogenen Bakterien. Das Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm ClustalWS Version 2.1 durchgeführt. Dazu wurde das homologe Protein aus dem flagellärem System in *S. Typhimurium* FliJ sowie von den T3SS aus den tierpathogenen Bakterien *E. coli* EscO, *C. trachomatis* CT670, *S. flexneri* Spa13 und *Y. pestis* YscO mit HrpB7 aus *Xcv* verglichen. In blau bis dunkelblau (skaliert nach der Konservierung) sind die konservierten Aminosäuren hervorgehoben. Das Glutamat-reiche Motiv ist grün eingerahmt.

Die homologen Proteine besitzen wie HrpB7 in der N- und C-terminalen Region Heptadenmuster (Abb. 14 B; N-terminales Heptadenmuster wurde nicht eingezeichnet, da die Heptadenmuster im *Alignment* nicht an der gleichen Position liegen.). Des Weiteren weisen die homologen Proteine von HrpB7 aus *C. trachomatis* und *Y. pestis* ebenfalls ein Glutamat-reiches Motiv in der C-terminalen Region auf (Abb. 14 B).

Um einen Einblick in die Proteinstruktur von HrpB7 zu bekommen, wurden die Strukturvorhersageprogramme *Jpred4* (Drozdetskiy *et al.*, 2015) und SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) verwendet. Während *Jpred4* die Sekundärstruktur einer gegebenen Aminosäuresequenz voraussagt, erstellt SWISS-MODEL ein 3D-Modell des Proteins (Abb. 15). Beide Vorhersageprogramme beschreiben HrpB7 als ein Protein mit einem hohen Anteil an α -Helices. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die von *Jpred* vorhergesagte Position eines *loops*, welcher in der 3D-Struktur von SWISS-MODEL wieder zu finden ist.

Um zu überprüfen, ob sich HrpB7 und homologe Proteine aus tierpathogenen Bakterien in der Tertiärstruktur ähneln, wurde ein Struktur-Alignment in *PyMol* (Delano, 2002) durchgeführt (Abb. 15 B). Dazu wurden die bereits existierenden Kristallstrukturen der HrpB7-Homologe FliJ aus *S. Typhimurium* und CT670 aus *C. trachomatis* aus der PDB-Datenbank verwendet (Lorenzini *et al.*, 2010; Ibuki *et al.*, 2011). Das Programm *PyMol* berechnete aus dem *Alignment* den *root-mean-square-deviation* (RMSD-Wert), welcher den durchschnittlichen Abstand zwischen den Atomen des Proteinrückgrats in Ångström beschreibt. Je kleiner der RMSD-Wert, desto ähnlicher sind die dreidimensionalen Strukturen. Für das Struktur-Alignment von HrpB7, FliJ und CT670 wurde ein RMSD-Wert für HrpB7 und FliJ von 8,4 Å und für HrpB7 und CT670 von 8,2 Å berechnet. Bei einem Struktur-

Alignment der N- oder C-terminalen Helices der Proteine verringert sich der RMSD-Wert (Tab. 14).

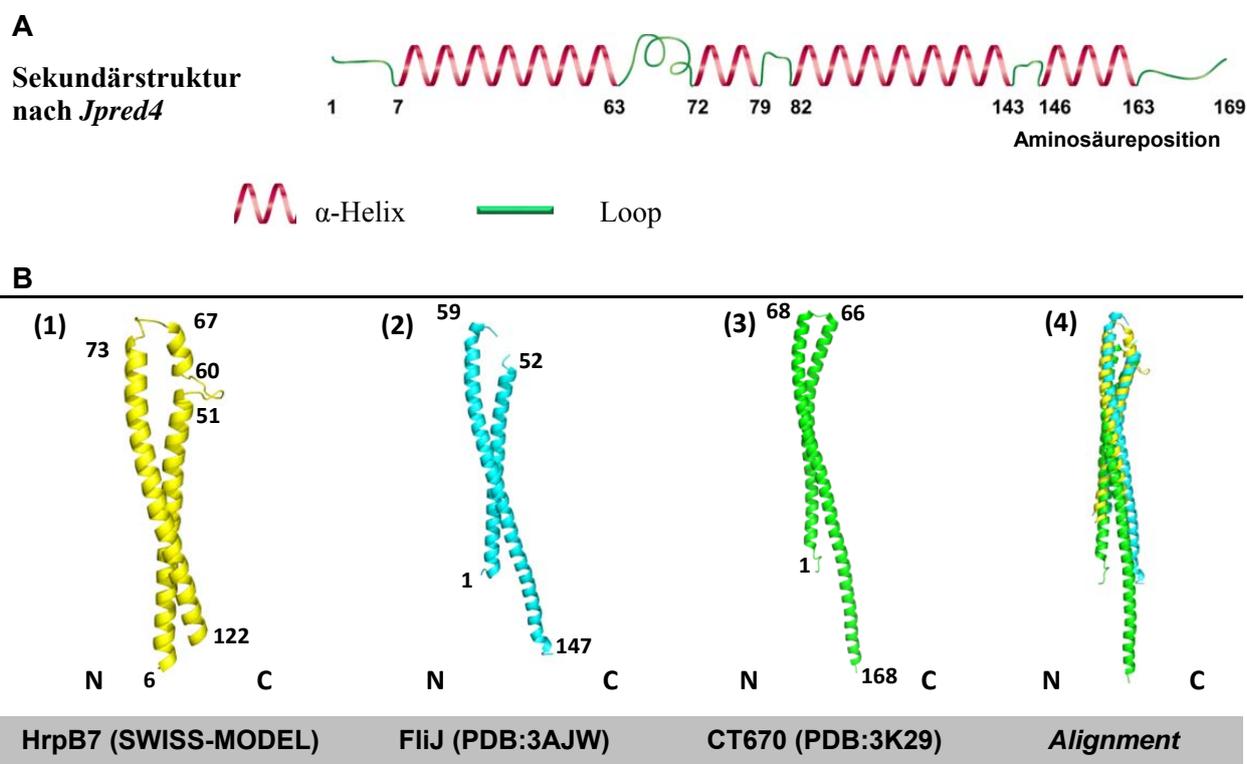


Abb. 15: Vorhersage der Sekundär- und 3D-Struktur von HrpB7 aus *Xcv*.

(A) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von HrpB7 aus *Xcv*. Die Sekundärstruktur von HrpB7 wurde mit dem Programm *Jpred4* berechnet. Anhand der Daten wurde die Abbildung in Adobe Illustrator CS6 erstellt. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. (B) Proteinstrukturmodell von HrpB7. Das 3D-Modell von HrpB7 aus *Xcv* von Aminosäure sechs bis 122 wurde anhand der Aminosäuresequenz mittels Datenbankrecherche von SWISS-MODEL erstellt. Für die restlichen Aminosäuren des 169-Aminosäuren großen Proteins konnte in der Datenbank keine vergleichbare Sequenz mit bekannter Struktur gefunden werden. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte in *PyMol*. In (2) und (3) sind jeweils die Kristallstrukturen der HrpB7-homologen Proteine FliJ (PDB:3AJW) und CT670 (PDB:3K29) dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte in *PyMol*. (4) Struktur-Alignment von HrpB7, FliJ und CT670. Es wurde ein Struktur-Alignment von HrpB7, FliJ und CT670 in *PyMol* durchgeführt. Die RMSD-Werte sind 8,4 Å für HrpB7 und FliJ und 8,2 Å für HrpB7 und CT670.

Tabelle 14: RMSD-Werte der Struktur-Alignments von HrpB7 mit FliJ und CT670.

Es wurde ein Struktur-Alignment mit dem SWISS-MODEL-Modell von HrpB7 und den Kristallstrukturen von FliJ und CT670 in *PyMol* durchgeführt. Zusätzlich wurden die N- bzw. C-terminale Region der Proteine noch einmal in separaten Struktur-Alignments verglichen. Die aus den Alignments erhaltenen RMSD-Werte sind in der Tabelle aufgelistet.

	RMSD-Werte der Struktur-Alignments					
	FliJ (PDB:3AJW)			CT670 (PDB:3K29)		
	vollständiges Protein	N-terminale Region	C-terminale Region	vollständiges Protein	N-terminale Region	C-terminale Region
HrpB7 (Modell)	8,45 Å	0,06 Å	0,56 Å	8,2 Å	1,72 Å	6,83 Å

Der größere RMSD-Wert bei dem Struktur-*Alignment* des gesamten Proteins ist darauf zurückzuführen, dass sich durch die abweichende Länge und Position des *loops* zwischen der N- und C-terminalen Helix der Proteine der Winkel unterscheidet mit dem sich die C-terminale um die N-terminale Helix windet. Die erhaltenen Ergebnisse des Struktur-*Alignments* zeigen eine auffallende Ähnlichkeit der 3D-Strukturen der Proteine, was auf eine Verwandtschaft der Proteine hindeutet.

Die *in silico*-Analysen zeigen, dass die Aminosäuresequenz des Proteins HrpB7 im geringeren Maß konserviert ist innerhalb der *Xanthomonas* spp. und der pflanzenpathogenen Bakterien im Vergleich zu den anderen Hrp-Proteinen, die im *hrpB*-Operon kodiert sind. Aus den Sequenz-*Alignments* ließ sich herauslesen, dass die HrpB7-Proteine Heptadenmuster in der N- und C-terminalen Region besitzen sowie ein Glutamat-reiches Motiv in der C-terminalen Region. Die Heptadenmuster in der Aminosäuresequenz von HrpB7 weisen auf die Bildung einer *coiled-coil* Struktur hin. Neben dem vorliegenden Heptadenmuster wurde von *Jpred4* und SWISS-MODEL zusätzlich die Existenz von α -Helices in der Proteinstruktur vorhergesagt. Das Proteinstruktur-Modell von HrpB7 erstellt von SWISS-MODEL ähnelt den Proteinkristallstrukturen von FliJ aus *S. Typhimurium* und CT670 aus *C. trachomatis* (Abb. 15 B).

3.2.2. *hrpB7* ist essentiell für die Pathogenität und T3S von *Xcv*

Für die Analysen bezüglich Pathogenität und T3S wurde eine *hrpB7*-Deletionsmutante erstellt, in der *hrpB7* vollständig deletiert ist (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.9). Die *hrpB7*-Deletionsmutante löste keine Krankheitssymptome auf suszeptiblen bzw. keine HR auf resistenten Paprikapflanzen aus (Abb. 16). Die Expression von *hrpB7* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors *in trans* im Stamm 85-10 Δ *hrpB7* stellte den Wildtyp-Phänotypen wieder her. Der Verlust der Pathogenität von Stamm 85-10 Δ *hrpB7* ist demnach auf die Deletion von *hrpB7* zurückzuführen (Drehkopf *et al.*, 2020).

Das gleiche Infektionsexperiment wurde mit dem *Xcv*-Stamm 85* und der daraus resultierenden *hrpB7*-Deletionsmutante 85* Δ *hrpB7* durchgeführt (Abb. 16). Es wurden die gleichen Ergebnisse mit den HrpG*-Stämmen erzielt.

Die Überexpression von *hrpB7* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in 85-10 und 85* übte keinen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* aus (Abb. 16) (Drehkopf *et al.*, 2020).

HrpB7 wurde immunologisch durch ein HrpB7-spezifisches Antikörperserum detektiert (Drehkopf *et al.*, 2020). Zusätzlich zu dem erwarteten Signal für das monomere HrpB7 wurden weitere Signale für vermutlich zum Teil hochmolekulare Komplexe mit oder aus HrpB7 nachgewiesen. Natives HrpB7 konnte in dem Stamm 85*, in dem die *hrp*-Gene

konstitutiv exprimiert sind, nicht detektiert werden. Die native Proteinkonzentration liegt vermutlich unter der Detektionsgrenze des HrpB7-Antikörperserums.

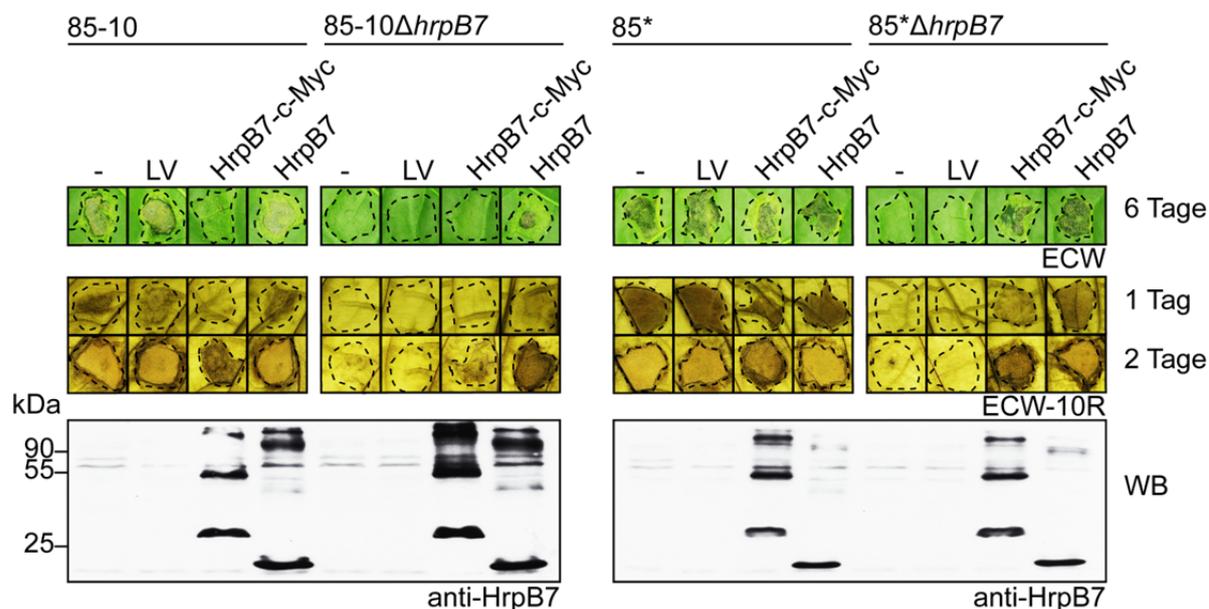


Abb. 16: Komplementationsstudien mit den *hrpB7*-Deletionsmutanten.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *hrpB7*, 85*, 85* Δ *hrpB7* wurden jeweils ohne Konstrukt, mit Leervektor (LV), mit *hrpB7-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors oder mit *hrpB7* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte 1×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines HrpB7-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Für den Nachweis der Synthese von HrpB7-Deletionsderivaten wurde zusätzlich der Einfluss eines C-terminalen c-Myc-Epitops an HrpB7 auf die Pathogenität analysiert (Abb. 16). Die Infiltration der Stämme 85-10 Δ *hrpB7* bzw. 85* Δ *hrpB7*, welche HrpB7-c-Myc synthetisierten, lösten im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Krankheitssymptome in suszeptiblen ECW-Paprikapflanzen als auch eine zeitlich verzögerte Induktion der HR in resistenten ECW-10R-Pflanzen aus. Vermutlich hat das C-terminale c-Myc-Epitop einen negativen Effekt auf die Funktion von HrpB7 (Drehkopf *et al.*, 2020). Diese Theorie stimmt überein mit der Beobachtung, dass die Überexpression von *hrpB7-c-myc in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in 85-10 und 85* ebenfalls zu reduzierten Krankheitssymptomen führte (Abb. 16). Der immunologische Nachweis von HrpB7-c-Myc erfolgte unter Verwendung des c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörpers. Neben dem erwarteten Signal für das monomere HrpB7-c-Myc konnten wiederum weitere Signale für vermutlich zum Teil hochmolekulare Komplexe mit oder aus HrpB7 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Für die HrpB7-homologen Proteine aus tierpathogenen Bakterien konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Sekretion der frühen Substrate, der Translokon-Komponenten und der Effektoren beeinflussen (Payne und Straley, 1998; Evans und Hughes, 2009).

In *in vitro*-Sekretionsanalysen mit den Stämmen 85* und 85* Δ *hrpB7* sollte der Einfluss von HrpB7 auf die T3S untersucht werden (Abb. 17). Um den Einfluss von HrpB7 auf die Sekretion eines Effektorproteins zu analysieren, wurde *avrBs3* ektopisch exprimiert. Der Vorteil bei der Verwendung von AvrBs3 war, dass ein spezifisches Antikörperserum zur Detektion des Effektors vorlag (Knoop *et al.*, 1991).

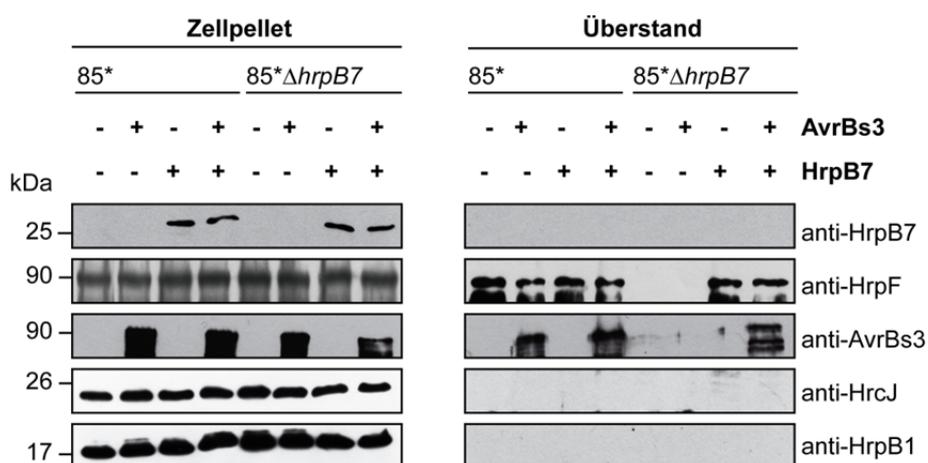


Abb. 17: HrpB7 ist essentiell für die T3S in *Xcv*.

Es wurden die folgenden Stämme in Sekretionsmedium inkubiert: 85*, 85*, welcher *avrBs3*, *hrpB7* oder *avrBs3* und *hrpB7* ektopisch exprimiert, 85* Δ *hrpB7* und 85* Δ *hrpB7*, welcher *avrBs3*, *hrpB7* oder *avrBs3* und *hrpB7* ektopisch exprimiert. Die Gesamtzellextrakte (Zellpellet) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western-Blot mit spezifischen Antikörpern für HrpB7, HrpF, AvrBs3, HrcJ und HrpB1 analysiert. HrpB1 und HrcJ sind intrazelluläre Proteine, die als Lysiskontrolle dienen. HrpF ist das Translokonprotein. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Das Experiment wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Die Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen HrpB7, das Translokonprotein HrpF, das Effektorprotein AvrBs3 und die nicht-sekretierten Proteine HrcJ und HrpB1 (Hausner *et al.*, 2013) analysiert (Abb. 17). Die Proteine HrpF und AvrBs3 wurden erwartungsgemäß vom Wildtyp-Stamm sekretiert (Rossier *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 2000), waren aber nicht im Kulturüberstand der *hrpB7*-Deletionsmutante nachweisbar (Drehkopf *et al.*, 2020). Die Sekretionsdefizienz wurde durch die ektopische Expression von *hrpB7* komplementiert. HrpB7 war nicht im Kulturüberstand detektierbar und wird daher vermutlich nicht sekretiert.

Zusammenfassend wurde in den Komplementationsstudien gezeigt, dass der mutante Phänotyp komplementiert wird durch die ektopische Expression von *hrpB7* unter der

Kontrolle des *lac*-Promotors, sodass der mutante Phänotyp spezifisch auf die Deletion von *hrpB7* zurückgeführt werden kann (Drehkopf *et al.*, 2020). Die *in vitro*-Sekretionsanalyse lässt den Schluss zu, dass HrpB7 vermutlich essentiell ist für die T3-abhängige Sekretion des Translokonproteins HrpF und des Effektorproteins AvrBs3. HrpB7 selbst wird nicht sekretiert. Es wurde außerdem gezeigt, dass HrpB7 zum Teil hochmolekulare Komplexe bildet und das C-terminale c-Myc-Epitop vermutlich einen negativen Einfluss auf die Funktion von HrpB7 ausübt (Drehkopf *et al.*, 2020).

3.2.3. HrpB7 formt hochmolekulare Komplexe, die membranlokalisiert sind

Um zu untersuchen, ob andere Komponenten des T3SS für die Komplexbildung von HrpB7 essentiell sind, wurde die Expression von *hrpB7-c-myc in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in den Stämmen 85* und 85* Δ *hrp* miteinander verglichen (Abb. 18 A). Der *Xcv*-Stamm 85* Δ *hrp* besitzt kein *hrp*-Gencluster. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörpers. Bei beiden *Xcv*-Stämmen wurden das monomere HrpB7-c-Myc und die hochmolekularen Komplexe detektiert. Dieses Ergebnis spricht entweder für homomere Komplexe aus HrpB7 oder heteromere Komplexe aus HrpB7 mit einem oder mehreren unbekanntem Proteinen, welche nicht im *hrp*-Gencluster kodiert sind (Drehkopf *et al.*, 2020).

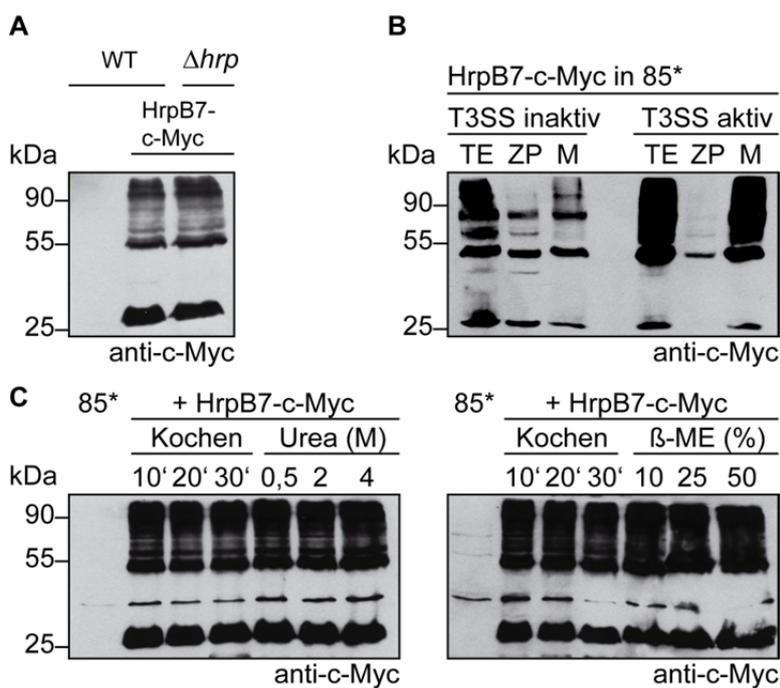


Abb. 18: HrpB7 formt stabile und hochmolekulare Komplexe.

(A) HrpB7-Komplexe sind unabhängig von den Proteinen des *hrp*-Genclusters. Von den *Xcv*-Stämmen 85* ohne Konstrukt und 85* bzw. 85* Δ *hrp*, welche *hrpB7-c-myc* ektopisch exprimierten, wurden gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörpers analysiert. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert. (B) HrpB7 ist ein membranständiges Protein. Der Stamm 85*, welcher *hrpB7-c-myc* ektopisch exprimierte, wurde über

Nacht in MA-Medium pH 7.0, wo das T3SS inaktiv ist, und in MA-Medium pH 5.3 und den Additiven BSA und Thiamin, welches das T3SS aktiviert, inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag lysiert. Die Lysate (TE, Totalextrakt) wurden mittels Ultrazentrifugation fraktioniert in Membranfraktion (M) und zytoplasmatische Fraktion (ZP). Proben der Fraktionen und des Gesamtzellextraktes wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung des c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörpers analysiert. Das Ergebnis wurde zweimal reproduziert. (C) HrpB7 bildet stabile Komplexe. Von dem Stamm 85*, welcher *hrpB7-c-myc* ektopisch exprimierte, wurden jeweils

gleiche Mengen Zellextrakt vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel unterschiedlich bearbeitet. Zum einen wurde jeweils ein Aliquot 10, 20 oder 30 Minuten gekocht. Weitere drei Proben wurden 0,5, 2 oder 4 M Harnstoff zugesetzt und diese für 5 min im Wasserbad gekocht. Andere drei Proben wurde 10, 25 oder 50 % β -Mercaptoethanol (β -ME) zugegeben und diese auch für 5 min im Wasserbad gekocht. Das SDS-Gel wurde anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert.

Um die Stabilität der hochmolekularen Komplexe genauer bewerten zu können, wurden einzelne Aliquots an Zellysate vom Stamm 85*, welcher HrpB7-c-myc synthetisierte, vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel 10-30 Minuten lang gekocht, bis zu 4 M Harnstoff als chaotropes Mittel oder bis zu 50 % β -Mercaptoethanol als Thiol-Reduktionsmittel zugegeben. Unter den eingesetzten Konzentrationen an Denaturierungsmitteln und unterschiedlicher Kochdauer der Proben blieben die hochmolekularen Komplexe von HrpB7 stabil (Abb. 18 C) (Drehkopf *et al.*, 2020).

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisation von HrpB7 in der Zelle untersucht. Dazu wurden Fraktionierungsanalysen an *Xcv* durchgeführt. Es wurde der *Xcv*-Stamm 85*, welcher *hrpB7-c-myc* ektopisch exprimiert, in den Fraktionierungsstudien eingesetzt. Die Bakterienkultur wurde in ein T3SS-inaktivierendes bzw. aktivierendes Medium inkubiert. Anschließend wurden die Lysate mittels Ultrazentrifugation in die Membranfraktion und zytoplasmatische Fraktion aufgetrennt. Die Analyse dieser Fraktionen erfolgte mittels Western-Blot (Abb. 18 B). Im T3SS-inaktiven Zustand lag HrpB7-c-Myc im Zytoplasma als auch an der Membran als monomer und in komplexer Form in vergleichbaren Mengen nachweisbar vor. Nach der Inkubation der Bakterienkultur im T3SS-aktivierenden Medium lokalisiert HrpB7-c-Myc vermehrt in komplexer Form bevorzugt in der Membranfraktion (Drehkopf *et al.*, 2020).

Basierend auf den Ergebnissen der Analyse der *hrpB7-c-myc*-Expression in der *hrp*-Mutante, der Fraktionierungsanalysen und des Denaturierungsexperimentes wird vermutet, dass HrpB7 membranlokalisierte, Hitze-resistente hochmolekulare Komplexe bildet.

3.2.4. Identifizierung essentieller Sequenz- und Struktur motive in HrpB7

Die Cysteine im N-terminalen Heptadenmuster

Die Aminosäuresequenz von HrpB7 in *Xcv* weist in der N-terminalen Region Heptadenmuster auf, die jeweils ein Cystein in der Position *d* tragen (Abb. 19). Dieses Cystein-Motiv ist konserviert in den N-terminalen Heptadenmuster innerhalb der *Xanthomonas* spp. (Kapitel 3.2.1.; Abb. 14). Um die Relevanz einer möglichen Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen für die Stabilität der Komplexbildung zu untersuchen, wurden vier HrpB7-Derivate erstellt, in denen das dritte Cystein (C1A), die ersten beiden (C2A), die ersten drei Cysteine (C3A) und alle fünf Cysteine (C5A) jeweils

gegen ein Alanin ausgetauscht wurden. Der Austausch zu einem Alanin bewahrt weiterhin die Funktion des Heptadenmusters.

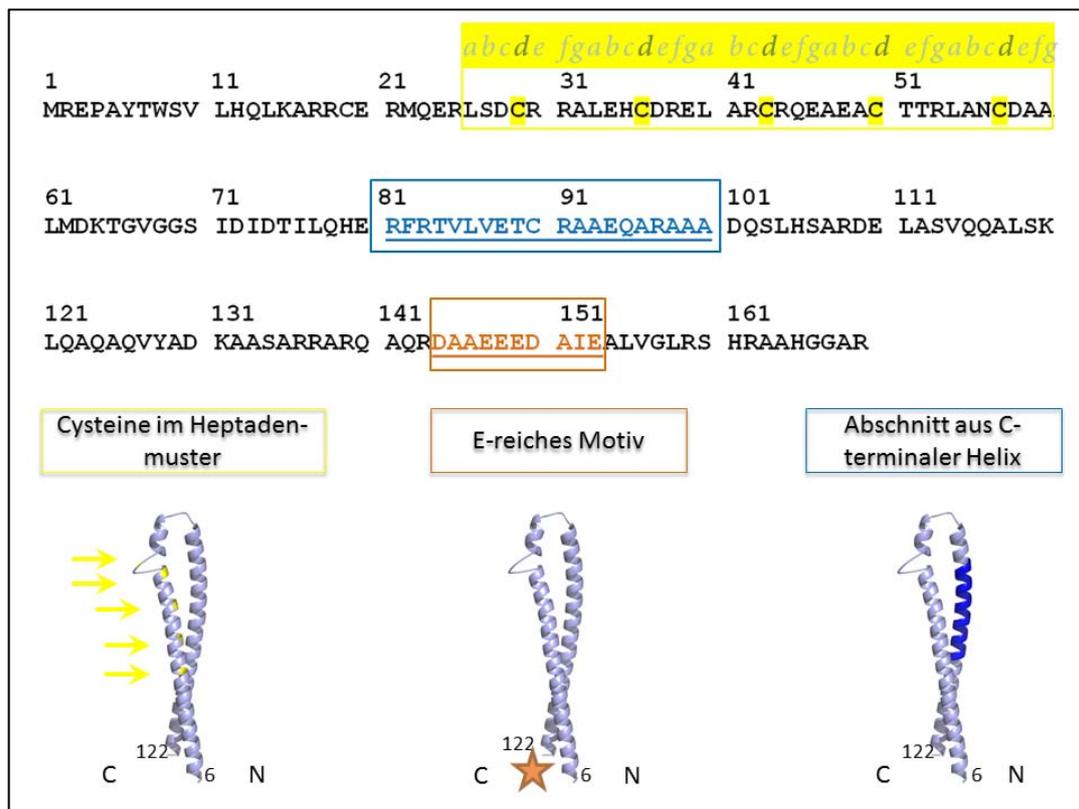


Abb. 19: Sequenz- und Struktur motive von HrpB7 aus *Xcv*.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von HrpB7 aus *Xcv* und die dazugehörige Proteinstruktur von SWISS-MODEL (Abschnitt 3.2.1). In der N-terminalen Region ist ein Heptadenmuster (abcdefg) lokalisiert, welches Cysteine in der Position *d* trägt. In der C-terminalen Region von HrpB7 befindet sich ein Glutamat-reiches Sequenzmotiv, welches in der Abbildung in orange gekennzeichnet ist. Da das Proteinmodell nur bis zur Aminosäure 122 vorhergesagt ist, wurde die Position des Glutamat-reichen Motives als Stern gekennzeichnet. Die zentrale Region des Proteins, hier in blau hervorgehoben, formt in der 3D-Struktur ein Abschnitt der C-terminalen Helix.

Die erstellten *Xcv*-Stämme wurden in susceptible und resistente Paprikapflanzen infiltriert (Abb. 20). Wie erwartet, komplementierte die ektopische Expression von *hrpB7* den mutanten Phänotyp auf susceptible und resistenten Paprikapflanzen (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Stämme 85-10 Δ *hrpB7*, welche *hrpB7*-Cystein-Mutanten ektopisch exprimierten, lösten reduzierte Krankheitssymptome in Blättern von susceptible Paprikapflanzen aus (Abb. 20). In Blättern von resistenten Paprikapflanzen induzierte die Infiltration dieser *Xcv*-Stämme jedoch eine HR mit Ausnahme der *hrpB7*-Cystein-Mutante *hrpB7*_{C5A} (Abb. 20) (Drehkopf *et al.*, 2020).

Der immunologische Nachweis der Proteinsynthese von HrpB7 und den HrpB7-Derivaten erfolgte mit dem HrpB7-spezifischen Antikörperserum. Für das HrpB7-Derivat, in dem alle fünf Cysteine gegen ein Alanin ausgetauscht wurden, waren die hochmolekularen HrpB7-Komplexe nicht nachweisbar.

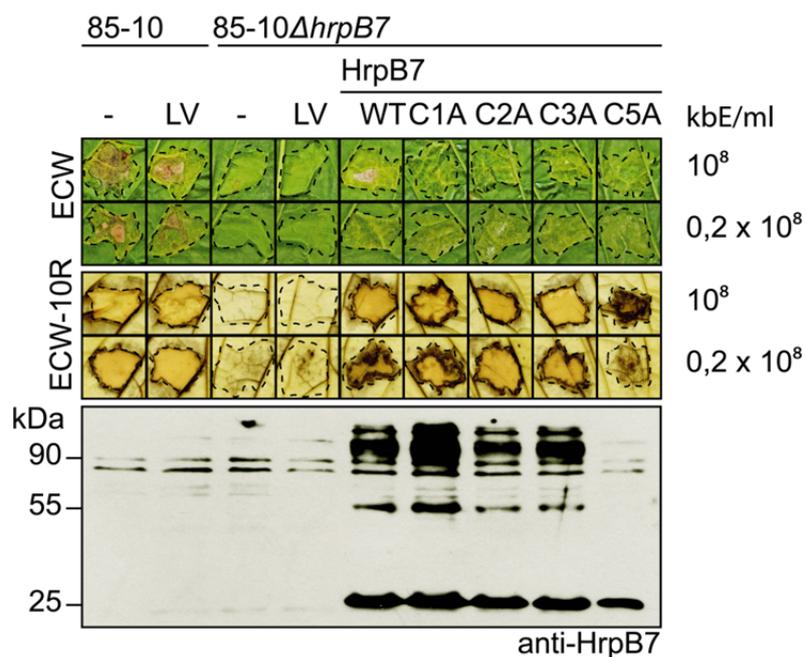


Abb. 20: Komplementationsstudien mit den HrpB7-Derivaten mit Cystein-Alaninsubstitutionen.

Die *Xcv*-Stämme 85-10 mit und ohne Leervektor (LV) sowie 85-10Δ*hrpB7* ohne Konstrukt, mit Leervektor, mit Wildtyp-*hrpB7* (WT) oder mit einem HrpB7-Derivat (C1A, C2A, C3A oder C5A), wurden in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von 1×10^8 kbE ml⁻¹ und $0,2 \times 10^8$ kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung von HrpB7-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Das Glutamat-reiche Motiv

Das Glutamat-reiche Motiv in der C-terminalen Region von HrpB7 ist unter den homologen Proteinen innerhalb von *Xanthomonas* spp. konserviert, aber auch bei den Vertretern der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie zu finden (Abschnitt 3.2.1.; Abb. 14). Eine funktionelle Analyse dieses Motivs wurde auch in den homologen Proteinen bisher nicht durchgeführt (Mukerjea und Ghosh, 2013).

Glutamat- oder Aspartatreste findet man häufig in aktiven Zentren von Helikasen, Kinasen oder ATPasen zum Beispiel im Walker B-Motiv (Walker *et al.*, 1982). Dabei übernehmen diese sauren Aminosäuren aufgrund ihrer Polarität die Funktion der Bindung des Magnesium-Ions oder agieren als katalytische Base in der ATP-Hydrolyse. Um die Bedeutung des Glutamat-reichen Motivs für die Funktion von HrpB7 untersuchen zu können, wurde das komplette Motiv $_{144}[\text{DAAEEEDAIEA}]_{154}$ von Aminosäure 144 bis 154 deletiert bzw. das Motiv durch Alaninsubstitutionen in $_{144}[\text{DAAA AAAAIAA}]_{154}$ mutiert (Abb. 21).

Die Infiltration der *Xcv*-Stämme 85*Δ*hrpB7*, welche HrpB7_{Δ144-154} oder HrpB7_{144-154mut} synthetisierten, lösten auf Blätter der resistenten ECW-10R-Pflanze eine reduzierte HR aus (Abb. 21 A). Die HrpB7-Derivate komplementierten zudem nicht den Phänotypen der *hrpB7*-

Deletionsmutante auf suszeptiblen ECW-Paprikapflanzen. Der immunologische Nachweis der HrpB7-Derivate mit dem HrpB7-spezifischem Antikörperserum war nicht möglich. Vermutlich ist die Antikörper-Bindungsstelle in HrpB7 durch die angewandten Deletions- bzw. Mutationsereignisse defekt. Das Infektionsexperiment wurde daher mit *Xcv*-Stämmen mit HrpB7-c-Myc-Derivaten wiederholt (Abb. 21 B). Die Stämme $85^*\Delta hrpB7$, welche *hrpB7* $_{\Delta 144-154}$ -c-myc, *hrpB7* $_{144-154mut}$ -c-myc oder *hrpB7* $_{C5A}$ -c-myc exprimierten, lösten keine Krankheitssymptome oder HR in Paprikapflanzen aus. Wie erwartet, löste der Stamm $85^*\Delta hrpB7$, welcher *hrpB7*-c-myc *in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierte, reduzierte Krankheitssymptome und eine zeitlich verzögerte HR im Vergleich zum Wildtyp-Stamm aus (siehe Abschnitt 3.2.2). Über das C-terminale c-Myc-Epitop wurde mit c-Myc-spezifischem Antikörper die Synthese der HrpB7-Derivate nachgewiesen. HrpB7 $_{\Delta 144-154}$ -C-Myc bildete wie das Wildtyp-HrpB7-c-Myc Komplexe aus. Der immunologische Nachweis von HrpB7 $_{144-154mut}$ -c-Myc detektierte nur zwei Signale, das Monomer und ein hochmolekularer Komplex von über 90 kDa.

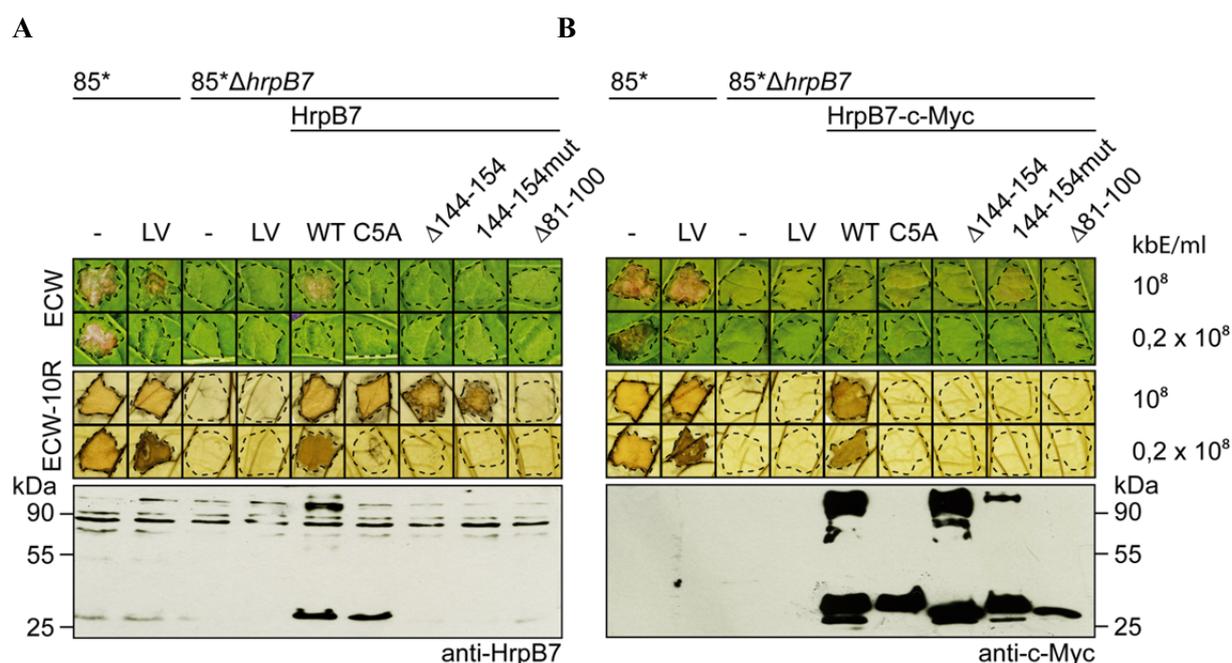


Abb. 21: Komplementationsstudien mit HrpB7-Derivate.

(A) Komplementationsstudien mit HrpB7-Derivate ohne Epitop-Markierung. Es wurden die Stämme 85^* und $85^*\Delta hrpB7$ mit oder ohne Leervektor (LV), sowie $85^*\Delta hrpB7$, welches *hrpB7* volle Länge (WT), *hrpB7* $_{C5A}$, *hrpB7* $_{\Delta 144-154}$, *hrpB7* $_{144-154mut}$ oder *hrpB7* $_{\Delta 81-100}$ ektopisch exprimierte, in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von $0,2$ und 1×10^8 kbE ml $^{-1}$ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung von HrpB7-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6-7 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert. (B) Komplementationsstudien mit c-Myc-Epitop-markierte HrpB7-Derivate. Es wurden die Stämme 85^* und $85^*\Delta hrpB7$ mit oder ohne Leervektor (LV), sowie $85^*\Delta hrpB7$, welches *hrpB7*-c-myc volle Länge (WT), *hrpB7* $_{C5A}$ -c-myc, *hrpB7* $_{\Delta 144-154}$ -c-myc, *hrpB7* $_{144-154mut}$ -c-myc oder *hrpB7* $_{\Delta 81-100}$ -c-myc ektopisch exprimierte, in Blätter von ECW-

und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von 0,2 und 1×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Die Auswertung und Proteinexpression erfolgte wie unter (A) beschrieben. Der Western-Blot wurde mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Deletion in der C-terminalen Helix

Das Strukturvorhersageprogramm SWISS-MODEL beschreibt HrpB7 als ein Protein mit einem hohen Anteil an α -helikalen Strukturen. In der dreidimensionalen Struktur soll sich die C-terminale Helix um die N-terminale Helix legen. Für das HrpB7-homologe Protein FliJ aus dem flagellären T3SS in *S. Typhimurium* wurde gezeigt, dass die Länge der N- und C-terminalen α -Helices für die Funktion des Proteins entscheidend ist (Fraser *et al.*, 2003). Im Fall von HrpB7 aus *Xcv* sollte dies im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Dazu wurde die C-terminale Helix von HrpB7 aus *Xcv* um 20 Aminosäuren gekürzt. Die *hrpB7*-Mutante besitzt eine Deletion von Codon 81 bis 100 (*hrpB7* _{Δ 81-100}) (Abb. 21).

hrpB7 _{Δ 81-100} bzw. *hrpB7* _{Δ 81-100}-c-Myc komplementierte den Phänotyp der *hrpB7*-Deletionsmutante nicht und ist demnach nicht funktional (Abb. 21). Die *HrpB7* _{Δ 81-100}-c-Myc Synthese wurde mit dem c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörper detektiert. Das HrpB7-Derivat wurde stabil synthetisiert. Es waren aber keine hochmolekularen Komplexe nachweisbar (Abb. 21).

Basierend auf die Analyse der HrpB7-Derivate kann man vermuten, dass die fünf Cysteine in der N-terminalen Region von HrpB7 sowie die Länge der C-terminale Helix eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der hochmolekularen HrpB7-Komplexe spielen. Die Komplementationsanalysen dazu lassen den Schluss zu, dass womöglich die Komplexbildung von HrpB7 einen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* hat.

Das Glutamat-reiche Motiv in HrpB7 ist vermutlich essentiell für die Virulenz von *Xcv*, hat aber keinen Einfluss auf die Komplexbildung von HrpB7.

Analyse der T3S der HrpB7-Derivate

Als nächstes wurde der Einfluss der HrpB7-Derivate auf die T3S analysiert. Hierfür wurden *in vitro*-Sekretionsanalysen mit den Stämmen 85*, 85* Δ *hrpB7* und 85* Δ *hrpB7*, welcher *hrpB7*, *hrpB7*_{C5A}, *hrpB7* _{Δ 144-154}, *hrpB7*_{144-154mut} oder *hrpB7* _{Δ 81-100} ektopisch exprimierte, durchgeführt.

Die Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das c-Myc-Epitop von HrpB7-c-Myc, das Translokonprotein HrpF, das „inner rod“-Protein HrpB2 und die nicht-sekretierten Proteine HrcJ und HrpB1 (Hausner *et al.*, 2013) analysiert (Abb. 22). Die Proteine HrpF und HrpB2 wurden erwartungsgemäß vom Wildtyp-Stamm sekretiert (Rossier *et al.*, 2000), waren aber nicht im Kulturüberstand der *hrpB7*-Deletionsmutante nachweisbar. Die Sekretionsdefizienz konnte durch die ektopische Expression von *hrpB7-c-myc* komplementiert werden. Keine Komplementation wurde dagegen bei den *hrpB7*-Derivaten beobachtet (Abb. 22).

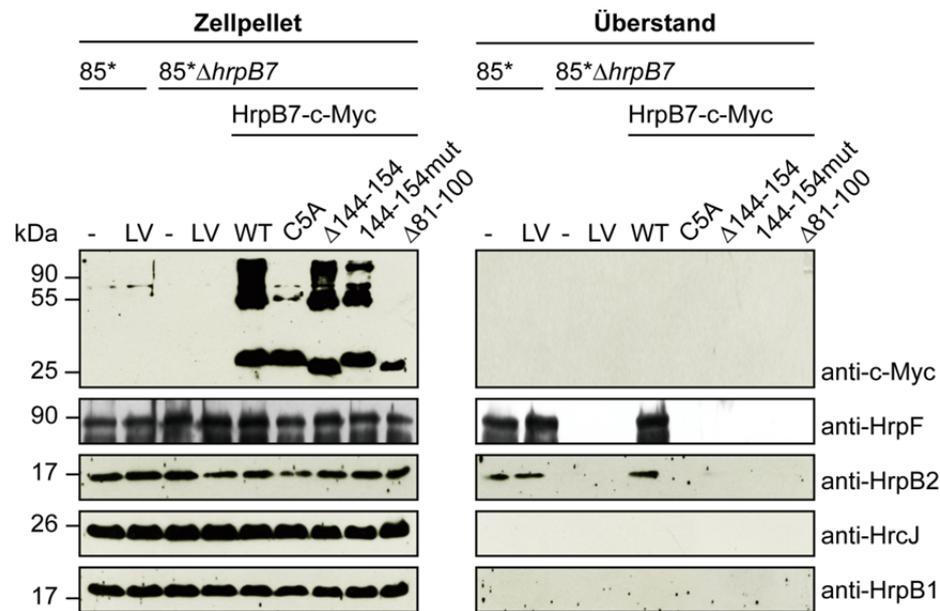


Abb. 22: Der Einfluss der HrpB7-Derivate auf die Typ 3-Sekretion.

Es wurden die folgenden Stämme in Sekretionsmedium inkubiert: 85*, 85* mit Leervektor (LV), 85*ΔhrpB7 mit und ohne Leervektor und 85*ΔhrpB7, welcher *hrpB7*-Wildtyp (WT), *hrpB7*_{C5A}, *hrpB7*_{Δ144-154}, *hrpB7*_{144-154mut} oder *hrpB7*_{Δ81-100} ektopisch exprimiert. Die Gesamtzellextrakte (Zellpellet) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Das Experiment wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Die Sekretionsanalysen deuten darauf hin, dass die Bildung der HrpB7-Komplexe und das Glutamat-reiche Motiv in HrpB7 höchstwahrscheinlich essentiell sind für die T3S.

3.2.5. Identifizierung möglicher HrpB7-Interaktoren mittels GST-pull down Analysen *in vitro*

Für die SctO-Proteine wird vorhergesagt, dass sie ein wesentlicher Bestandteil im zytoplasmatischen Komplex des T3SS sind (Evans und Hughes, 2009; Cherradi *et al.*, 2014; Romo-Castillo *et al.*, 2014). Das homologe Protein Spa13 aus *Shigella flexneri* interagiert zum Beispiel im zytoplasmatischen Komplex mit dem Translokon-Chaperon IpgC, der ATPase Spa47 (HrcN in *Xcv*), der gespaltenen Form von Spa40 (HrcU in *Xcv*), der C-Ring-Komponente Spa33 (HrcQ in *Xcv*) und der Komponente des Exportapparates MxiA (HrcV in *Xcv*) (Cherradi *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

Als potentielle Interaktoren für HrpB7 aus *Xcv* sollten die zytoplasmatischen Komponenten des T3SS HrcQ, HrcV und HrcL, die Kontrollproteine HpaA, HpaB und HpaC sowie die Effektoren XopJ und XopF1 mittels GST-pull down Analysen getestet werden.

GST-HrpB7 wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche C-terminal c-Myc-Epitop-markierte Derivate von HpaA, HpaB, HpaC, HrcV, HrcL,

HrcQ, XopJ und XopF1 enthielten (Abb. 23). HpaA, HpaB, HrcV, HrcL und HrcQ coeluierten mit GST-HrpB7 aber nicht mit GST. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion zwischen HrpB7 und den genannten Proteinen hin. Es war keine Interaktion zwischen HrpB7 und HpaC sowie HrpB7 und den Effektoren XopJ und XopF1 nachweisbar.

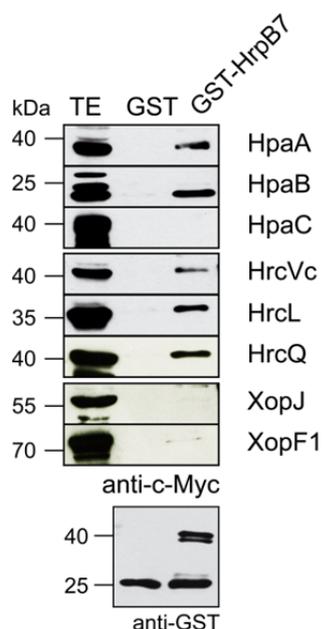


Abb. 23: HrpB7 interagiert mit Kontrollproteinen und Komponenten des T3SS.

GST-HrpB7 und GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten, welches HpaA-c-Myc, HpaB-c-Myc, HpaC-c-Myc, HrcVc-c-Myc (cytoplasmatische Domäne von HrcV), HrcL-c-Myc, HrcQ-c-Myc, XopJ-c-Myc bzw. XopF1-c-Myc enthielten, inkubiert. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließend Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten GST-*pull down* Analysen deuten an, dass HrpB7 wie seine homologen Proteine als Bestandteil des zytoplasmatischen Komplexes mit dessen Komponenten interagiert (Evans und Hughes, 2009; Cherradi *et al.*, 2014; Romo-Castillo *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurde für HrpB7 vergleichbar mit Spa13 aus *S. flexneri* eine Interaktion mit der C-Ringkomponente HrcQ und der Exportapparatkomponente HrcV nachgewiesen (Cherradi *et al.*, 2014). Des Weiteren interagiert HrpB7 vermutlich mit HrcL, den Regulator der ATPase. Die Interaktion zwischen HrpB7 und der ATPase HrcN und der Exportapparatkomponente HrcU muss noch analysiert werden.

Es wurde eine Interaktion zwischen HrpB7 und den Kontrollproteinen HpaA und HpaB im GST-*pull down* gezeigt. Eine Interaktion zu T3-Effektoren war nicht detektierbar. Auch für die HrpB7-homologen Proteine InvI, YscO und FliJ konnte eine Interaktion mit Effektoren nicht nachgewiesen werden (Evans und Hughes, 2009).

3.2.6. Proteinreinigung und Quantifizierung der Dimerisierung von HrpB7

Im immunologischen Nachweis von HrpB7 und HrpB7-c-Myc sind hochmolekulare Komplexe detektiert wurden (Abschnitt 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Auch homologe Proteine von HrpB7 zeigten Selbstinteraktion (Fraser *et al.*, 2003; Lorenzini *et al.*, 2010). Um neben einen Hinweis auf eine HrpB7-Selbstinteraktion zugleich eine quantitative Bewertung der Interaktion zu erhalten, wurden weitere Interaktionsstudien mittels *MicroScale Thermophoresis* (MST)

durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Thermophorese. Diese ist die gerichtete Bewegung von Molekülen in einem Temperaturgradienten, welche von den molekularen Eigenschaften wie Größe, Ladung, Hydrathülle oder Konformation abhängt (Wienken *et al.*, 2010; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011). Das Prinzip und der Ablauf der MST-Messungen sind allgemein in der Abb. 24 erläutert.

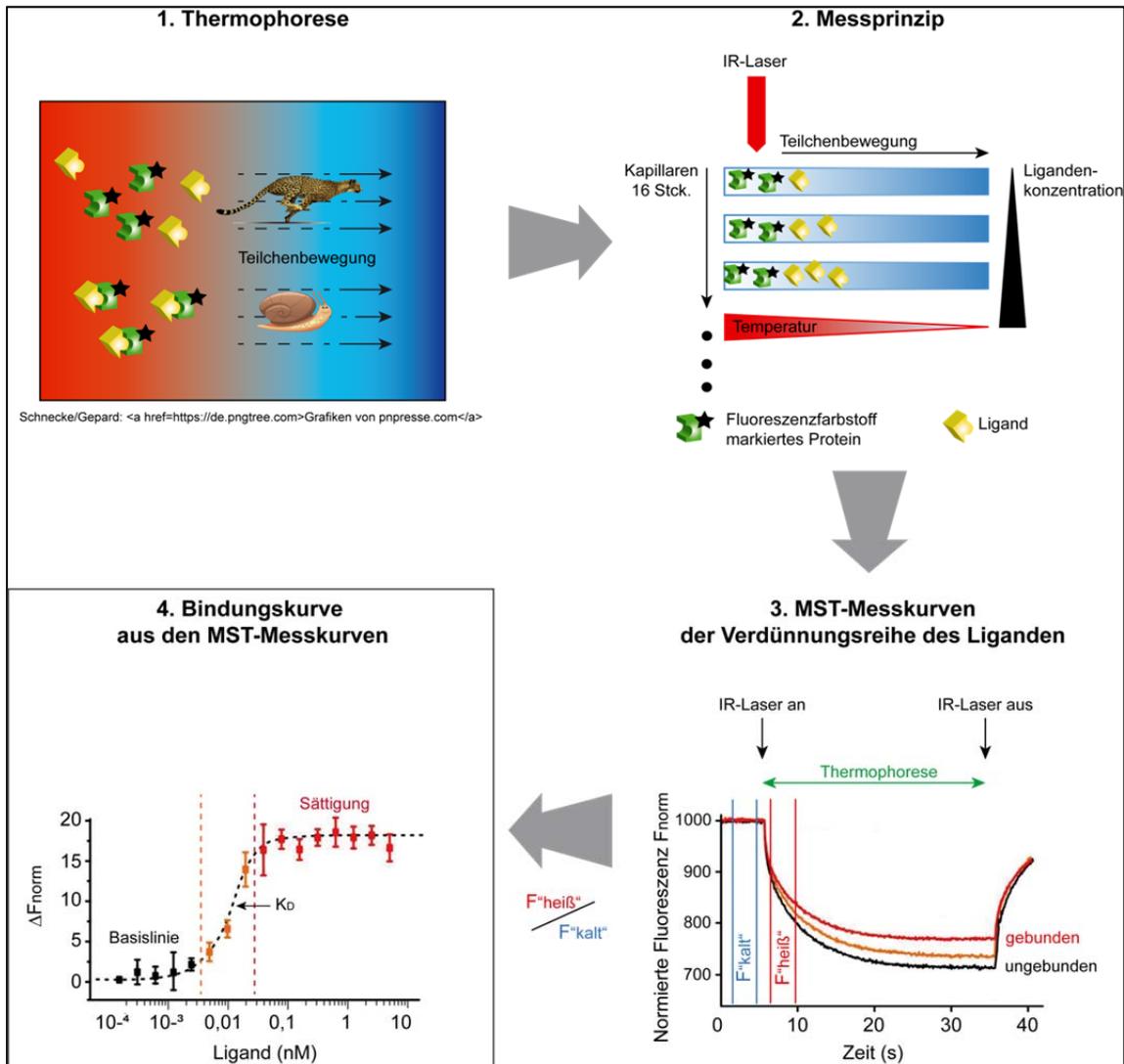


Abb. 24: Prinzip und Ablauf der MST-Messungen.

(1) Die Thermophorese beschreibt die Bewegung von Molekülen in einem Temperaturgradienten. Die Teilchenbewegung ist abhängig von deren Größe, Ladung, Hydrathülle und Konformation. Demnach bewegt sich ein größeres Teilchen bzw. Dimer oder Oligomer langsamer als ein kleines Teilchen bzw. Monomer. (2+3) Die Proteinlösung bestehend aus den potentiellen Interaktoren wird für die Messung in eine Glaskapillare gegeben. Einer der Interaktoren ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Messung erfolgt im Monolith NT. 115, welcher einen Infrarot-Laser (IR-Laser) verwendet zum Aufbau des Temperaturgradienten in der Proteinlösung und einen Detektor besitzt zur Aufnahme der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. Der IR-Laser wird eingeschaltet und baut den Temperaturgradienten in der Glaskapillare auf. Zugleich misst der Detektor die Änderung der Fluoreszenzintensität im Temperaturgradienten gegen die Zeit (MST-Messkurven). Der IR-Laser wird wieder ausgeschaltet und wandert zur nächsten Glaskapillare. Der gesamte Ablauf verläuft im Monolith NT. 115 vollständig automatisiert. Insgesamt werden 16 Glaskapillaren vermessen mit Proteinlösungen aus

konstanter Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Protein und unterschiedlichen Konzentrationen des potentiellen Interaktors. (4) Die Bindungskurve wird berechnet aus den aufgenommenen MST-Messkurven, indem für jede MST-Messkurve der Wert für die „kalte“ Fluoreszenzintensität (IR-Laser aus) durch die „heiße“ Fluoreszenzintensität (IR-Laser an) bestimmt wird und dieser der veränderten Konzentration des potentiellen Interaktors zugeordnet wird. Anhand der erstellten Bindungskurve kann die Dissoziationskonstante der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante ist die Ligandenkonzentration, bei der 50 % der Rezeptoren mit dem Liganden im Komplex vorliegen.

Für die MST-Messungen wurde His₆-NusA-HrpB7-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und gereinigt (Kapitel 2.4.5.). NusA (*N utilization substance A*) zählt zu den Protein-*tags*, welches die Löslichkeit und die korrekte Faltung des „Passagierproteins“, in dem Fall von HrpB7, fördert. Das Hexa-Histidin-Epitop (His₆) wurde für die Reinigung des Proteins über eine Säule mit Ni²⁺-Ionen gebunden an Nitrilotriessigsäure (NTA) benötigt.

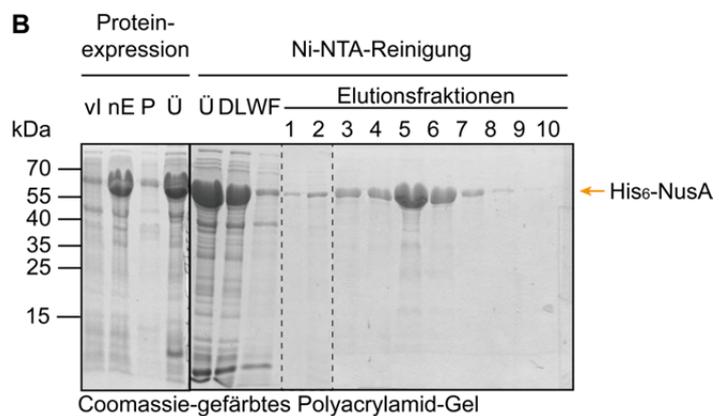
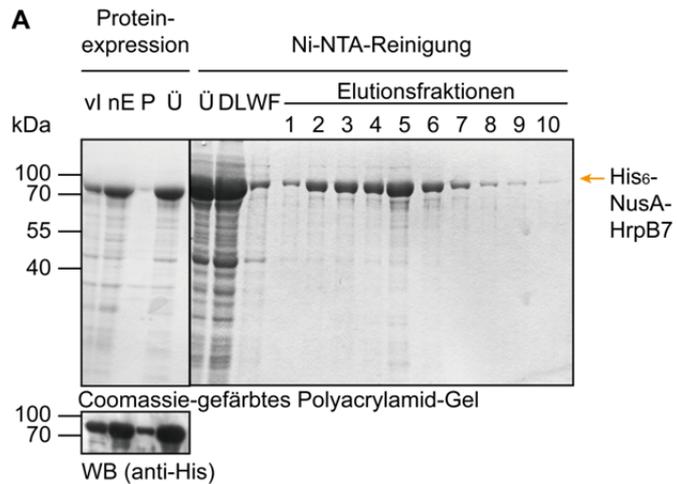
Der *E. coli*-Stamm BL21 star (DE3), welcher *his₆-nusA-hrpB7* unter der Kontrolle des T7-Promotors ektopisch exprimierte, wurde in Flüssigkultur angezogen und die Genexpression bei einer OD_{600nm} von 1 mit IPTG induziert. Zur besseren Kontrolle der Proteinsynthese wurden Proben im Verlauf des Prozesses entnommen und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 25 A). Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel und dem Western-Blot mit dem His-spezifischen Antikörper konnte das Protein His₆-NusA-HrpB7 nach der Induktion mit IPTG vorwiegend im Überstand nach der Zellyse detektiert werden. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen und der Durchlauf, die Waschfraktion und 10 Elutionsfraktionen getrennt aufgefangen. Zur Überprüfung des Reinigungsprozesses wurden Proben aus den Fraktionen auf ein SDS-Gel geladen und dieses anschließend mit Coomassie gefärbt (Abb. 25 A). Die Elutionsfraktionen 3 bis 5 wurden gemischt und mittels Dialyse entsalzt (Kapitel 2.4.5.).

Um ausschließen zu können, dass bei der Interaktionsanalyse nicht der Reinigungs-*tag* His₆-NusA mit sich selbst oder mit HrpB7 interagiert, wurde das Protein His₆-NusA nach dem gleichen Reinigungsprotokoll wie His₆-NusA-HrpB7 gereinigt (Abb. 25 B) und als Negativkontrolle in den MST-Messungen mit einbezogen. Nach der Proteinreinigung war ausreichend Protein für die MST-Messung vorhanden mit Proteinmengen zwischen 0,5 und 1 mg/ml. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Markierung der Proteine His₆-NusA-HrpB7 und His₆-NusA mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT647 erfolgte über den aktivierten N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester mit Hilfe eines Kits nach Herstellerangaben (Kapitel 2.4.6.). Diese reaktionsfähige Verbindung reagiert effizient mit primären Aminen in Proteinen und formt stabile Farbstoff-Protein-Konjugate. Eine primäre Aminogruppe befindet sich zum Beispiel in der Seitenkette des Lysins, welche regulär Lösungsmittel zugänglich ist und daher gut für Fluoreszenzfarbstoff-Markierung geeignet ist.

Abb. 25: Proteinreinigung von His₆-NusA-HrpB7 und His₆-NusA.

(A) Proteinreinigung von His₆-NusA-HrpB7. Der *E. coli* BL21 star (DE3)-Stamm, welcher *his₆-nusA-hrpB7* ektopisch exprimierte, wurde im 500 ml-Maßstab bei 37°C angezogen (vl - vor Induktion). Die Proteinexpression erfolgte bei Raumtemperatur und wurde mit 2 mM IPTG induziert. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet (nE - nach Expression) und mittels French Press aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert (P - Pellet) und der Überstand (Ü) über eine Ni-NTA-Säule gegeben. Während der Reinigung wurden der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (WF) und 10 Elutionsfraktionen (E) getrennt aufgefangen. Die Elutionsfraktionen E3-E5 wurden gemischt und mittels Dialyse entsalzt. Die entnommenen Proben aus dem Zellaufschluss und Reinigungsprozess wurden auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau-Färbung analysiert. Das Fusionsprotein



wurde zudem noch mittels Western-Blot, welcher mit einem His-spezifischen Antikörper analysiert wurde, nachgewiesen. (B) Proteinreinigung von His₆-NusA. Der *E. coli* BL21 star (DE3)-Stamm, welcher *his₆-nusA* ektopisch exprimierte, wurde im 500 ml-Maßstab bei 37°C angezogen. Die Proteinexpression und Ni-NTA-Reinigung erfolgte wie unter (A) beschrieben. Die Elutionsfraktionen E3-E6 wurden gemischt und mittels Dialyse entsalzt. Das SDS-Gel der entnommenen Proben wurde mit Coomassie Brilliant Blau-Färbung analysiert.

Es wurden folgende Interaktionen getestet: His₆-NusA-HrpB7_(NHS-NT647) mit His₆-NusA-HrpB7 und His₆-NusA_(NHS-NT647) mit His₆-NusA-HrpB7 (Abb. 26).

Aus den Bindungskurven der durchgeführten MST-Messungen wurde ein K_D-Wert von circa 127 nM für die Interaktion zwischen His₆-NusA-HrpB7_(NHS-NT647) mit His₆-NusA-HrpB7 berechnet. In der Literatur ist ein K_D-Wert für die Selbstinteraktion des HrpB7-homologen Proteins CT670 aus *C. trachomatis* mit 500 µM bekannt (Lorenzini *et al.*, 2010). Demnach ist die Selbstassoziation von HrpB7 aus *Xcv* vermutlich um zirka 4000fach stärker als die Selbstassoziation von CT670.

His₆-NusA_(NHS-NT647) mit His₆-NusA-HrpB7 zeigte in den MST-Messungen keine Interaktion.

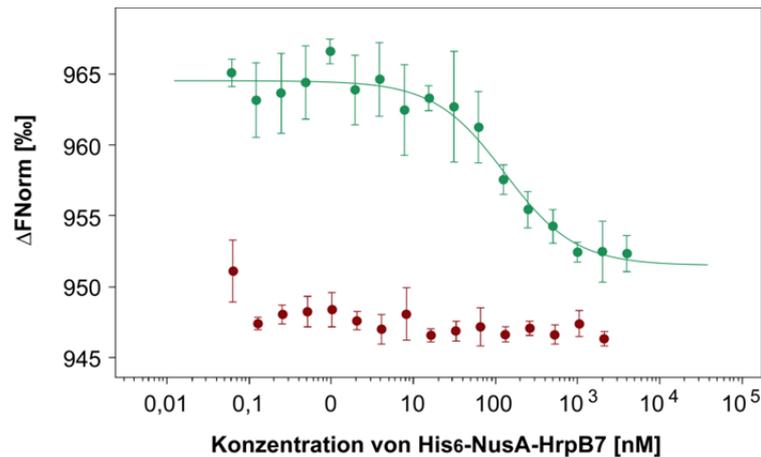


Abb. 26: Die Selbstinteraktion von His₆-NusA-HrpB7 gemessen mittels MST.

Nicht-markiertes His₆-NusA-HrpB7 wurde titriert in eine Lösung mit konstanter Konzentration an His₆-NusA-HrpB7_(NHS-NT647) bzw. His₆-NusA_(NHS-NT647). Grüne Bindungskurve: Die Konzentration an His₆-NusA-HrpB7 wurde variiert von 0,061 nM und 4 μ M. Die Konzentration an His₆-NusA-HrpB7_(NHS-NT647) blieb konstant bei 5 nM. Es wurde die normalisierte Fluoreszenz ΔF_{Norm} gegen die Ligandenkonzentration von His₆-NusA-HrpB7 in nM aufgetragen. Rote Bindungskurve: Die Konzentration an His₆-NusA-HrpB7 wurde variiert von 0,0641 nM und 2,1 μ M. Die Konzentration an His₆-NusA_(NHS-NT647) blieb konstant bei 26 nM. Wiederum wurde die normalisierte Fluoreszenz ΔF_{Norm} gegen die Ligandenkonzentration His₆-NusA-HrpB7 in nM aufgetragen. Die MST-Messdaten sagten eine Dissoziationskonstante K_D von $127,15 \pm 29,5$ nM für die Selbstinteraktion von His₆-NusA-HrpB7 voraus. His₆-NusA interagiert nicht mit His₆-NusA-HrpB7.

3.3. Funktionelle Analyse von HpaA und Charakterisierung essentieller Sequenzmotive

HpaA ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, der zum einen die T3S von Pilus, Translokon und Effektoren kontrolliert und zum anderen selber T3-abhängig sekretiert und in die Wirtszelle transloziert wird (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a).

Das Protein HpaA wird in drei funktionelle Domänen gegliedert (Abb. 27). Sowohl die N-terminale (N69) als auch die C-terminale Region (C50) von HpaA sind essentiell für die Pathogenität von *Xcv* (Lorenz *et al.*, 2008a). Die 25 N-terminalen Aminosäuren von HpaA besitzen ein Sekretionssignal, welches essentiell ist für die T3-abhängige Sekretion von HpaA und weiterer Effektoren (Lorenz *et al.*, 2008a). In den 50 C-terminalen Aminosäuren von HpaA ist eine HpaB-Bindungsstelle lokalisiert. Des Weiteren ist die C-terminale Region C50 essentiell für die T3-abhängige Sekretion von Pilus, Translokon und Effektoren (Lorenz *et al.*, 2008a). Die zentrale Region (M) von HpaA wurde bisher nicht untersucht.

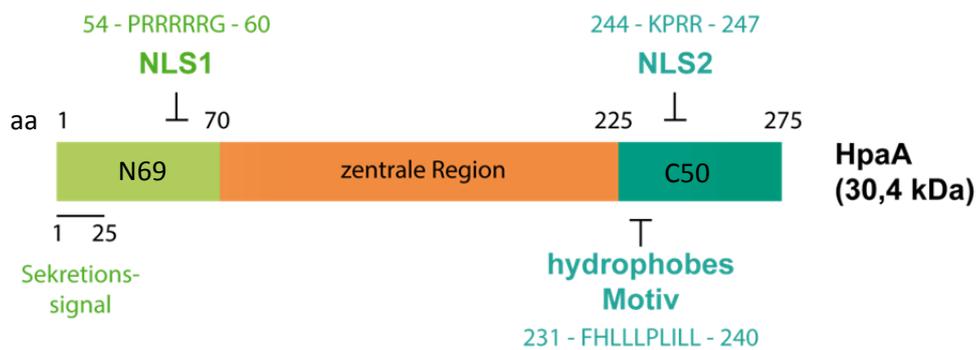


Abb. 27: Einteilung von HpaA in drei funktionelle Domänen.

HpaA wurde in drei funktionelle Domänen eingeteilt: In der N-terminalen Region (Grün, 1-69 aa, abgekürzt N69) ist das Sekretionssignal lokalisiert, das „Nuclear localization signal 1“ (NLS1)-Motiv und es wird weiterhin noch ein Translokationssignal vermutet. Die zentrale Region (Orange, 71-224 aa, abgekürzt M) besitzt bisher keine definierten Sequenzmotive. In der C-terminalen Region (Blau, 225-275 aa, abgekürzt C50) wurden zwei Sequenzmotive benannt: ein hydrophobes Motiv aus 10 hydrophoben Aminosäuren und das NLS2-Motiv (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). aa, Aminosäuren

Weitere interessante Sequenzmotive in HpaA sind je ein NLS-(nuclear localization signal)-Motiv in der N- und C-terminalen Domäne und ein hydrophobes Motiv in der C-terminalen Region (Abb. 27) (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a).

Im Fokus dieser Arbeit standen die Charakterisierung des N-terminalen NLS-Sequenzmotivs in HpaA und die Identifizierung weiterer Interaktionspartner von HpaA neben den bereits bekannten Interaktionspartnern HpaB und HrcQ (Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2012).

3.3.1. HpaA interagiert mit HpaC und wird HpaC-abhängig transloziert

Die Sekretion der T3S-Substrate wird kontrolliert über die Hpa-Proteine HpaA, HpaB und HpaC. Die Selbstinteraktion von HpaB und HpaC, als auch eine mögliche Interaktion zwischen den Kontrollproteinen HpaA und HpaB sowie zwischen HpaB und HpaC wurden bereits gezeigt (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008a).

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen HpaA und HpaC *in vitro* mittels GST-pull down Analysen untersucht werden. Dafür wurde GST-HpaC in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem *E. coli*-Lysat inkubiert, welches HpaA-c-Myc enthielt. Die Analyse der eluierten Proteine zeigte, dass HpaA-c-Myc im Eluat von GST-HpaC nachweisbar war (Abb. 28).

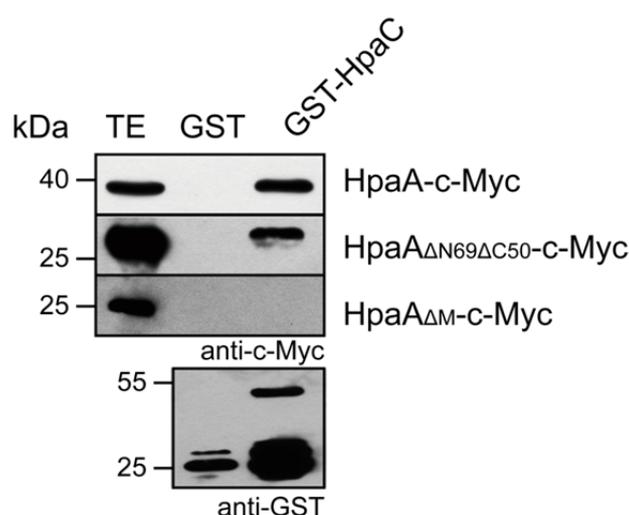


Abb. 28: Die zentrale Domäne von HpaA enthält eine HpaC-Bindungsstelle.

GST-HpaC und GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten, welches HpaA-c-Myc, HpaA Δ N69 Δ C50-c-Myc oder HpaA Δ M-c-Myc enthielt, inkubiert. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

Um die HpaC-Bindungsstelle in HpaA genauer lokalisieren zu können, wurden N- und C-terminale Deletionsderivate von HpaA in GST-pull down Analysen auf deren Interaktion mit GST-HpaC getestet. Western-Blot-Analysen mit c-Myc- und GST-spezifischen Antikörpern zeigten im Eluat von GST-HpaC die Anwesenheit von HpaA Δ N69 Δ C50-c-Myc, nicht aber HpaA Δ M-c-Myc (Abb. 28).

Die Ergebnisse aus den GST-pull down Analysen deuten an, dass das Kontrollprotein HpaA mit dem Kontrollprotein HpaC interagiert. Die HpaC-Bindungsstelle ist wahrscheinlich in der zentralen Region von HpaA lokalisiert.

Das Kontrollprotein HpaC beeinflusst die Sekretion des Translokonproteins HrpF, des „inner rod“-Proteins HrpB2 und des Kontrollproteins HpaA (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*,

2008a). Der Einfluss von HpaC auf die Sekretion und vermutlich auch Translokation von HpaA sollte anhand eines sensitiveren Versuches überprüft werden. Hierfür wurden *in planta*-Translokationsanalysen mit dem AvrBs3 Δ 2-Reporter als translationale Fusion an HpaA durchgeführt. AvrBs3 Δ 2 ist ein Deletionsderivat des TAL-Effektors AvrBs3, dem die Aminosäuren 2-152 fehlen (Szurek *et al.*, 2002). Damit besitzt es kein funktionales Sekretions- und Translokationssignal (Szurek *et al.*, 2002; Büttner *et al.*, 2004). Es eignet sich jedoch als Reporter, da es in translationaler Fusion mit einem T3S- und Translokationssignal in resistente Paprikapflanzen des Kultivars ECW-30R eine AvrBs3-spezifische HR auslösen kann (Minsavage *et al.*, 1990; Noël *et al.*, 2003; Büttner *et al.*, 2004).

Der Effektor AvrBs3 selber wird HpaC-unabhängig transloziert und dient in diesem Experiment als Kontrolle (Büttner *et al.*, 2006). Die *Xcv*-Stämme, welche AvrBs3 Δ 2, AvrBs3, HpaA-AvrBs3 Δ 2, HpaA₁₋₇₀-AvrBs3 Δ 2 oder HpaA Δ C50-AvrBs3 Δ 2 synthetisierten, wurden in Blätter von Paprikapflanzen der Kultivare ECW-10R und ECW-30R infiltriert. Keines der HpaA-Derivate wurde transloziert durch 85* Δ hpaC (Abb. 29).

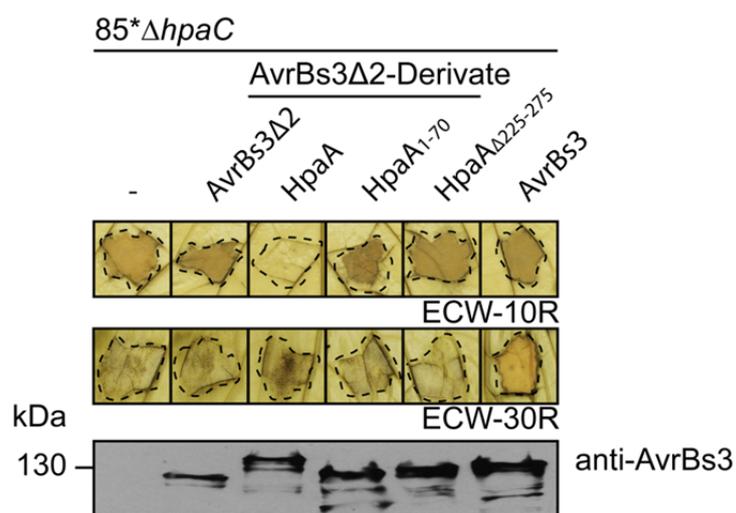


Abb. 29: HpaA wird HpaC-abhängig transloziert.

Der Stamm 85* Δ hpaC, welcher AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2, HpaA₁₋₇₀-AvrBs3 Δ 2, HpaA Δ 225-275-AvrBs3 Δ 2 oder AvrBs3 synthetisierte, wurde in ECW-10R und ECW-30R-Pflanzen mit einer Zelldichte von 2×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche

Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Einzig die Infiltration der mit *avrBs3 in trans* exprimierten *hpaC*-Deletionsmutante führte wie erwartet zu einer HR im Infektionsbereich auf Blätter von ECW-30R-Pflanzen (Abb. 29) (Büttner *et al.*, 2006). Während alle anderen Stämme erwartungsgemäß die zeitlich verzögerte HR auf resistenten ECW-10R-Pflanzen induzierten (Büttner *et al.*, 2006), löste der Stamm 85* Δ hpaC, welcher HpaA-AvrBs3 Δ 2 synthetisierte, keine makroskopischen Reaktionen aus (Abb. 29). Es wird vermutet, dass durch die Überexpression von HpaA der Phänotyp der *hpaB*-Deletionsmutante imitiert wird. HpaA bindet nach dem Modell von Lorenz *et al.* (2008) das T3S-Chaperon HpaB bis das T3SS assembliert ist. Anschließend wird HpaA sekretiert (Lorenz *et al.*, 2008a). In einer *hpaC*-Deletionsmutante wird HpaA allerdings

nicht sekretiert und bleibt demnach in *Xcv* an HpaB gebunden. HpaB kann seine Funktion als T3S-Chaperon nicht nachgehen, ähnlich dem Phänotyp der *hpaB*-Deletionsmutante.

Die Proteinestabilität der Fusionsproteine in den *Xcv*-Stämmen wurde immunologisch nachgewiesen (Abb. 29).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der *in planta*-Translokationsanalysen darauf hin, dass HpaA HpaC-abhängig transloziert wird. Die Deletion der HpaB-Bindungsstelle als auch die Deletion der HpaB- und putativen HpaC-Bindungsstelle hatte keine Auswirkung auf die HpaC-abhängige Translokation des HpaA-Derivates.

3.3.2. Die zentrale Region in HpaA ist essentiell für die T3S und Pathogenität von *Xcv*

Wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben, interagiert HpaC vermutlich mit der zentralen Domäne von HpaA. Um die Bedeutung der zentralen Region von HpaA für die Proteinfunktion zu analysieren, wurden HpaA-Deletionsderivate generiert und auf die Fähigkeit untersucht, den Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante $85^*\Delta hpaA$ zu komplementieren. Für phänotypische Analysen wurden die *Xcv*-Stämme in susceptible ECW- und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen infiltriert (Abb. 30).

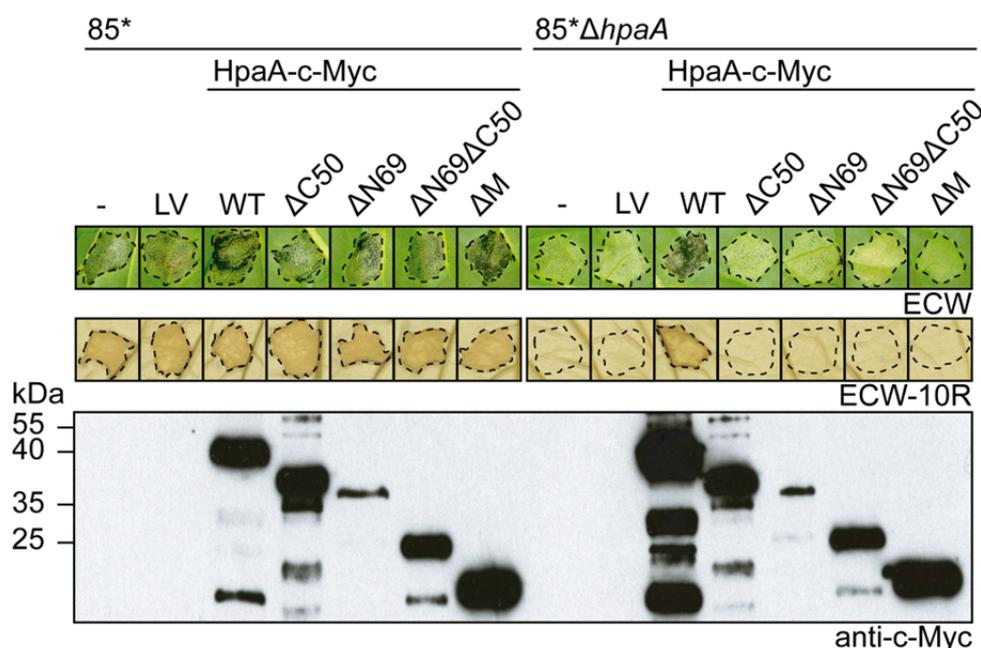


Abb. 30: Komplementationsstudien mit den HpaA-Deletionsderivaten.

Die *Xcv*-Stämme 85^* und $85^*\Delta hpaA$ wurden jeweils ohne Konstrukt, mit Leervektor (LV), mit einem Expressionskonstrukt, welches für HpaA-c-Myc (WT), HpaA $_{\Delta C50}$ -c-Myc, HpaA $_{\Delta N69}$ -c-Myc, HpaA $_{\Delta N69\Delta C50}$ -c-Myc oder HpaA $_{\Delta M}$ -c-Myc kodierte, in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte 1×10^8 kbE ml $^{-1}$ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Der Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante wurde erwartungsgemäß durch die ektopische Expression von *hpaA-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors vom Konstrukt pBRM und nicht von *hpaA_{ΔN69}-c-myc*, *hpaA_{ΔC50}-c-myc* oder *hpaA_{ΔN69ΔC50}-c-myc* komplementiert (Vergleich (Lorenz *et al.*, 2008a), ektopisch exprimiert von pDSK). Es wurde zudem gezeigt, dass die Expression von *hpaA_{ΔM}-c-myc in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors im Stamm 85* Δ *hpaA* den Wildtyp-Phänotypen nicht wiederherstellen kann. Die fehlende Komplementation der HpaA-Deletionsderivate ist nicht auf Proteininstabilität zurückzuführen (Abb. 30). Die Überexpression der *hpaA*-Derivate *in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in 85* übte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* aus.

Als nächstes wurde die T3S der HpaA-Deletionsderivate analysiert. In früheren Experimenten wurde bereits gezeigt, dass HpaA_{ΔC50}-C-Myc im Stamm 85* sekretiert wird, während HpaA_{ΔN69}-C-Myc und HpaA_{ΔN69ΔC50}-C-Myc aufgrund des fehlenden Sekretionssignals nicht im Kulturüberstand nachweisbar sind (Abb. 31 A) (Lorenz *et al.*, 2008a). Das HpaA-Deletionsderivat HpaA_{ΔM}-C-Myc, bei dem die zentrale Region deletiert ist, wurde sekretiert (Abb. 31 A). Auffällig ist die erhöhte HrpF-Sekretion bei der Überexpression von *hpaA-c-myc* und *hpaA_{ΔN69}-c-myc* in 85* (Abb. 31 A).

In weiteren *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde der Einfluss der HpaA-Deletionsderivate auf die T3-abhängige Sekretion in dem *Xcv*-Stamm 85* Δ *hpaA* untersucht (Abb. 31 A). HrpF war erwartungsgemäß nicht im Kulturüberstand der *hpaA*-Deletionsmutante nachweisbar (Lorenz *et al.*, 2008a). Die Sekretionsdefizienz konnte durch die ektopische Expression von *hpaA-c-myc* komplementiert werden. Die HrpF-Sekretion konnte außerdem durch die ektopische Expression von *hpaA_{ΔN69}-c-myc* in 85* Δ *hpaA* wiederhergestellt werden (Lorenz *et al.*, 2008a). Von HpaA_{ΔN69ΔC50}-C-Myc wurde weder die eigene Sekretion noch die HrpF-Sekretion beobachtet. Auffällig war, dass das HpaA-Deletionsderivat HpaA_{ΔM}-C-Myc von 85* Δ *hpaA* sekretiert wurde, obwohl keine HrpF-Sekretion nachgewiesen werden konnte.

Um herauszufinden, ob HpaA_{ΔM}-C-Myc T3-abhängig sekretiert wird, wurde die Sekretion des HpaA-Deletionsderivates in 85* Δ *hrcN*, ein *Xcv*-Stamm, wo die ATPase des T3SS deletiert ist, überprüft (Abb. 31 B). HpaA_{ΔM}-C-Myc wurde nicht im Kulturüberstand von 85* Δ *hrcN* detektiert. Es ist zu vermuten, dass dieses HpaA-Deletionsderivat T3-abhängig, jedoch Translokation-unabhängig sekretiert wird.

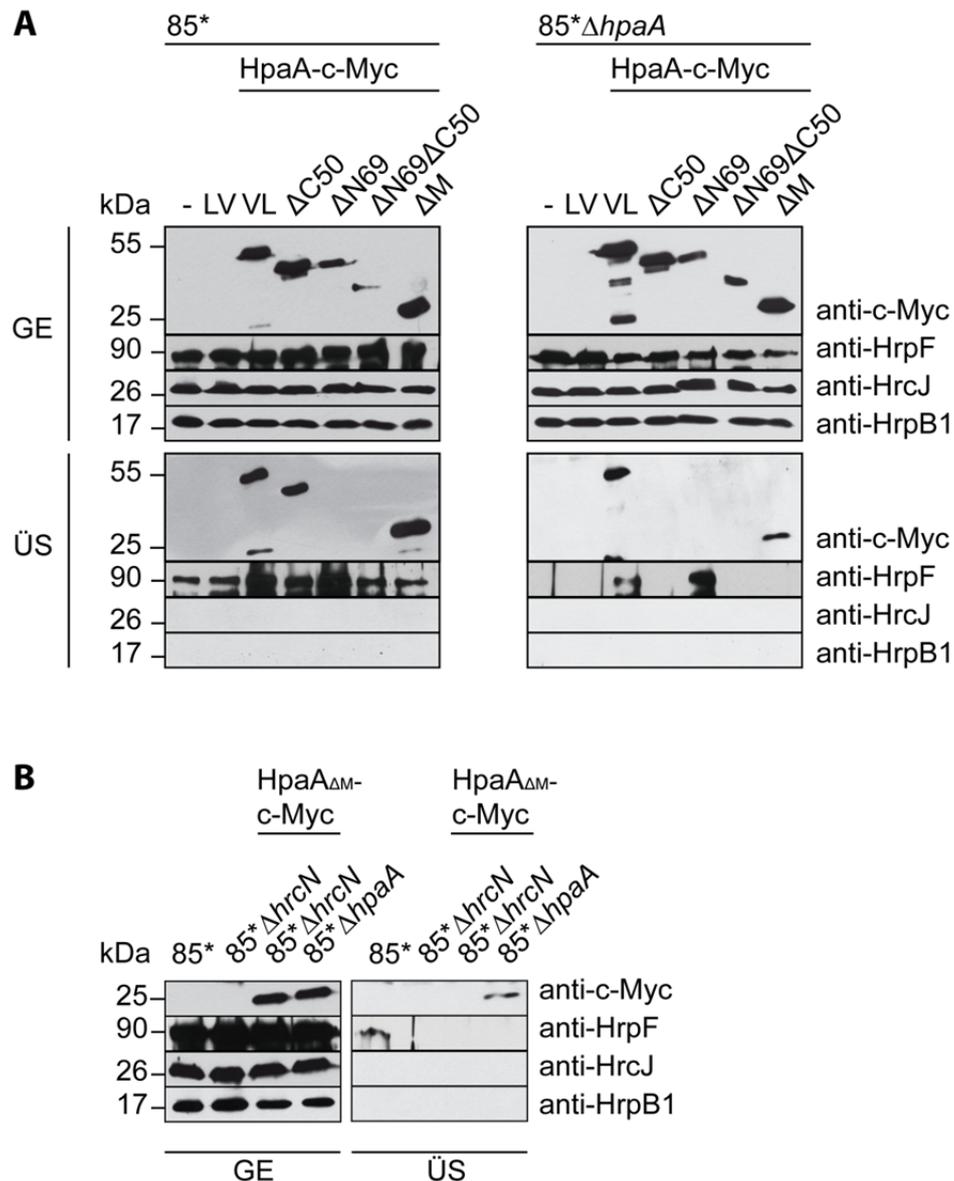


Abb. 31: Die zentrale und C-terminale Region von HpaA sind essentiell für die HrpF-Sekretion.

(A) Es wurden die folgenden Stämme in Sekretionsmedium inkubiert: 85* und 85*, welcher den Leervektor (LV) besaß oder *hpaA-c-myc* (WT), *hpaA $\Delta C50$ -c-myc*, *hpaA $\Delta N69$ -c-myc*, *hpaA $\Delta N69\Delta C50$ -c-myc* oder *hpaA ΔM -c-myc* ektopisch exprimierte, sowie 85* $\Delta hpaA$ und 85* $\Delta hpaA$, welcher den Leervektor besaß oder *hpaA-c-myc*, *hpaA $\Delta C50$ -c-myc*, *hpaA $\Delta N69$ -c-myc*, *hpaA $\Delta N69\Delta C50$ -c-myc* oder *hpaA ΔM -c-myc* ektopisch exprimierte. Die Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände (ÜS) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Das Experiment wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt. (B) Es wurden die Xcv-Stämme 85*, 85* $\Delta hrcN$, 85* $\Delta hrcN$, welcher *hpaA ΔM -c-myc* ektopisch exprimierte, und 85* $\Delta hpaA$, welcher HpaA ΔM -c-Myc synthetisierte, im Sekretionsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände wie unter (A) beschrieben analysiert. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert.

Um zu überprüfen, ob die C-terminale Region C50 im HpaA-Deletionsderivat HpaA ΔM noch intakt ist, wurden GST-pull down Analysen durchgeführt. GST-HpaB und GST-HpaC, als Negativkontrolle, wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat

inkubiert, welches das C-terminal c-Myc-Epitop-markierte HpaA-Deletionsderivat enthielt (Abb. 32).

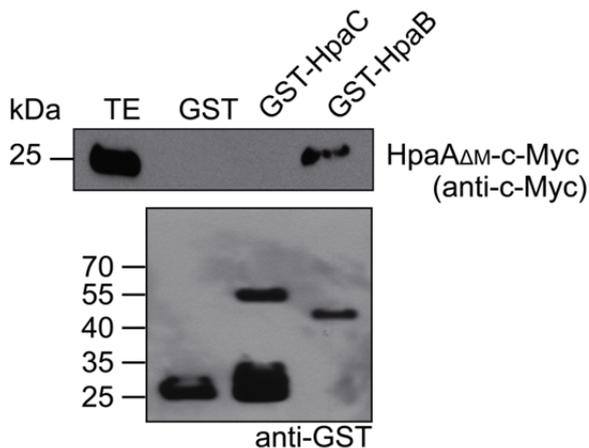


Abb. 32: HpaA Δ M interagiert mit dem Chaperon HpaB.

Die GST-Fusionsproteine und GST wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat, welches HpaA Δ M-c-Myc enthielt, inkubiert. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert.

HpaA Δ M-c-Myc coeluierte mit GST-HpaB jedoch nicht mit GST-HpaC. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion zwischen den HpaA-Deletionsderivat HpaA Δ M-c-Myc und dem T3S-Chaperon HpaB hin. Demnach ist die HpaB-Bindungsstelle in der C-terminalen Region von HpaA Δ M-c-Myc noch intakt.

Die Ergebnisse führen zur Annahme, dass neben der N- und der C-terminalen Region auch die zentrale Region von HpaA essentiell ist für die Pathogenität und T3S von *Xcv*. Ein HpaA-Protein ohne N- und C-terminale Region wird nicht sekretiert und löst keine HrpF-Sekretion aus. Eine fehlende HrpF-Sekretion wird auch beobachtet, wenn die zentrale Region deletiert ist. Jedoch wird dieses HpaA-Deletionsderivat T3-abhängig sekretiert und interagiert im GST-*pull down* mit HpaB. Für die Induktion der HrpF-Sekretion in *Xcv* ist nach den experimentellen Daten die N-terminale Region und damit die Sekretion von HpaA nicht essentiell.

3.3.3. Die Analyse der zentralen Domäne mit Hilfe von XopA-HpaA-Chimären

Die zentrale Domäne von HpaA wurde gegen XopA ausgetauscht, wobei XopA in diesem Chimär als Abstandshalter zwischen der N- und C-terminalen Region von HpaA diente. Es sollte zunächst überprüft werden, ob es möglich ist, die *hpaA*-Deletionsmutante mit dem Chimär HpaA $_{N70}$ -XopA-HpaA $_{C50}$ zu komplementieren. Für die phänotypische Analyse wurde der *Xcv*-Stamm in suszeptible ECW- und resistente ECW-10R-Paprikapflanzen infiltriert (Abb. 33). Der Stamm 85* Δ *hpaA*, welcher *hpaA* $_{N70}$ -*xopA*-*hpaA* $_{C50}$ -*c-myc* *in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors exprimierte, führte zu keinen makroskopischen Reaktionen im Infektionsbereich (Abb. 33). Auch die reduzierte HrpF-Sekretion der *hpaA*-Deletionsmutante konnte durch die ektopische Expression von *hpaA* $_{N70}$ -*xopA*-*hpaA* $_{C50}$ -*c-myc* in *in vitro*-Sekretionsanalysen nicht komplementiert werden (Abb. 33).

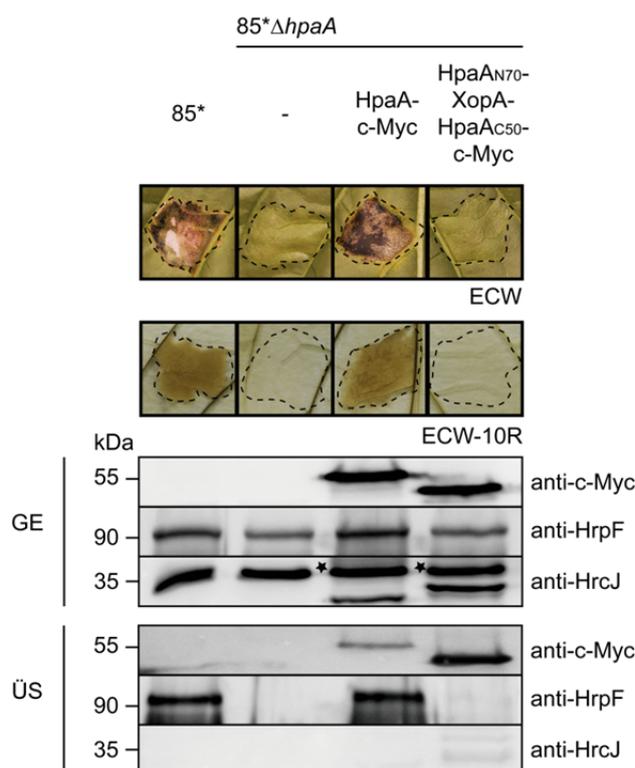


Abb. 33: Das XopA-HpaA-Chimär komplementiert nicht die *hpaA*-Deletionsmutante.

Die *Xcv*-Stämme 85*, 85* Δ *hpaA* und 85* Δ *hpaA* mit einem Expressionskonstrukt, welches für HpaA-c-Myc (WT) oder HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-c-Myc kodierte, wurden in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte 1×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert. Die gleichen *Xcv*-Stämme wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (GE) und Kulturüberstände (ÜS) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz

visualisiert. Das spezifische Signal für HrcJ im GE ist mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. Das Experiment wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

XopA, beschrieben als potentielle Komponente des T3-Translokons neben HrpF (Noël *et al.*, 2002), wird im Wildtyp-Stamm 85* sekretiert, aber nicht transloziert, während in einer *hpaB*-Deletionsmutante XopA sekretiert und transloziert wird (Büttner *et al.*, 2004).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine HpaB-abhängige Sekretion oder Translokation des chimären Proteins wie bei HpaA vorliegt oder ob XopA die Sekretion und Translokation des XopA-HpaA-Chimärs lenkt. Dazu wurden verschiedene XopA-HpaA-Chimäre in Kombination mit dem AvrBs3 Δ 2-Reporter in *in vivo*-Translokationsanalysen und *in vitro*-Sekretionsanalysen untersucht. Es wurden die Ergebnisse der Derivate XopA-AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2, XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2 (Scheibner *et al.*, 2017), HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{N70}-XopA-AvrBs3 Δ 2 miteinander verglichen. XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{N70}-XopA-AvrBs3 Δ 2 wurden in 85* und der *hpaB*-Deletionsmutante sekretiert und transloziert wie XopA (Abb. 34). Einzig das XopA-HpaA-Chimär HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2, welches die N- und C-terminale Region von HpaA besitzt, wurde wie HpaA HpaB-abhängig transloziert. Jedoch erfolgte die Sekretion von HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2 HpaB-unabhängig (Abb. 34). Die Fusionsproteine interferierten nicht mit der AvrBs1-spezifischen HR. Die Proteinsynthese der Fusionsproteine ist im Gesamtzellextrakt der *in vitro*-Sekretionsanalysen zu sehen (Abb. 34).

Die Ergebnisse der *in vivo*-Translokationsanalysen und *in vitro*-Sekretionsanalysen mit den XopA-HpaA-Chimären deuten an, dass die N- und C-terminale Domäne von HpaA die HpaB-abhängige Translokation von HpaA steuern. Zudem zeigte das Ergebnis aus den

Sekretionsanalysen, dass vermutlich die Sekretion und Translokation über das T3SS getrennt voneinander kontrolliert werden, da die Sekretion von HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50} HpaB-unabhängig erfolgte.

In zukünftigen Versuchen sollte die HpaC-abhängige Sekretion und Translokation des HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-Chimärs analysiert werden.

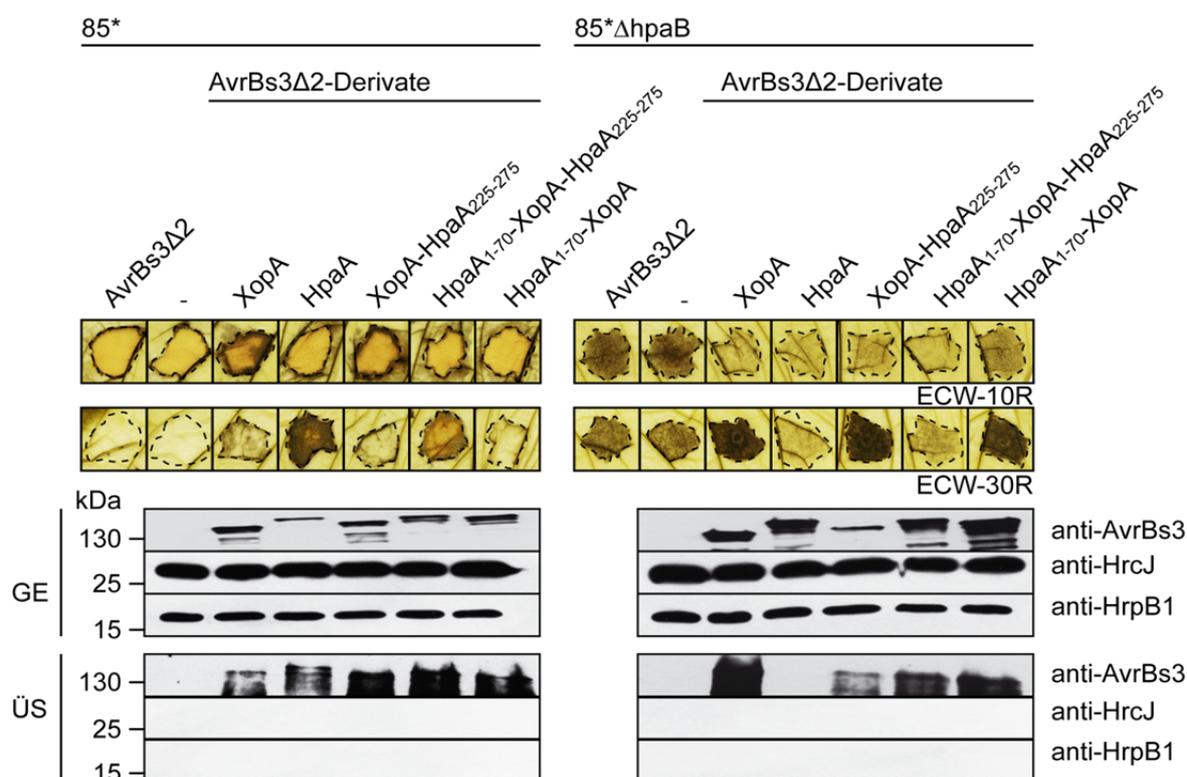


Abb. 34: *In vitro*-Sekretionsanalysen und *in vivo*-Translokationsanalysen mit XopA-HpaA-Chimäre.

Die Stämme 85* und 85* Δ *hpaB*, welche AvrBs3 Δ 2, XopA-AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2, XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2, HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}-AvrBs3 Δ 2 oder HpaA_{N70}-XopA-AvrBs3 Δ 2 synthetisierten, wurden in ECW-10R und ECW-30R-Pflanzen mit einer Zelldichte von 4×10^8 kE ml⁻¹ infiltriert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert. Die *Xcv*-Stämme wurden zudem in Sekretionsmedium inkubiert. Die Gesamtzellextrakte (Zellpellet) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Die Ergebnisse des Experimentes wurden einmal reproduziert.

3.3.4. Die zentrale Domäne von HpaA interagiert mit den Komponenten des zytoplasmatischen Komplexes und Exportapparates

HpaA interagiert mit dem T3S-Chaperon HpaB (Lorenz *et al.*, 2008a), dem Kontrollprotein HpaC (Kapitel 3.3.1) und der zytoplasmatischen Ringstruktur-Komponente HrcQ (Lorenz *et al.*, 2012). Aufgrund der Funktion von HpaA als Kontrollprotein im Prozess der T3S und -Translokation sollten die Interaktionen zwischen HpaA und den Substratbindungsstellen

(HrcU und HrcV), den Komponenten der Substrat-Sortierungsplattform (HrcN und HrcL) sowie einer weiteren Komponente aus dem zytoplasmatischen Komplex (HrpB7) getestet werden. Die Interaktion zwischen HpaA und HrcQ wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die nachgewiesenen Interaktionen wie HpaC über die zentrale Domäne von HpaA erfolgen.

Zunächst wurden die potentiellen Interaktoren als GST-Fusionsproteine über ihr GST-*tag* an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches C-terminal c-Myc-Epitop-markiertes HpaA oder HpaA Δ N69 Δ C50 enthielt (Abb. 35 A). HpaA und HpaA Δ N69 Δ C50 coeluierten mit allen getesteten GST-Fusionsproteinen außer mit GST. Demnach interagierte HpaA mit allen getesteten Komponenten nachweisbar über die zentrale Domäne.

In weiteren GST-*pull down* Analysen wurde gezeigt, dass auch die C-terminal c-Myc-Epitop-markierten Derivate von HrcV, HrcQ und HrcL im Eluat mit GST-HpaA nachweisbar sind (Abb. 35 B).

Zum Vergleich wurden zusätzlich HrpB7 und eine Komponente außerhalb des Exportapparates bezüglich deren Interaktion mit HpaA analysiert. XopA ist vorwiegend im Translokationsprozess involviert und wird daher als potentielle Komponente des T3-Translokons neben HrpF beschrieben (Noël *et al.*, 2002). Im Eluat von GST-XopA war HpaA-c-Myc nicht detektierbar (Abb. 35 D). GST-HrpB7 coeluierte mit HpaA-c-Myc (Abb. 35 D).

Zusätzlich zu GST-*pull down* Analysen wurde eine mögliche Interaktion von HpaA mit der ATPase HrcN mittels Koimmunopräzipitation *in vivo* überprüft. Dazu wurden die *Xcv*-Stämme 85*, in dem die T3SS-Gene konstitutiv exprimiert sind, verwendet. Mangels HpaA-spezifischer Antikörper wurde *hpaA* mit einem C-terminalen *c-myc*-Epitop ektopisch in 85* exprimiert. Die Bakterien wurden in einem T3SS-induzierendem Medium angezogen, lysiert und HpaA-c-Myc mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper, der an Protein G-Agarose gekoppelt war, immunpräzipitiert. Western-Blot-Analysen zeigten, dass HrcN in höherer Konzentration im Präzipitat von HpaA-c-Myc, jedoch reduziert in Abwesenheit des c-Myc-spezifischen Antikörpers oder in Abwesenheit von HpaA-c-myc detektierbar war (Abb. 35 C). HrcN interagiert vermutlich unspezifisch in geringer Menge mit der Protein G-Agarose.

Die Ergebnisse der GST-*pull down* Analysen führen zu der Annahme, dass die zentrale Domäne von HpaA mit den Komponenten des T3SS HrcU, HrcV, HrcN und HrcL interagiert. Eine mögliche Interaktion zwischen HpaA und HrcN wurde auch mittels Koimmunopräzipitation *in vivo* detektiert. Bei einer Koimmunopräzipitation lässt sich jedoch nicht ausschließen, ob noch weitere Komponenten an der nachgewiesenen Interaktion beteiligt sind. Des Weiteren wurde die Interaktion von HpaA zu HrpB7 positiv getestet. Das Kontrollprotein HpaA interagiert vermutlich nicht mit XopA. Die Interaktionen zwischen HpaA

und HrcR, HrcS und HrcT sowie den Komponenten des Basalapparates und Pilus müssen noch analysiert werden.

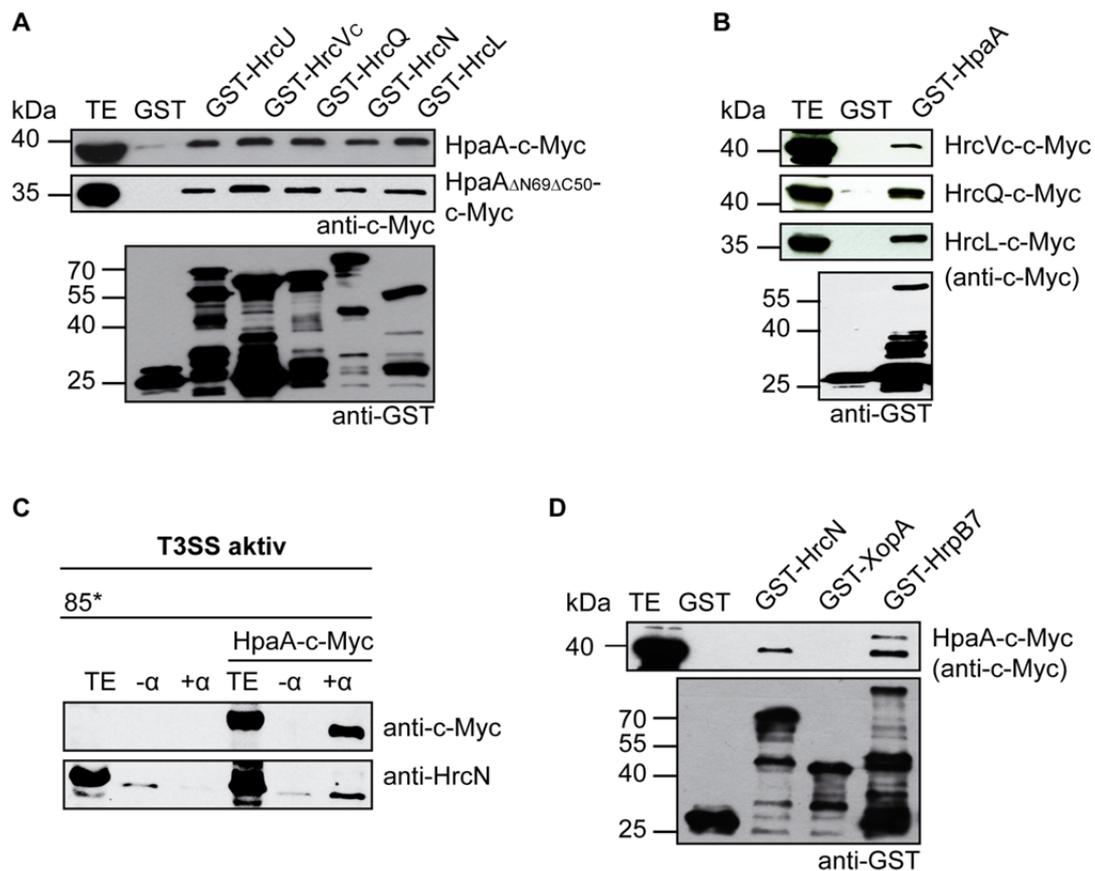


Abb. 35: HpaA interagiert mit den Substratbindungsstellen des T3SS.

(A) Die Gene *hrcU*, *hrcVc*, *hrcQ*, *hrcN* und *hrcL* wurden als translationale Fusion mit *gst* überexprimiert in *E. coli*, an Glutathion-Sepharose immobilisiert, und mit *E. coli*-Lysat, welches HpaA-c-Myc oder HpaA Δ N69 Δ C50-c-Myc enthielt, inkubiert. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit GST- und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert. (B) GST-HpaA wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysat, welches HrcVc-c-Myc, HrcQ-c-Myc oder HrcL-c-Myc enthielt, inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte wie unter (A) beschrieben. Der Versuch wurde zweimal wiederholt mit dem gleichen Ergebnis. (C) Es wurden zwei *Xanthomonas* Stämme, 85* und 85*, welcher *hpaA-c-myc* exprimierte, in T3SS-inaktiven und aktiven Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden die Kulturen vollständig lysiert. Die eine Hälfte des Zelllysates [TE] wurde mit Protein G-Agarose [- α] und die zweite Hälfte zusätzlich mit c-Myc-Antikörper [+ α] 2 h bei 4 $^{\circ}$ C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot unter Verwendung von c-Myc- und HrcN-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Analyse der beiden Antikörper erfolgte auf einer Membran. Das Ergebnis wurde zweimal reproduziert. (D) Die Glutathion-Sepharose mit dem immobilisierten Fusionsprotein GST-HrcN, GST-XopA oder GST-HrpB7 wurde mit *E. coli*-Lysat, welches HpaA-c-Myc enthielt, inkubiert. Die anschließende Analyse der Proben erfolgte wie unter (A) beschrieben. Das Ergebnis wurde zweimal reproduziert.

3.3.5. Die NLS-Motive in HpaA beeinflussen die T3S und Pathogenität von Xcv

Punktmutationen innerhalb der NLS-Sequenzmotive in HpaA verursachen ein vermindertes Wachstum *in planta* und eine Reduktion der Virulenz von Xcv (Huguet *et al.*, 1998). NLS-Signalsequenzen sind in Proteinen lokalisiert, welche in den Zellkern eingeschleust werden, um dort die Genexpression definierter Gene zu beeinflussen. Die Akkumulation von HpaA im Zellkern der Wirtszelle ist jedoch nicht essentiell für die Virulenz von Xcv (Lorenz *et al.*, 2008a). Dieses Ergebnis wies die Frage auf, warum Punktmutationen innerhalb der NLS-Sequenzmotive eine Reduktion der Virulenz von Xcv verursachen (Huguet *et al.*, 1998).

In Vorarbeiten wurden pDGW4M*hpaA*-Expressionskonstrukte erstellt, in denen das NLS1-Motiv $_{54}[\text{PRRRRRRG}]_{60}$ durch Alaninsubstitutionen in $_{54}[\text{PAAAAAG}]_{60}$ (NLS1m) oder das NLS2-Motiv $_{244}[\text{KPRR}]_{247}$ ebenfalls durch Alaninsubstitutionen in $_{244}[\text{AAAA}]_{247}$ (NLS2m) vollständig mutiert wurden (Lorenz, unpubliziert). Die Expressionskonstrukte wurden in die *hpaA*-Deletionsmutante transferiert und die erhaltenen Xcv-Stämme in *in vitro* und *in vivo*-Komplementationsanalysen untersucht. HpaA_{NLS1m}-c-Myc komplementierte den Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante *in vitro*, aber nicht *in vivo*. Für HpaA_{NLS2m}-c-Myc war der umgekehrte Fall zu beobachten (Lorenz, unpubliziert). Keine vollständige Komplementation *in vivo* war auch bei der ektopischen Expression von *hpaA-c-myc* (Plasmid pDGW4M) gegeben. Das pDGW4M-Konstrukt ist ein GATEWAY-kompatibles pDSK602-Derivat. Ein Nachteil des pDGW4M-Konstruktes ist, dass die DNA-Fragmente stromabwärts einer kodierenden Sequenz von 20 Aminosäuren inserieren mit unbekannter Auswirkung für das Fusionsprotein.

In dieser Arbeit wurden die *hpaA*_{NLS}-Mutanten in den *Golden-Gate*-kompatiblen Expressionsvektor pBRM kloniert (Kapitel 2.2.4). Während der Stamm 85* Δ *hpaA*, welcher *in trans hpaA*_{NLS2m}-c-myc exprimiert, reduzierte Krankheitssymptome in suszeptiblen Pflanzen und eine reduzierte HR in resistenten Pflanzen induzierte, führte der Stamm 85* Δ *hpaA*, welcher HpaA_{NLS1m}-c-Myc synthetisierte, zu keinen makroskopischen Reaktionen im Infektionsbereich (Abb. 36).

Der Phänotyp der *hpaA*-Deletionsmutante wurde erwartungsgemäß durch die ektopische Expression von *hpaA-c-myc* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors vom Konstrukt pBRM komplementiert (siehe Abschnitt 3.3.2). Der immunologische Nachweis der HpaA-Derivate erfolgte unter Verwendung des c-Myc-Epitop-spezifischen Antikörpers. Die HpaA-Derivate waren stabil synthetisiert. Die Überexpression der *hpaA*-Derivate in 85* übte keinen Einfluss auf die Virulenz von Xcv aus (Abb. 36).

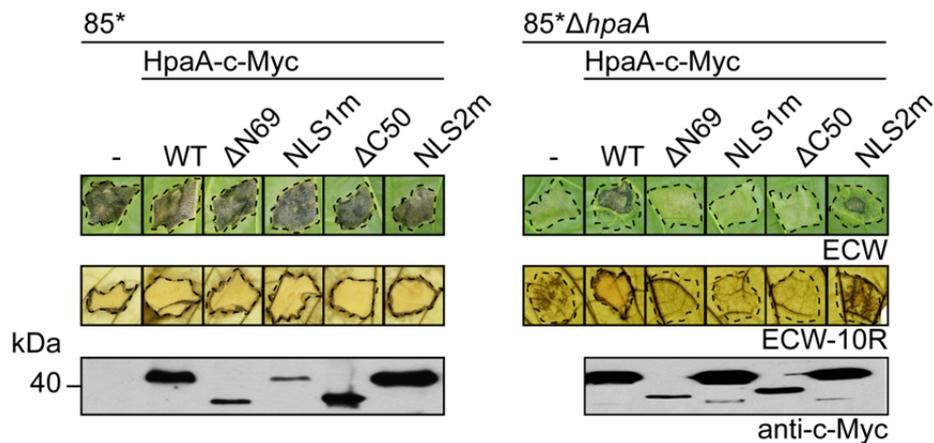


Abb. 36: Komplementationsstudien mit den HpaA-NLS-Mutanten.

Die *Xcv*-Stämme 85* und 85* $\Delta hpaA$ wurden jeweils ohne Konstrukt oder mit einem Expressionskonstrukt, welches für HpaA-c-Myc (WT), HpaA $_{\Delta N69}$ -c-Myc, HpaA-NLS1m-c-Myc, HpaA $_{\Delta C50}$ -c-Myc oder HpaA-NLS2m-c-myc kodierte, in Blätter von ECW- und ECW-10R-Paprikapflanzen mit einer Zelldichte von 1×10^8 kbE ml^{-1} infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Krankheitssymptome wurden nach 6 Tagen fotografisch dokumentiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.

Um den Einfluss der NLS-Mutationen in HpaA auf die Sekretion von HpaA und HrpF zu analysieren, wurden *in vitro*-Sekretionsanalysen durchgeführt. Die Expression von *hpaA* $_{NLS1m}$ -c-myc *in trans* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in 85* $\Delta hpaA$ besaß das Sekretionsmuster des Wildtyp-Stammes 85* (Abb. 37). Der Stamm 85* $\Delta hpaA$, welcher *hpaA* $_{NLS2m}$ -c-myc ektopisch exprimierte, komplementierte das Sekretionsdefizit der *hpaA*-Deletionsmutante nicht.

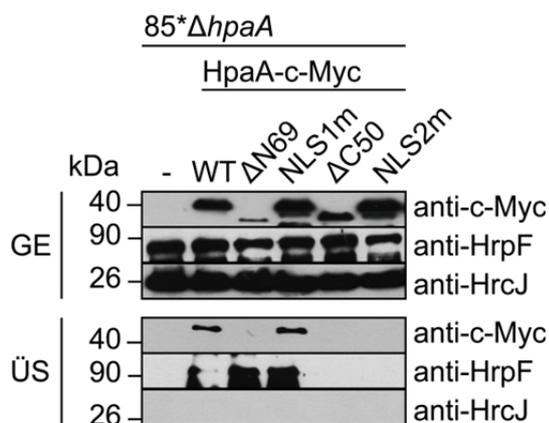


Abb. 37: Das NLS2-Sequenzmotiv in HpaA ist essentiell für die HrpF-Sekretion.

Es wurden die folgenden Stämme im Sekretionsmedium inkubiert: 85* $\Delta hpaA$, 85* $\Delta hpaA$, welcher HpaA-c-Myc (WT), HpaA $_{\Delta N69}$ -c-Myc, HpaA-NLS1m-c-Myc, HpaA $_{\Delta C50}$ -c-Myc oder HpaA-NLS2m-c-myc synthetisierte. Die Gesamtzellextrakte (Zellpellet) und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit den spezifischen Antikörper analysiert. Antikörperreaktionen wurden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Das Experiment wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das N-terminale NLS-Sequenzmotiv (NLS1) von HpaA nicht essentiell ist für die HpaA- und HrpF-Sekretion, dennoch aber entscheidend

ist für die Virulenz von *Xcv*. Das C-terminale NLS-Sequenzmotiv (NLS2) von HpaA fördert die Sekretion von HpaA und HrpF, ist jedoch nur partiell relevant für die Virulenz von *Xcv*.

Das NLS2-Sequenzmotiv ist lokalisiert in der putativen Interaktionsdomäne für HpaB. Um zu überprüfen, ob das HpaA-Derivat HpaA_{NLS2m} noch mit dem T3S-Chaperon HpaB interagiert, wurden *GST-pull down* Analysen durchgeführt. Erwartungsgemäß wurde die Interaktion zwischen HpaB und HpaA und keine Interaktion zwischen HpaB und dem HpaA-Derivat HpaA_{ΔC50} reproduziert (Abb. 38) (Lorenz *et al.*, 2008a). Interessanterweise coeluierte das HpaA-Derivat HpaA_{NLS2m}-c-Myc mit GST-HpaB, aber nicht mit GST. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion zwischen den genannten Proteinen hin.

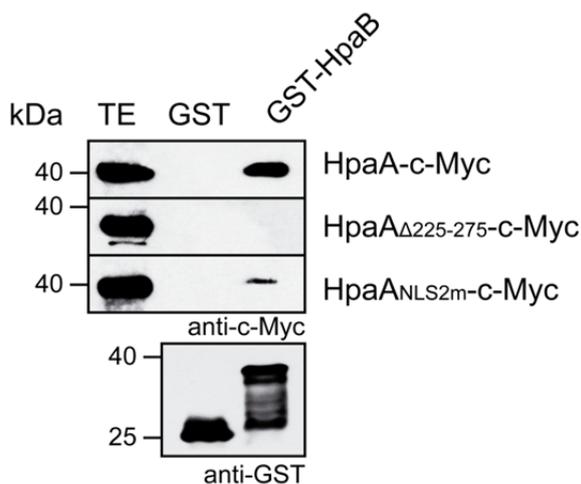


Abb. 38: GST-pull down Analysen der HpaA-Derivate mit GST-HpaB.

GST-HpaB wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *E. coli*-Lysaten inkubiert, welche C-terminal c-Myc-Epitop-markierte Derivate von HpaA, HpaA_{Δ225-275} und HpaA_{NLS2m} enthielten. Es wurden der Totalextrakt des *E. coli*-Lysates (TE, 5 μ l) sowie die Eluate (20 μ l) mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit GST und c-Myc-spezifischen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

Das C-terminale NLS-Sequenzmotiv ist vermutlich nicht die HpaB-Bindungsstelle, da eine Interaktion zwischen dem HpaA-Derivat mit der Mutation im NLS2-Sequenzmotiv und dem T3S-Chaperon HpaB mittels *GST-pull down* Analysen nachgewiesen werden konnte.

3.3.6. Die NLS-Sequenz in der N-terminalen Region von HpaA beeinflusst die Translokation von HpaA

Die Mutation im N-terminalen NLS-Sequenzmotiv von HpaA hat keine Auswirkung auf dessen Sekretion (siehe Abschnitt 3.3.2). Es sollte nun anhand von Translokationsanalysen die Frage geklärt werden, ob das NLS-Sequenzmotiv in der N-terminalen Region die Translokation von HpaA beeinflusst. Für die Translokationsanalysen wurden die HpaA-Derivate HpaA, HpaA_{N70} (die N-terminalen 70 Aminosäuren von HpaA), HpaA_{ΔN69}, HpaA_{NLS1m}, HpaA_{ΔC50} und HpaA_{NLS2m} als translationale Fusionen mit dem AvrBs3 Δ 2-Reporter erstellt. Die Stämme wurden zusammen mit den als Kontrolle dienenden Stämmen 85* und 85*, welcher AvrBs3 Δ 2 synthetisierte, in resistente Paprikapflanzen der Kultivare ECW-10R und ECW-30R infiltriert (Abb. 39).

Wie zu erwarten war, verursachten die Stämme 85* und 85*, welcher AvrBs3 Δ 2 synthetisierte, keine sichtbaren Reaktionen auf Blättern der ECW-30R-Pflanzen. Im Gegensatz dazu wurde wie erwartet HpaA-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{N70}-AvrBs3 Δ 2 durch den Stamm 85* transloziert und löste eine AvrBs3-spezifische HR aus (Lorenz *et al.*, 2008a).

Die Infiltration der Stämme 85*, welche die Fusionsproteine HpaA _{Δ N69}-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{NLS1m}-AvrBs3 Δ 2 synthetisierten, induzierte in Blättern von ECW-30R-Pflanzen keine AvrBs3-spezifische HR, während die Fusionsproteine HpaA _{Δ C50}-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{NLS2m}-AvrBs3 Δ 2 von 85* weiterhin transloziert werden und die AvrBs3-spezifische HR in den Pflanzenzellen auslöste (Abb. 39).

Die Fusionsproteine interferierten nicht mit der AvrBs1-spezifischen HR. Die Proteininstabilität wurde immunologisch nachgewiesen (Abb. 39).

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das N-terminale NLS-Sequenzmotiv von HpaA die Translokation von HpaA bestimmt.

Es ist bereits bekannt, dass ein Prolin-Arginin-reiches Motiv in der N-terminalen Region von T3-Effektoren die Translokation des Effektors beeinflusst (Escolar *et al.*, 2001; Prochaska *et al.*, 2018). Im Fall von XopB, AvrBs1 und AvrBsT, T3-Effektoren aus *Xcv*, konnte mit Hilfe von *in planta*-Translokationsanalysen bereits gezeigt werden, dass dieses N-terminale Motiv eine HpaB-abhängige Translokation vermittelt (Prochaska *et al.*, 2018).

Inwieweit der Verlust der HpaA-Translokation aufgrund der Mutation im NLS1-Motiv auf die Erkennung durch das T3S-Chaperon HpaB zurückzuführen ist, sollte anhand von Translokationsanalysen mit der *hpaB*-Deletionsmutante gezeigt werden.

Die Fusionsproteine HpaA_{N70}-AvrBs3 Δ 2 und HpaA _{Δ C50}-AvrBs3 Δ 2 wurden von dem Stamm 85* Δ *hpaB* transloziert (Abb. 39), was vermutlich an die Deletion der HpaB-Bindungsstelle in den Proteinen liegt (Lorenz *et al.*, 2008a). Wie zu erwarten war, wurden die Proteine AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2 und HpaA _{Δ N69}-AvrBs3 Δ 2 durch den Stamm 85* Δ *hpaB* nicht transloziert (Abb. 39). In diesen Proteinen ist entweder eine HpaB-Bindungsstelle lokalisiert (HpaA-AvrBs3 Δ 2 und HpaA_{NLS2m}-AvrBs3 Δ 2) oder das T3S-Signal und/oder Translokationssignal ist deletiert. Interessanterweise wurde im Gegensatz zu den bereits untersuchten Effektoren, XopB, AvrBs1 und AvrBsT (Prochaska *et al.*, 2018), HpaA_{NLS1m}-AvrBs3 Δ 2 durch den Stamm 85* Δ *hpaB* nicht transloziert.

Die Infiltration aller Stämme in Blätter der ECW-10R-Pflanze verursachte keine sichtbaren Reaktionen entsprechend des Phänotyps des Stammes 85* Δ *hpaB*. Die Fusionsproteine waren stabil synthetisiert (Abb. 39).

Mit Hilfe der *in vitro*-Translokationsanalysen konnte gezeigt werden, dass das N-terminale NLS-Sequenzmotiv die Translokation von HpaA beeinflusst. Dies erfolgt HpaB-unabhängig,

anders als im Fall von XopB, AvrBs1 und AvrBsT beschrieben wurde (Prochaska *et al.*, 2018).

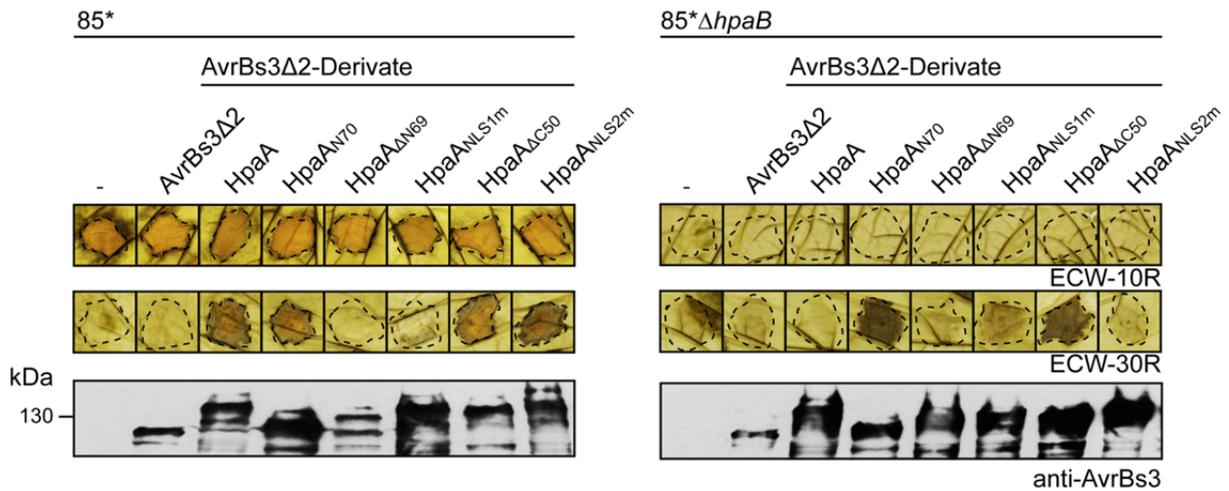


Abb. 39: Die Translokationsanalysen mit HpaA-Derivaten in 85* und 85* Δ hpaB.

(A) Es wurden die Stämme 85*, 85*, welcher AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2, HpaA_{N70}-AvrBs3 Δ 2, HpaA Δ N69-AvrBs3 Δ 2, HpaA_{NLS1m}-AvrBs3 Δ 2, HpaA Δ C50-AvrBs3 Δ 2 oder HpaA_{NLS2m}-AvrBs3 Δ 2 synthetisierten, in ECW-10R und ECW-30R-Pflanzen mit einer Zelldichte von 2×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers analysiert. Zur besseren Erkennung der HR wurden die Blätter zwei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert. (B) Der Stamm 85* Δ hpaB, welcher AvrBs3 Δ 2, HpaA-AvrBs3 Δ 2, HpaA_{N70}-AvrBs3 Δ 2, HpaA Δ N69-AvrBs3 Δ 2, HpaA_{NLS1m}-AvrBs3 Δ 2, HpaA Δ C50-AvrBs3 Δ 2 oder HpaA_{NLS2m}-AvrBs3 Δ 2 synthetisierte, wurde in ECW-10R und ECW-30R-Pflanzen mit einer Zelldichte von 4×10^8 kbE ml⁻¹ infiltriert. Für die Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Zellextrakt angepasst nach der OD₆₀₀ auf ein SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers analysiert. Zur besseren Visualisierung der HR wurden die Blätter drei Tage nach der Inokulation in Ethanol entfärbt. Die Umrandungen weisen auf die Inokulationsstellen hin. Die Ergebnisse wurden zweimal reproduziert

4. Diskussion

4.1. HrcS (SctS) von *Xcv*: eine essentielle T3-Komponente am Eingang des Exportkanals

Der Exportapparat wurde bisher in Translokations-assoziierten T3SS aus tierpathogenen Bakterien und im flagellären T3SS analysiert (Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2019; Torres-Vargas *et al.*, 2019). Er besteht aus den fünf konservierten hydrophoben Transmembranproteinen SctR, SctS, SctT, SctU und SctV, welche sich in der inneren Membran helikal zu einem Komplex aus fünf SctR, vier SctS, einem SctT und SctU sowie neun SctV Proteinen aufbauen (Wagner *et al.*, 2010; Abrusci *et al.*, 2013; Dietsche *et al.*, 2016; Zilkenat *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019; Torres-Vargas *et al.*, 2019). Über den Exportapparat aus pflanzenpathogenen Bakterien ist hingegen wenig bekannt.

4.1.1. HrcS ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor und interagiert mit T3-Komponenten des Exportapparates und des zytoplasmatischen Komplexes

Infektionsstudien und *in vitro*-Sekretionsstudien zeigten, dass HrcS essentiell ist für die Pathogenität von *Xcv* und die T3S (Kapitel 3.1.2.) (Huguet *et al.*, 1998). HrcS (SctS) assoziiert mit der bakteriellen Membran und wird nicht sekretiert (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). *In vitro*-Interaktionsstudien zeigten zudem, dass HrcS mit den Komponenten des T3SS interagiert, welchen in cryoelektronischen Aufnahmen vorhergesagt wird, eine räumliche Nähe zum Exportapparat des T3SS von tierpathogenen Bakterien oder des Flagellums zu besitzen (Kapitel 3.1.4.) (Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018). Demnach korrelieren die experimentellen Daten mit der bereits vermuteten Lokalisation von HrcS im Exportapparat.

Betrachtet man das aktuelle Modell des Exportapparates, welches dank cryoelektronischer Daten von dem flagellärem T3SS aus *Salmonella* spp. entstanden ist, so ist zu erkennen, dass fünf SctR-Proteine und ein SctT-Protein zu einer pseudo-hexameren Struktur assoziieren und sich an diesem R₅T₁-Komplex vier SctS-Proteine periphär außen anlagern (Abb. 40). Da vermutlich nur vier SctS-Proteine assoziieren, entsteht an dem fünften SctR-Protein eine Bindungslücke. Über *in vivo*-Photocrosslinking Studien wurde diese Position als Bindungsstelle für SctU identifiziert (Abb. 40) (Kuhlen *et al.*, 2018). SctV assoziiert als Innermembranring um den Exportapparat (Abrusci *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018).

Entsprechend dem Modell sollte HrcS aus *Xcv* mit sich selbst interagieren. Die HrcS-Selbstinteraktion konnte jedoch mittels GST-pull down Analysen nicht gezeigt werden

(Kapitel 3.1.4.). Der verwendete GST-tag hat ein Molekulargewicht von rund 26 kDa und ist fast dreimal so groß wie HrcS (8,9 kDa). Höchstwahrscheinlich verhindert der große GST-tag an GST-HrcS eine mögliche Interaktion mit HrcS-c-Myc. Unter diesen Umständen sollte für weiterführende *in vitro*-Interaktionsstudien bezüglich der HrcS-Selbstinteraktion ein kleineres Epitop, zum Beispiel Strep (Streptavidin) oder HA (*human influenza hemagglutinin*), im *pull down* verwendet werden.

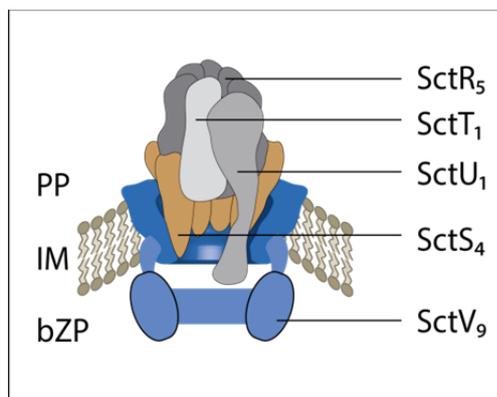


Abb. 40: Modell des SctR₅S₄T₁U₁-Komplexes im T3SS.

Fünf SctR-Proteine assoziieren angeordnet mit einem SctT-Protein zu einem Hexamer. Auf zytoplasmatischer Seite ordnen sich vier SctS-Proteine an vier der SctR-Proteine an. An dem fünften SctR-Protein neben SctT positioniert sich ein SctU-Protein mit seiner transmembranen Domäne, an der sich eine zytoplasmatische Domäne anschließt. Der SctV-Ring bettet den SctR₅S₄T₁U₁-Komplex in die Membran ein. Das Modell wurde erstellt anhand der Erkenntnisse von Kuhlen *et al.*, 2018. PP, Periplasma; IM, innere Membran; bZP, bakterielles Zytoplasma

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass HrcS mit der zytoplasmatischen Domäne von HrcV (SctV) interagiert (Kapitel 3.1.4.). Eine Interaktion von HrcS mit HrcU (SctU) wurde nicht detektiert (Kapitel 3.1.4.).

Interaktionen zwischen SctS und den Exportapparat-Komponenten SctV und SctU wurden bereits im flagellären T3SS aus *Salmonella* spp. beschrieben (Mcmurry *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu konnte für das HrcS-Homologe EscS aus dem enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) weder eine Interaktion für EscV noch für EscU nachgewiesen werden (Tseytin *et al.*, 2019). Womöglich besitzen diese Interaktionen eine zu schwache Affinität und befinden sich unter dem Detektionslimit oder im Fall von HrcU (SctU), welches im Exportapparat nur als Monomer vermutet wird, assoziiert in *Xcv* an den Exportapparat über eine Interaktion mit HrcR (SctR) oder HrcT (SctT) (Hu *et al.*, 2017; Kuhlen *et al.*, 2018; Tseytin *et al.*, 2019).

Für HrcS aus *Xcv* könnte in zukünftigen Interaktionsstudien untersucht werden, ob HrcS, da es nach dem Modell vermutlich periphär an den R₅T₁-Komplex assoziiert, mit der zytoplasmatischen Domäne von HrcU interagiert. Um weiterhin den Aufbau des Exportapparates zu bestätigen, sollten die Interaktionen zwischen HrcS und den Komponenten des Exportapparates HrcR und HrcT sowie die HrcS- und HrcR-Selbstinteraktion analysiert werden.

In den durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde weiterhin eine Interaktion zwischen HrcS und der ATPase HrcN (SctN) sowie dem ATPase Regulator HrcL (SctL) detektiert (Kapitel 3.1.4.). Diese Interaktionen wurden in T3SS oder Flagellen bislang nicht beschrieben. Eine mögliche Regulation der Assoziation von HrcS an den R₅T₁-Komplex

durch die ATPase und seinem Regulator ist eher unwahrscheinlich, da sich nach dem Modell der Assemblierung des T3SS zuerst der Exportapparat aufbaut, dann die Innermembranringkomponenten und schließlich der zytoplasmatische Komplex mit der ATPase und seinem Regulator assoziiert (Abb. 41) (Diepold *et al.*, 2010; Burkinshaw und Strynadka, 2014; Wagner *et al.*, 2018).

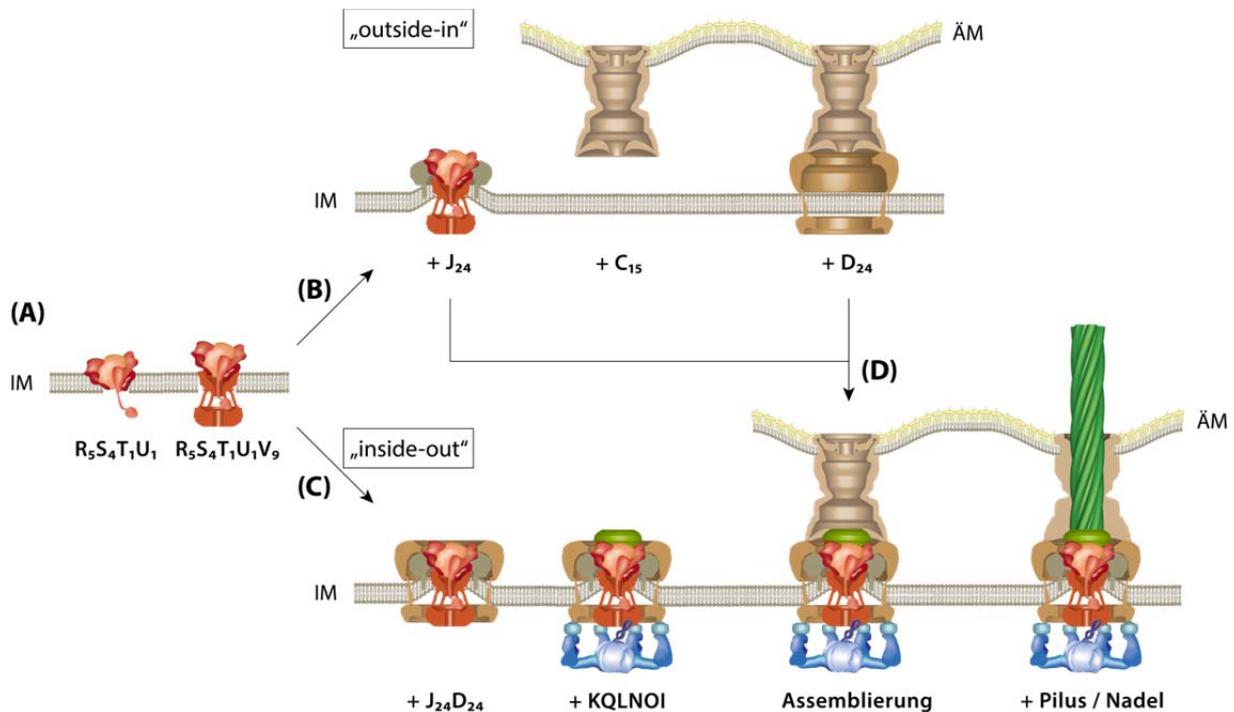


Abb. 41: Modell zur Assemblierung der T3SS.

(A) Der Exportapparat in der inneren Membran (IM) setzt sich helikal zusammen zunächst aus einem SctR-Pentamer an dem sich ein SctT und vier SctS anlagern. Der Kernkomplex windet sich aus der Membran bei der Assemblierung von SctU und neun SctV. (B) „Outside-in“-Assemblierungsmodell mit unabhängiger Sekretin-Assemblierung nach Diepold *et al.*, 2010. Die Sekretin-Untereinheiten SctC assemblieren und formen eine Pore in der äußeren Membran (ÄM). Das Sekretin rekrutiert anschließend die äußere Innerringkomponente SctD, welche an den vollständigen SctJ-Exportapparat assembliert. (C) „Inside-out“-Assemblierungsmodell nach Burkinshaw *et al.*, 2015. An dem Exportapparat assemblieren die inneren und äußeren Innermembranringe SctJ und SctD. Die zytoplasmatischen Komponenten lagern sich an die zytoplasmatischen Domänen von SctV und SctD an. Anschließend assembliert das Sekretin. (D) Nach der Assemblierung wird der Pilus bzw. die Nadel aufgebaut. Die Untereinheiten des „inner rod“-Komplexes SctI und des Pilus SctF werden als „frühe“ Substrate T3-abhängig sekretiert.

Die Proteinennamen sind in Großbuchstaben angegeben, ohne den Vorsatz „Sct“. Das Modell ist von links nach rechts entlang der Pfeile zu betrachten. rot, Exportapparat; blau, zytoplasmatische Komponenten; braun, Basalapparat; grün, extrazellulären Komponenten; Abbildung verändert nach Wagner *et al.*, 2018.

Die Interaktion zwischen HrcS und HrcN bzw. HrcL als auch die zuvor diskutierten Interaktionen zwischen HrcS und HrcV bzw. HrcU, sollten zusätzlich zum GST-pull down mit Hilfe einer anderen Methode überprüft werden.

4.1.2. Agiert HrcS als Akzeptor für Chaperone und T3-abhängig sekretierte Substrate?

T3-abhängig sekretierte Substrate werden auf bislang unbekanntem Weg zum Exportapparat rekrutiert und passieren dort den T3-Transportkanal, um ins extrazelluläre Milieu sekretiert oder in die Wirtszelle transloziert zu werden. HrcV und HrcU, zwei Komponenten des Exportapparates, und der zytoplasmatische Ring HrcQ konnten bereits als Akzeptorstellen, welche Substrate empfangen und vermutlich für die Sekretion und/oder Translokation weiterleiten, identifiziert werden (Lorenz *et al.*, 2012; Hartmann und Büttner, 2013; Hausner und Büttner, 2014). In dieser Arbeit zeigten *in vitro*-Interaktionsstudien, dass HrcS als weitere Komponente des T3SS mit den Kontrollproteinen HpaA, HpaB und HpaC und den Effektoren XopJ und XopF1 womöglich interagiert (Kapitel 3.1.4.).

Eine mögliche Theorie für den Substrat-Transport ist, dass die Chaperon-Substrat-Komplexe von der Substrat-Sortierungsplattform (Lara-Tejero *et al.*, 2011) zunächst an den ATPase-Komplex geleitet werden (Abb. 42). Dieser setzt die Substrate unter ATP-Verbrauch aus dem Chaperon-Substrat-Komplex frei (Lorenz und Büttner, 2009).

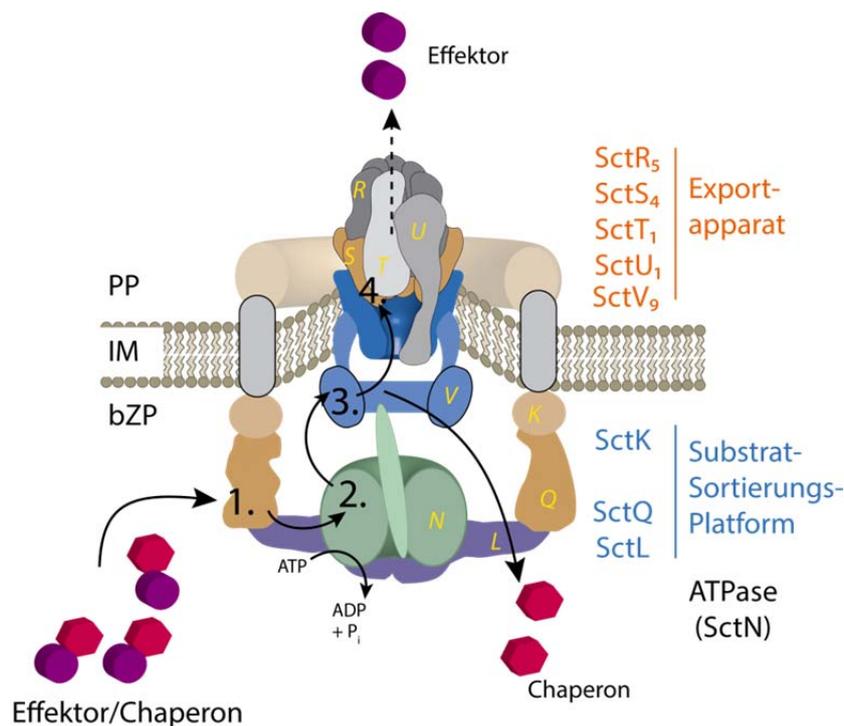


Abb. 42: Modellvorstellung für die Substraterkennung und -weiterleitung am T3SS.

Das T3-Substrat bzw. der Effektor wird mit Hilfe seines Chaperons zum T3SS rekrutiert. Dort angekommen wird es zuerst (1.) von dem Substrat-Sortierungs-Komplex als T3-Substrat erkannt und an die ATPase weitergereicht. 2. An der ATPase dissoziiert das Substrat von seinem Chaperon unter ATP-Verbrauch. Das Substrat wird über die zytoplasmatische Domäne von HrcV (3.) weiter zum Exportapparat (4.) des T3SS gereicht an dessen Peripherie HrcS lokalisiert ist.

Anschließend übergeben die zytoplasmatischen Domänen von SctV und/oder SctU (Lorenz und Büttner, 2011; Hartmann und Büttner, 2013) die Substrate an den Exportapparat, an dessen Peripherie SctS sitzt (Kuhlen *et al.*, 2018). Eine Interaktion zwischen HrcS und der zytoplasmatischen Domäne von HrcV (SctV) wurde in *GST-pull down* Analysen nachgewiesen. SctS vermittelt dann vermutlich den Eintritt des Substrates in den Exportkanal.

Eine direkte Interaktion zwischen HrcS (SctS) und HrcQ (SctQ), eine wesentliche Komponente der Substrat-Sortierungsplattform, wäre bei diesem Sekretionsmodell nicht essentiell und wurde auch nicht beobachtet (Kapitel 3.1.4.).

Eine weitere entscheidende Rolle in diesem Sekretionsmodell würde die zytoplasmatische Domäne von HrcS (SctS) spielen. Womöglich steuert sie die Weitergabe des Substrates von HrcV in den Exportkanal. In zukünftigen Studien wäre zu überprüfen, ob die zytoplasmatische Domäne von HrcS essentiell ist für die T3S und die Pathogenität von *Xcv*. In Interaktionsstudien mit HrcS-Derivaten könnten die Bereiche, an denen die zytoplasmatischen Komponenten des T3SS (HrcV, HrcN, HrcL), die Chaperone und die T3S-Substrate (XopJ, XopF1) binden, identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in silico*-Analysen beschreiben ein konserviertes hydrophobes Sequenzmotiv $A_{13}-(X)_4-L_{18}$ in der N-terminalen Domäne (Kapitel 3.1.1.). Um den Beitrag dieses Sequenzmotives zur Proteinfunktion untersuchen zu können, sollten HrcS-Derivate mit Punktmutationen im $A_{13}-(X)_4-L_{18}$ -Motiv auf ihre Interaktion mit den vorher identifizierten Bindungspartnern von HrcS analysiert werden. Des Weiteren sollte der Einfluss dieser Mutation auf die T3S und Pathogenität von *Xcv* überprüft werden.

Interessanterweise wird für das HrcS-Homologe Protein FliQ (SctS) im flagellären T3SS aus *Salmonella* spp. keine N-terminale zytoplasmatische Domäne vorhergesagt (Kuhlen *et al.*, 2018). Stattdessen werden für das kleine Protein zwei Transmembrandomänen prognostiziert (Dietsche *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2016; Kuhlen *et al.*, 2018). Sollte die Mutation im $A_{13}-(X)_4-L_{18}$ -Motiv von HrcS lediglich einen Einfluss auf die Interaktion mit den zytoplasmatischen Bindungspartnern aufweisen und keine Auswirkung auf die periplasmatischen Bindungspartner aufzeigen, würde das Ergebnis für die vorhergesagte Struktur von HrcS mit nur einer Transmembrandomäne flankiert von einer zytoplasmatischen und einer periplasmatischen Domäne sprechen (Berger *et al.*, 2010).

4.1.3. Die periplasmatische Domäne von HrcS ist essentiell für die Pathogenität von *Xcv* und T3S

Die C-terminale periplasmatische Domäne von HrcS hat eine Größe von 30 Aminosäuren (Berger *et al.*, 2010). Durch den Sequenzvergleich mit HrcS-homologen Proteinen lässt sich ein konserviertes Sequenzmotiv in der C-terminalen Domäne erkennen, welches als $K_{54}-(X)_3-V_{58}-(X)_3-I/L_{62}-(X)_5-W_{68}$ bezeichnet wird (Kapitel 3.1.1.). Die Deletion der C-terminalen Domäne von HrcS führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität von *Xcv* (Kapitel 3.1.2.). *In vitro*-Sekretionsanalysen zeigten, dass die Deletion dieser Domäne die Sekretion von HrpF und HrpB2 blockiert.

In Protein-Protein-Interaktionsstudien mit HrcS wurde neben zahlreichen zytoplasmatischen Komponenten des T3SS auch die periplasmatische Komponente HrpB1 als möglicher Interaktionspartner *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Kapitel 3.1.4.). HrpB1 ist eine essentielle periplasmatische Komponente des T3SS in *Xcv* und ist vermutlich ein Bestandteil des putativen „*inner rod*“-Komplexes zusammen mit HrpB2 (Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013). Fehlt HrpB1 erfolgt keine Sekretion von HrpB2, vom Pilusprotein HrpE und vom Translokonprotein HrpF (Rossier *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013). Daher ist der Einbau von HrpB1 in den putativen „*inner rod*“-Komplex vermutlich essentiell für die weitere Assemblierung des T3SS (Rossier *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013; Torres-Vargas *et al.*, 2019).

Die nachgewiesene Interaktion zwischen dem periplasmatischen Protein HrpB1 und HrcS lässt vermuten, dass HrcS an dem Aufbau und der Stabilisierung des „*inner rod*“-Komplexes beteiligt ist. Interessanterweise zeigt der *Xcv*-Stamm mit der Deletion der C-terminalen Domäne von HrcS einen vergleichbaren Phänotyp wie die *hrpB1*-Deletionsmutante (Rossier *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013). Im Einklang damit konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl HrpB1 als auch die C-terminale Domäne von HrcS in *Xcv* im Periplasma lokalisiert sind (Berger *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2012; Hausner *et al.*, 2013). Vermutlich unterstützt HrcS über seine periplasmatische Domäne die Assoziation von HrpB1 an das T3SS. Ob die C-terminale periplasmatische Domäne von HrcS eine Bindungsdomäne für HrpB1 besitzt, könnten Interaktionsstudien, zum Beispiel GST-*pull down* Analysen, mit dem HrcS-Deletionsderivat zeigen.

Im Bezug auf HrpB1 sind bereits Derivate bekannt (HrpB1_(C96A) und HrpB1_(L128A)), welche weiterhin mit den HrpB1-Interaktoren HrpB1, HrpB2, HrpE, HrcD, HrcC und Peptidoglykan interagieren, jedoch einen Verlust der Virulenz in *Xcv* hervorrufen (Hausner *et al.*, 2013). Womöglich hat eine oder sogar beide Aminosäuresubstitutionen Einfluss auf die Interaktion mit HrcS. Weitere Interaktionsstudien mit Derivaten von HrcS und HrpB1 könnten Aufschluss über die Interaktion zwischen den beiden Proteinen geben. Eine Interaktion zwischen SctS

und dem „*inner rod*“-Proteinen wurde bisher bei T3SS aus tierpathogenen Bakterien nicht beschrieben. Es wird lediglich eine Interaktion zwischen SctR bzw. SctT und den „*inner rod*“-Proteinen postuliert (Torres-Vargas *et al.*, 2019)

Die Analyse von Punktmutationen und Deletionen in HrcS sollte den Einfluss der periplasmatischen Domäne und den konservierten Aminosäuren auf die Virulenz, T3S, HrpB1-Interaktion und HrcR/S/T-Interaktion klären.

Bereits durchgeführte Experimente mit kleineren Deletionen von drei bis vier Aminosäuren ($\Delta 54-58$, $\Delta 61-65$, $\Delta 73-76$, $\Delta 80-84$) in der periplasmatischen Domäne von HrcS führten stets zu einem Verlust der Pathogenität von *Xcv* (Otten, C., Hausner, J. und Büttner, D., unveröffentlicht). Diese Deletionen lagen nicht in allen Fällen im konservierten Sequenzmotiv, verursachten aber dennoch eine Kürzung der periplasmatischen Domäne von HrcS. Womöglich ist die Länge der periplasmatischen Domäne essentiell für die Interaktion mit dem periplasmatischen Protein HrpB1 oder HrcR/S/T. Interaktionsstudien zur möglichen Klärung dieses Sachverhaltes stehen noch aus.

Des Weiteren wurden Infektionsexperimente und *in vitro*-Sekretionsanalysen mit HrcS-Mutanten durchgeführt, bei denen insbesondere das K₅₄ aus dem konservierten Sequenzmotiv als essentielle Aminosäure für die Funktion von HrcS identifiziert wurde (Otten, C., Hausner, J. und Büttner, D., unveröffentlicht).

Bereits bei den HrcS-Homologen aus den flagellären und tierpathogenen T3SS ist bekannt, dass die Aminosäure K₅₄ Salzbrücken zum E₄₆ des benachbarten SctS im Exportapparat aufbaut (Kuhlen *et al.*, 2018; Tseytin *et al.*, 2019). Das Fehlen der Salzbrücken hat keinen Einfluss auf die SctS-Selbstinteraktion, bedingt jedoch eine verformte 3D-Anordnung des Exportapparates in der inneren Membran, was im Einzelnen die Assoziation des zytoplasmatischen Ringes SctQ hemmt und letztendlich die T3S blockiert (Kuhlen *et al.*, 2018; Tseytin *et al.*, 2019). Um Herauszufinden, ob das K₅₄ in HrcS aus *Xcv* ebenfalls Salzbrücken aufbaut zur Stabilisierung des Exportapparates in der inneren Membran, kann überprüft werden, ob die HrcS-Punktmutante in *Xcv* ähnlich der EscS-Mutante in *EPEC* unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Reduktion der Foci-Anzahl von GFP-HrcQ bewirkt (Tseytin *et al.*, 2019). Die Fluoreszenzmikroskopie ist mittlerweile eine gängige Methode zur Untersuchung der Assemblierung des T3SS. Dabei werden komplexbildende Komponenten des T3SS mit Fluoreszenzproteinen translational fusioniert, welche anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop als distinkte Fluoreszenzpunkte (Foci) in der Zelle zu sehen sind (Diepold *et al.*, 2010; Li und Sourjik, 2011; Morimoto *et al.*, 2014; Diepold *et al.*, 2015). In *Xcv* wurde bereits HrcQ-sfGFP auf diese Weise analysiert (Hausner *et al.*, 2019).

4.2. HrpB7 ist ein Mitglied der Proteinfamilie HrpO/FliJ/YscO

Zu Beginn dieser Arbeit war über das Protein HrpB7 aus *Xcv* nicht viel bekannt. Es existierte eine *hrpB7*-Mutante, die von Codon 28 bis 125 eine Deletion trägt. Diese Mutante baute keine T3S-Pili auf, was vermutlich zum vollständigen Verlust der Pathogenität beitrug (Weber *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bioinformatische Analysen durchgeführt auf der Suche nach essentiellen Sequenz- und Strukturmotiven, welche die Funktion von HrpB7 für die T3S definieren könnten. Einige der Motive wurden in dieser Promotionsarbeit analysiert (Kapitel 3.2.).

4.2.1. HrpB7 formt hochmolekulare Komplexe durch die Bildung von intra- und intermolekularen *coiled-coil* Strukturen

Die *in silico*-Analysen mit HrpB7 zeigten, dass das 18,8 kDa große Protein in der N- und C-terminalen Region Leucin-Heptadenmuster besitzt, welche die Grundlage sind zur Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen (Kapitel 3.3.1.) (Burkhard *et al.*, 2001; Mason und Arndt, 2004). Ein *coiled-coil* Motiv besteht aus zwei oder mehr α -Helices, die sich zu einer linksdrehenden Superhelix umeinander winden (Burkhard *et al.*, 2001; Mason und Arndt, 2004). In Übereinstimmung dazu wurde für HrpB7 von SWISS-MODEL eine Proteinstruktur vorhergesagt, bestehend aus zwei um sich gewundenen α -Helices (Kapitel 3.2.1.). *Coiled-coil* Motive unterstützen die Oligomerisierung innerhalb von und zwischen Proteinen (Burkhard *et al.*, 2001; Mason und Arndt, 2004). Zudem wird diese Oligomerisierung noch stabilisiert, wenn sich, wie im Fall von HrpB7, Cysteine im Leucin-Heptadenmuster befinden zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Helices (Kapitel 3.2.1.) (Zhou *et al.*, 1993; Haudenschild *et al.*, 1995; Drehkopf *et al.*, 2020). Im Einklang mit den *in silico*-Daten zeigt HrpB7 in Proteingelen hochmolekulare Komplexe, die hitzestabil sind und keine Veränderungen in 4 M Harnstoff oder 50 % (v/v) β -Mercaptoethanol besitzen (Kapitel 3.2.3.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Höchstwahrscheinlich sind die Disulfidbrücken durch die Windung der α -Helices im Inneren der *coiled-coil* Struktur lokalisiert, sodass das β -Mercaptoethanol diese nicht reduzieren kann. Im Fall des Harnstoffs sollte in einem weiteren Versuch eine höhere Konzentration verwendet werden (circa 6-8 M) (Scholtz *et al.*, 1995; Bennion und Daggett, 2003).

Der Austausch der Cysteine gegen Alanin im Leucin-Heptadenmuster (Kapitel 3.2.4.) ebenso wie ein Austausch der Leucine in den N- und C-terminalen Heptadenmuster gegen Serin oder Glycin und damit die Auflösung der Heptadenmuster (Drehkopf *et al.*, 2020), beeinträchtigten die Komplexbildung von HrpB7. Dies bestätigt, dass die Leucin-Heptadenmuster als auch die Disulfidbrücken die HrpB7-Komplexe stabilisieren (Kapitel

3.2.4.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Die HrpB7-Selbstinteraktion wurde zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit mittels MST quantifiziert (Kapitel 3.2.6.). Demnach ist HrpB7 hochaffin mit einer Dissoziationskonstante des Komplexes von 127 nM. Für das HrpB7-Homolog CT670 wurde eine deutlich höhere Dissoziationskonstante mit 500 μ M vermessen (Lorenzini *et al.*, 2010). Je kleiner der Wert einer Dissoziationskonstante ist, desto stärker die Bindung. Höchstwahrscheinlich haben die Disulfidbrücken in HrpB7 aus *Xcv* einen großen Einfluss auf die Dissoziationskonstante des HrpB7-Komplexes. CT670 aus *C. trachomatis* weist keine Cysteine im Leucin-Heptadenmuster auf (Kapitel 3.2.1.).

4.2.2. HrpB7 besitzt Gemeinsamkeiten zu Vertretern der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie

Kleine Proteine mit einem *coiled-coil* Proteinfaltungsmotiv sind bereits aus dem tierpathogenen und flagellären T3SS bekannt (Evans *et al.*, 2006; Gazi *et al.*, 2008; Cherradi *et al.*, 2014). Trotz geringer Sequenzidentität untereinander besitzen diese Proteine eine *coiled-coil* Struktur, sind im *hrp*-Gencluster stromabwärts der T3SS-ATPase kodiert und essentiell für die Pathogenität des Bakteriums. Diese Proteine werden in der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie zusammengefasst (Evans *et al.*, 2006; Gazi *et al.*, 2008; Cherradi *et al.*, 2014). HrpB7 aus *Xcv* ist vermutlich auf Grund der gleichen Merkmale ein Teil dieser Proteinfamilie (Drehkopf *et al.*, 2020).

HrpB7 ist essentiell für die T3-abhängige Sekretion vom „*inner rod*“-Protein HrpB2, dem Translokonprotein HrpF, Effektoren und wird selbst nicht sekretiert (Kapitel 3.2.2.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Translokationsanalysen bestätigten in weiterführenden Experimenten den Verlust der Effektortranslokation in einer *hrpB7*-Deletionsmutante (Drehkopf *et al.*, 2020).

Die Proteine der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie, die dem tierpathogenen oder flagellären T3SS angehören, sind ebenfalls essentiell für die T3S (Evans *et al.*, 2006; Gazi *et al.*, 2008; Cherradi *et al.*, 2014). Bezüglich der eigenen T3-abhängigen Sekretion dieser kleinen Proteine herrschte zunächst Uneigigkeit. So wird das HrpB7-Homolog YscO aus *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica* T3-abhängig sekretiert, während YscO aus *Yersinia pseudotuberculosis* oder Spa13 aus *Shigella flexneri* nicht im Überstand detektierbar sind (Payne und Straley, 1998; Diepold *et al.*, 2012; Mukerjea und Ghosh, 2013; Cherradi *et al.*, 2014). Die Diskrepanz der experimentellen Daten von *Yersinia* spp. fiel bereits den Autoren Mukerjea und Ghosh in ihrer Publikation 2013 auf (Mukerjea und Ghosh, 2013). Daher untersuchten sie in einem zusätzlichen Sekretionsassay die Sekretion des endogenen YscO Proteins mit Hilfe eines polyklonalen anti-YscO-Antikörpers. Dieses Experiment bestätigte, dass YscO aus *Yersinia pseudotuberculosis* nicht sekretiert wird in Übereinstimmung mit den

Daten zu Spa13 aus *Shigella flexneri* und HrpB7 aus *Xcv* (Mukerjea und Ghosh, 2013; Cherradi *et al.*, 2014; Drehkopf *et al.*, 2020).

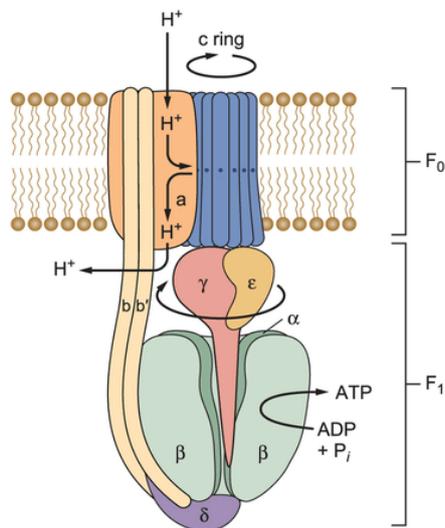
HrpB7 bildet stabile Komplexe (Kapitel 3.2.3.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Auch die Mitglieder der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie zeigen Dimerisierung, Trimerisierung und Tetramerisierung (Fraser *et al.*, 2003; Lorenzini *et al.*, 2010). Von potentiellen *coiled-coil* Proteinen wäre nicht nur eine Selbstinteraktion, sondern auch eine Interaktion zu anderen umgebenden Komponenten zu erwarten (Delahay und Frankel, 2002). So interagiert zum Beispiel Spa13 aus *Shigella flexneri* mit der ATPase SctN, der zytoplasmatischen Ring-Komponente SctQ und den Exportapparat-Komponenten SctV und der gespaltenen Form von SctU (Cherradi *et al.*, 2014). Im flagellärem T3SS wurde eine Interaktion zwischen dem HrpB7-Homolog FliJ und dem ATPase-Regulator SctL, SctV sowie zu Chaperonen nachgewiesen (González-Pedrajo *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2006; Ibuki *et al.*, 2013). Im Einklang zu den Vertretern der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie interagiert HrpB7 von *Xcv* in *in vitro*-Interaktionsstudien mit dem Chaperon HpaB, mit HpaA, HrcV, HrcL und HrcQ (Kapitel 3.2.5.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Als weitere mögliche Interaktionspartner konnten die ATPase HrcN und die Innermembranring-Komponente HrcD detektiert werden (Drehkopf *et al.*, 2020). Keine Interaktion war zwischen HrpB7 und dem T3S4-Protein HpaC sowie zwischen HrpB7 und den Effektoren XopJ und XopF1 nachweisbar (Kapitel 3.2.5.).

Da HrpB7 und die Proteine der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie allgemein betrachtet mit Komponenten des zytoplasmatischen Komplexes und Innermembranring-Komponenten interagiert, wird eine Lokalisation im zytoplasmatischen Komplex vermutet (González-Pedrajo *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014; Drehkopf *et al.*, 2020). Lokalisierungsstudien diesbezüglich zeigten, dass HrpB7 als Monomer und in Form von Komplexen unter T3SS-induzierenden Bedingungen sowohl im bakteriellen Zytoplasma als auch an der bakteriellen Membran lokalisiert (Kapitel 3.2.3.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Dabei ist zu vermerken, dass HrpB7 an die innere Membran auf zytoplasmatischer Seite assoziiert und nicht in die Membran inseriert unabhängig von anderen Komponenten des T3SS (Drehkopf *et al.*, 2020). Interessanterweise ist auch das HrpB7-Derivat, in der die Leucine im N- und C-terminalen Heptadenmuster gegen Glycine ausgetauscht sind und keine Komplexe formt, sowohl im bakteriellen Zytoplasma als auch an der bakteriellen Membran lokalisiert (Drehkopf *et al.*, 2020). Dies lässt vermuten, dass die Membranassoziiierung von HrpB7 nicht von der *coiled-coil* Struktur des Proteins gesteuert wird, sondern möglicherweise von einem anderen Sequenzmotiv abhängig ist. Der Nachweis dieser Theorie steht noch aus.

4.2.3. HrpB7 ist Bestandteil des zytoplasmatischen Komplexes im T3SS

Die Lokalisierung von HrpB7 auf zytoplasmatischer Seite der inneren Membran, sowie die nachgewiesenen putativen Interaktionspartner deuten an, dass HrpB7 ein Bestandteil des zytoplasmatischen Komplexes im T3SS ist (Kapitel 3.2.5.) (Drehkopf *et al.*, 2020). Ähnlich zu HrpB7 wird auch für die homologen Proteine eine Membranassoziation postuliert (Payne und Straley, 1998; Cherradi *et al.*, 2014). Interessanterweise deuten Kristallstrukturen von FliJ und CT670 daraufhin, dass die Proteine der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie strukturelle Ähnlichkeit zur γ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase besitzen, welche die zentrale Säule der hexameren ATPase ist (Abb. 43 A) (Lorenzini *et al.*, 2010; Ibuki *et al.*, 2013; Kondo *et al.*, 2018; Majewski *et al.*, 2019). Die γ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase besteht ebenfalls aus einer N- und einer C-terminalen Helix, wobei die N-terminale Helix die ATP-Hydrolyse steigert und die C-terminale Helix essentiell ist für die Assemblierung des ATPase-Hexamers (Kondo *et al.*, 2018).

(A) aus (Preiss *et al.*, 2015)



(B) Modell des HrpB7-HrcN-Komplexes (nach Majewski *et al.*, 2019)

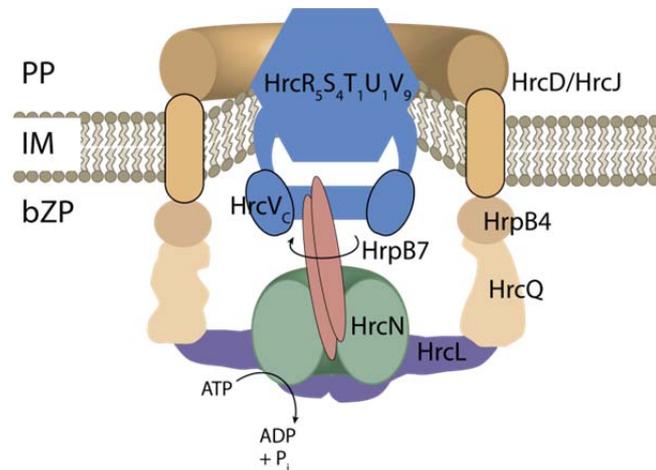


Abb. 43: Vergleich der F_0F_1 -ATP-Synthase mit dem Modell des HrpB7-HrcN-Komplexes.

(A) Es ist ein Modell der bakteriellen F_0F_1 -ATP-Synthase dargestellt. Das Enzym setzt sich zusammen aus einem Kopfteil, der F_1 -ATPase, und einem transmembranen Teil, F_0 genannt. F_0 und F_1 bestehen aus mehreren Untereinheiten, wie in der Abbildung gezeigt ist. Der rotierende Stiel, die γ -Untereinheit (rot), ist assoziiert mit dem Rotor c (blau), der sich in der Membran dreht. Der Stator besteht aus Transmembranuntereinheiten a und weitere Untereinheiten b und δ , die einen länglichen Arm bilden, um die katalytische α/β -Untereinheit zu fixieren. (B) Ein Modell des HrpB7-HrcN-Komplexes ist gezeigt. HrpB7 (rot) interagiert als Dimer mit der ATPase HrcN (grün) und vermutlich durch die ATPase hindurch mit HrcL (lila). Durch eine mögliche Rotationsbewegung von HrpB7, hervorgerufen durch die ATP-Hydrolyse von HrcN, assoziiert HrpB7 zeitweise mit HrcV_c, HrcS und vermutlich weiteren Komponenten des Exportapparates. Die Fixierung der ATPase erfolgt über die Komponenten HrcL, HrcQ, HrpB4 und den Transmembranproteinen HrcJ und HrcD.

Für die HrpB7-homologen Proteine FliJ und EscO wurde bereits ein positiver Effekt für die ATPase-Hexamersierung und ATPase-Aktivität gezeigt (Fraser *et al.*, 2003; Lorenzini *et al.*, 2010; Ibuki *et al.*, 2011; Ibuki *et al.*, 2013; Cherradi *et al.*, 2014; Romo-Castillo *et al.*, 2014; Majewski *et al.*, 2019). Im Gegensatz zu EscO und FliJ zeigten weiterführende Analysen, dass HrpB7 die ATPase-Aktivität von HrcN *in vitro* vermutlich nicht beeinflusst (Drehkopf *et al.*, 2020). Des Weiteren deuten Fluoreszenzmikroskopiestudien an, dass HrpB7 möglicherweise nicht für die Assemblierung des ATPase-Hexamers essentiell ist (Drehkopf *et al.*, 2020). Allerdings fehlen diesbezüglich noch weitere Analysen. Es ist dennoch möglich, dass HrpB7 keinen Einfluss auf die ATPase besitzt, da auch für YscO aus *Yersinia* spp. dies nicht bestätigt werden konnte (Riordan und Schneewind, 2008; Diepold *et al.*, 2012; Mukerjea und Ghosh, 2013). Eine cryoelektronische Aufnahme des EscO-EscN-Komplexes bestätigte weiterhin die Theorie, dass von EscO, wie bei der γ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase, die C- und N-terminalen *coiled-coil* Regionen in die C-terminale Öffnung des ATPase-Hexamers inserieren (Majewski *et al.*, 2019). Inwieweit EscO als Monomer oder Dimer inseriert, ist unklar, da EscO in der cryoelektronischen Aufnahme nicht vollständig aufgelöst war. Es wird vermutet, dass EscO entsprechend dem katalytischem Mechanismus der ATPase rotiert analog zur γ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase (Abb. 43 B) (Majewski *et al.*, 2019). Die Aufgabe der Rotation besteht vermutlich darin die freigesetzten Chaperone aus den Chaperon-Substrat-Komplexen von der ATPase zu lösen (Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014).

Es wäre denkbar, dass HrpB7 in den vorhergesagten Komplex mit dem ATPase-Hexamer als Dimer assoziiert, da das Strukturvorhersageprogramm *ProCoil* (Mahrenholz *et al.*, 2011) eine Dimerisierung postuliert. Über eine mögliche Rotation, ähnlich der γ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase, könnte HrpB7 mit den Interaktoren HrcV und HrcS assoziieren und zugleich die Chaperone von der ATPase HrcN befreien (Abb. 43 B) (siehe Kapitel 4.2.2.) (Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014). Kristallstrukturen oder cryoelektronische Aufnahmen des zytoplasmatischen Komplexes könnten einen tieferen Einblick in dessen Aufbau gewähren. Die Funktion als „Chaperon-Freisetzer“ könnte untersucht werden, indem HrpB7 in den *chaperone release assay* nach Lorenz *et al.*, 2009 mit zugegeben wird. Hierbei ist das Chaperon HpaB über ein GST-Epitop an Glutathion-Sepharose immobilisiert und wird mit aus *E. coli* gereinigten Strep-HrcN inkubiert (Lorenz und Büttner, 2009). Nach der Entfernung ungebundener Proteine könnte aus *E. coli* gereinigtes HrpB7 zum Ansatz hinzugegeben werden. Die Detektion von HrcN im Überstand wäre ein Hinweis, ob HrpB7 freie Chaperone von der ATPase HrcN lösen kann.

4.2.4. Die Komplexbildung und das Glutamat-reiche Motiv in HrpB7 fördern die T3S und die Pathogenität von *Xcv*

Durch den Austausch der Leucine (Drehkopf *et al.*, 2020) oder Cysteine (Kapitel 3.2.4.) (Drehkopf *et al.*, 2020) im Heptadenmuster von HrpB7 wurde das *coiled-coil* Motiv und damit die Komplexbildung als wichtiges Merkmal von HrpB7 identifiziert, welches nicht nur die T3S fördert, sondern auch zur vollständigen Virulenz beiträgt. Essentiell für die Proteinfunktion von HrpB7 ist die Komplexbildung vermutlich nicht, da der Austausch der Leucine gegen Serin in den N- und C-terminalen Heptadenmuster zwar die Komplexbildung inhibiert, die Virulenz von *Xcv* allerdings nur partiell reduziert (Drehkopf *et al.*, 2020).

Einen Verlust der Pathogenität wurde bei der HrpB7-Mutante beobachtet, in der die Leucine gegen Glycine in den N- und C-terminalen Heptadenmuster ausgetauscht wurden (Drehkopf *et al.*, 2020). Dieses HrpB7-Derivat bildete auch keine Komplexe mehr und zeigte im GST-*pull down* keine Interaktion zu den HrpB7-Interaktoren HpaB, HrcQ und HrcD (Drehkopf *et al.*, 2020). Die Aminosäure Glycin gilt als Helixbrecher. Vermutlich ist die Interaktion zwischen HrpB7 und den umgebenden T3-Komponenten von der *coiled-coil* Struktur des einzelnen Proteins abhängig und nicht von dem HrpB7-Komplex, weshalb die HrpB7-Mutante mit dem Leucin-Serin-Austausch noch partiell pathogen ist. In zukünftigen Interaktionsstudien sollte das HrpB7-Derivat mit einbezogen werden, in der der Austausch der Leucine gegen Serin in den N- und C-terminalen Heptadenmuster erfolgte. Des Weiteren sollte die Sekundärstruktur der beiden HrpB7-Derivate zum Beispiel mittels Circular dichroismus geklärt werden.

Für die Komplexbildung und die Funktion von HrpB7 ist vermutlich die Länge der beiden um sich gewundenen α -Helices entscheidend. Eine Deletion von 20 Aminosäuren in der C-terminalen Helix außerhalb des Heptadenmusters in HrpB7 führte zu einem vollständigen Verlust der HrpB7-Komplexbildung, T3S und Pathogenität des *Xcv*-Stammes (Kapitel 3.2.4.). Parallelen dazu zeigt FliJ aus dem flagellärem T3SS. Das HrpB7-Homolog ist zur Erfüllung seiner Funktion gegenüber jeder Deletion von zehn Aminosäuren innerhalb des Proteins intolerant (Fraser *et al.*, 2003). Ein weiterer Faktor neben der möglicherweise entscheidenden Länge der beiden um sich gewundenen α -Helices könnte die Deletion einer Bindungsdomäne der vielen Interaktoren von HrpB7 sein (Fraser *et al.*, 2003). Interaktionsstudien hierfür stehen noch aus.

Die Proteine der HrpO/FliJ/YscO-Proteinfamilie besitzen viele Interaktoren (González-Pedrajo *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014; Drehkopf *et al.*, 2020). Der wesentliche Unterschied ist die vorhandene Interaktion zum T3S4-Protein

und die Interaktion zur gespaltenen oder ungespaltenen Form von SctU, woraus sich verschiedene Theorien zur Funktion der HrpB7-homologen Proteine entwickelt haben.

Existiert eine Interaktion zum T3S4-Protein und zur ungespaltenen Form von SctU, liegt die noch unbekannt Funktion des HrpB7-Homologs vermutlich vor dem ersten Substratspezifitätswechsel (*Yersinia* spp., *Chlamydia trachomatis*) (Riordan und Schneewind, 2008; Lorenzini *et al.*, 2010; Mukerjea und Ghosh, 2013). Im Gegensatz dazu ist die Funktion für die HrpB7-homologen Proteine FliJ aus dem flagellären T3SS und Spa13 aus *Shigella flexneri* klarer definiert. Diese Proteine interagieren nicht mit dem T3S4-Protein und zeigen eine höhere Affinität zur gespaltenen Form von SctU (Minamino *et al.*, 2000; Minamino und Macnab, 2000a; Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014). Ihre Aufgabe besteht darin, zunächst die Assemblierung des T3SS zu fördern und später die aus dem Chaperon-Substrat-Komplex freigewordenen Chaperone von der ATPase abzulösen (Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014).

Eine Interaktion zwischen HrpB7 aus *Xcv* mit dem T3S4-Protein HpaC konnte nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.5.). Zukünftige Interaktionsstudien sollten die Interaktion zwischen HrpB7 und der gespaltenen und ungespaltenen Form von HrcU fokussieren.

Das Glutamat-reiche Motiv in HrpB7

Die Deletion des Glutamat-reichen Motivs (E-Motiv) in der C-terminalen Region von HrpB7 führt zum Verlust der T3S und Pathogenität von *Xcv*. Dieses HrpB7-Derivat bildet noch Komplexe, was vermutlich auf eine weitere Funktion des Proteins deutet neben der Komplexbildung (Kapitel 3.2.4.). Die HrpB7-Mutante, in der die Glutamate des Motivs gegen Alanin substituiert wurden, zeigte ebenfalls den gleichen Phänotyp wie das HrpB7-Deletionsderivat. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass das Defizit auf die Kürzung der C-terminalen Helix zurückzuführen ist. Das E-Motiv ist auch in einigen homologen Proteinen zu finden, wie zum Beispiel YscO aus *Yersinia pestis*, CT670 aus *Chlamydia trachomatis* oder PscO aus *Pseudomonas aeruginosa* (Kapitel 3.2.1.) (Mukerjea und Ghosh, 2013). Bisher wurde dieses Motiv aber nicht analysiert. Für FliJ aus dem flagellärem T3SS ist die C-terminale Region als Bindungsdomäne für die Interaktion mit SctL beschrieben wurden (Fraser *et al.*, 2003). Allerdings ist das E-Motiv in FliJ nicht konserviert (Kapitel 3.2.1.) (Mukerjea und Ghosh, 2013). Ob das E-Motiv als Bindungsstelle in HrpB7 für die HrcL-Interaktion fungiert, könnten zukünftige Interaktionsstudien zwischen den HrpB7-Derivaten und HrcL zeigen. Auch wenn HrcL nicht an der C-terminalen Region von HrpB7 bindet, so sollten weitere Interaktoren getestet werden. Bereits die Ergebnisse der Infektionsexperimente deuteten an, dass die C-terminale Region von HrpB7 für die vollständige Virulenz von *Xcv* essentiell ist. Die ektopische Expression des Gens *hrpB7* mit

einem C-terminalen *c-myc*-Epitop hatte einen negativen Einfluss auf die Virulenz des *Xcv*-Stammes (Kapitel 3.2.2.). Die C-terminale Region von HrpB7 mit dem E-Motiv könnte, wie im Fall von FliJ, eine wichtige Bindungsdomäne zu den benachbarten zytoplasmatischen Komponenten des T3SS sein zum Beispiel der ATPase oder möglicherweise das Chaperon von der ATPase lösen (Evans *et al.*, 2006; Cherradi *et al.*, 2014).

4.3. HpaA interagiert mit zahlreichen Komponenten des T3SS und ist vermutlich essentiell für den Substratspezifitätswechsel

HpaA zeigt typische Merkmale eines Effektors. Es bindet das T3S-Chaperon HpaB, wird sekretiert und in die Wirtszelle T3-abhängig transloziert, wo es mit Hilfe von zwei Kernlokalisierungssequenzen in den Zellkern lokalisiert (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). Interessanterweise ist die Kernlokalisierung von HpaA in der Wirtszelle jedoch nicht entscheidend für die Virulenz von *Xcv*. Essentiell hingegen für die Pathogenität des Bakteriums ist vermutlich, dass HpaA sekretiert wird (Lorenz *et al.*, 2008a). Des Weiteren zeigt HpaA auch Merkmale eines Kontrollproteins. Eine *hpaA*-Deletionsmutante ist nicht in der Lage Pilus-, Translokon- und Effektorproteine zu sekretieren (Huguet *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2008a). Auf Grund der bisherigen Daten existierte zu Beginn dieser Arbeit das Modell, dass HpaA das T3S-Chaperon HpaB bindet und blockiert bis Pilus und Translokon aufgebaut sind. Anschließend wird HpaA HpaB-abhängig sekretiert und in die Wirtszelle als erster Effektor transloziert (Lorenz *et al.*, 2008a). Liegt kein HpaA in *Xcv* vor oder ist *hpaB* überexprimiert, wird die Sekretion und Translokation aller Substrate blockiert, vermutlich von HpaB (Huguet *et al.*, 1998; Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008a).

4.3.1. Die Kontrolle der HpaA-Sekretion und –Translokation

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass in den ersten 25 N-terminalen Aminosäuren von HpaA das Sekretionssignal kodiert ist (Lorenz *et al.*, 2008a). Weiter C-terminal gelegen ist das putative N-terminal lokalisierte NLS-Motiv (Huguet *et al.*, 1998). Das NLS-Motiv ist ein Prolin-/Arginin-reiches Motiv und konserviert in der N-terminalen Region von Effektoren (Escolar *et al.*, 2001). Auf Grund seiner besonderen Lage im Protein wird dem Motiv eine Funktion in der Translokation zugeschrieben (Escolar *et al.*, 2001).

Das Translokationssignal in HpaA

Das N-terminale Prolin-/Arginin-reiche Motiv (NLS1) in HpaA wurde im Rahmen dieser Arbeit als mögliches Translokationssignal analysiert. Die Substitution der Arginine in dem Sequenzmotiv NLS1 führte zu einem Verlust der HpaA-Translokation und der Pathogenität

von *Xcv* trotz Wildtyp-gleicher HpaA- und HrpF-Sekretion in *in vitro*-Sekretionsanalysen (Kapitel 3.3.4. und 3.3.5.; Christian Lorenz, unveröffentlicht). Nach dem Modell von Lorenz *et al.*, 2008 muss HpaA sekretiert werden, um das T3S-Chaperon freizusetzen (Lorenz *et al.*, 2008a). Das Derivat HpaA_{NLS1m} wird sekretiert, wodurch HpaB theoretisch frei wird. Dennoch ist die HpaA_{NLS1m}-Mutante nicht pathogen. Daraus könnte resultieren, dass entweder die Translokation von HpaA die Pathogenität von *Xcv* fördert oder HpaA eine weitere Aufgabe neben der Kontrolle von HpaB besitzt, eventuell im ersten oder zweiten Substratspezifitätswechsel.

Um einen Defekt im Substratspezifitätswechsel nachweisen zu können, sollte in zukünftigen Studien die Effektor- und Nicht-Effektorsekretion und -Translokation in der NLS1-Mutante näher analysiert werden. Im Vordergrund sollten dabei die HrpB2-Sekretion und -Translokation sowie die HrpF-Translokation stehen.

Es wäre denkbar, dass HpaA als erster Effektor transloziert werden muss. Für das Kontrollprotein MxiC aus *Shigella flexneri* wurde dies bereits gezeigt (Botteaux *et al.*, 2009; Martinez-Argudo und Blocker, 2010; Cherradi *et al.*, 2013). MxiC versperrt nach dem Modell von Cherradi *et al.*, 2013 den Eingang des Exportapparates und wird nach einem externen Signal als erstes sekretiert. Jedoch wurde in diesen Analysen MxiC nur als Kontrollprotein im Substratspezifitätswechsel am T3SS betrachtet. Eine mögliche Funktion in der Wirtszelle als erster Effektor wurde bisher nicht untersucht. In *Chlamydomophila pneumoniae* hingegen wurde für das HpaA-Homolog CopN neben der Kontrollfunktion des Proteins am T3SS im Bakterium auch die Funktion als Effektor in der Wirtszelle genauer analysiert (Archuleta *et al.*, 2011; Archuleta und Spiller, 2014). So wurde gezeigt, dass CopN direkt an $\alpha\beta$ -Tubulin bindet und deren Polymerisation zu Mikrotubuli verhindert (Archuleta *et al.*, 2011).

In zukünftigen Studien sollte auch die Funktion von HpaA aus *Xcv* in der pflanzlichen Wirtszelle näher untersucht werden.

Die Translokationsanalysen zeigten zusätzlich, dass das Sekretionssignal in HpaA separat vom Translokationssignal agiert (Kapitel 3.3.5.) (Mudgett *et al.*, 2000; Escolar *et al.*, 2001; Scheibner *et al.*, 2017; Prochaska *et al.*, 2018; Scheibner *et al.*, 2018). Das heißt, dass Translokation abhängig ist von einem aktiven Sekretionssignal, während die T3-abhängige Sekretion auch ohne Translokationssignal erfolgt. Ähnlich dazu wurden bereits Aussagen getroffen zur Sekretion und Translokation des Effektors DspA/E aus *Erwinia amylovora* (Oh *et al.*, 2010) sowie von T3-Effektoren in *Xcv* (Scheibner, F. *et al.*, 2017; Prochaska, H. *et al.*, 2018; Scheibner, F. *et al.*, 2018). Als Beispiel sei an dieser Stelle XopE2 aus *Xcv* genannt. XopE2 weist in den ersten 150 N-terminalen Aminosäuren ein Sekretions- und ein Translokationssignal auf. Während die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von XopE2 im Wildtyp sekretiert werden, ist für das XopE2-Derivat, welches in den ersten 20 N-terminalen

Aminosäuren deletiert ist, keine Translokation nachweisbar (Scheibner *et al.*, 2018). Dies zeigt, dass HpaA in diesem Merkmal den Effektoren ähnelt.

Die HpaB-abhängige Sekretion und Translokation von HpaA

Das Prolin-/Arginin-reiche Motiv wurde bereits am Xcv-Effektor XopB im Detail analysiert (Prochaska *et al.*, 2018). Alanin-Substitutionen im Sequenzmotiv führten zu einer Reduktion der Translokation des XopB-Derivates. Zudem wurde der sonst HpaB-abhängig translozierte Effektor XopB mit dieser Mutation HpaB-unabhängig transloziert (Prochaska *et al.*, 2018). GST-*pull down* Analysen zeigten, dass das Prolin-/Arginin-reiche Motiv nicht Bestandteil der HpaB-Bindungsstelle ist, sondern die Membranassoziation von XopB unterstützt, vermutlich durch die Interaktion mit Cardiolipin (Prochaska *et al.*, 2018). Anhand dieser Daten existiert die Modellvorstellung, dass die T3-Effektoren an die Membran assoziieren bis das T3SS vollständig assembliert ist und sie von HpaB zum T3SS eskortiert werden (Prochaska *et al.*, 2018).

In dieser Arbeit wurde in Translokationsanalysen die HpaB-Abhängigkeit der Translokation des HpaA_{NLS1m}-Derivates untersucht (Kapitel 3.3.6.). Das HpaA_{NLS1m}-Derivat wurde von einer *hpaB*-Mutante nicht transloziert, was dem zuvor beschriebenen Modell widerspricht (Kapitel 3.3.6.). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kontrolle der Sekretion und Translokation des Kontrollproteins HpaA geordneter verläuft als bei einem Effektor wie XopB. Möglicherweise besitzt HpaA mehr als einen Kontrollpunkt für die Sekretion und anschließende Translokation. Eventuell nimmt die HpaB-Bindungsstelle noch Einfluss. Zur Überprüfung sollte in zukünftigen Translokationsanalysen ein HpaA-Derivat mit einbezogen werden, welches im NLS1-Motiv mutiert ist und zusätzlich keine HpaB-Bindungsstelle aufweist.

Die Deletion der HpaB-Bindungsstelle in der C-terminalen Region von HpaA hatte in vorangegangenen Studien interessanterweise keine Auswirkung auf die HpaB-abhängige Sekretion des HpaA-Derivates (Lorenz *et al.*, 2008a). Bereits zu diesem Zeitpunkt bestand die Hypothese, dass mehr als ein Marker für die HpaB-abhängige Sekretion von HpaA verantwortlich ist. Auf der Suche nach dem zweiten Marker, welcher die HpaB-abhängige Sekretion und Translokation von HpaA mitbestimmt, wurden die Versuchsergebnisse mit den XopA-HpaA-Chimären einmal genauer betrachtet. Die Ergebnisse wurden noch einmal in der Tabelle 15 zusammengefasst. Weder die N-terminale Domäne noch die C-terminale Domäne von HpaA translational fusioniert als N- bzw. C-terminales Epitop an XopA beeinflusste die Sekretion und Translokation von XopA. XopA als auch die Chimäre wurden vom Xcv-Wildtyp sekretiert und von einer *hpaB*-Mutante transloziert (Kapitel 3.3.6.) (Scheibner *et al.*, 2018). Erst das XopA-HpaA-Chimär, in dem die zentrale Domäne von HpaA gegen XopA ausgetauscht ist, wurde wie HpaA HpaB-abhängig transloziert, jedoch

interessanterweise HpaB-unabhängig sekretiert (Kapitel 3.3.6.). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine separate Kontrolle der Sekretion und Translokation in HpaA sein (Oh *et al.*, 2010; Scheibner *et al.*, 2018).

HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50} komplementiert nicht den Phänotypen der *hpaA*-Deletionsmutante *in planta* und in der HrpF-Sekretion (Kapitel 3.3.6.). Ein weiteres interessantes XopA-HpaA-Chimär besteht aus den ersten N-terminalen 50 Aminosäuren von XopA (Sekretions- und minimales Translokationssignal) und der zentralen und C-terminalen Domäne von HpaA (Lorenz *et al.*, 2008a). Dieses XopA-HpaA-Chimär komplementiert partiell die *hpaA*-Mutante phänotypisch in der Pflanze und in der HrpF-Sekretion (Tab. 15) (Lorenz *et al.*, 2008a). Jedoch wird es wie XopA HpaB-unabhängig sekretiert (Lorenz *et al.*, 2008a). Für dieses Chimär wurden bislang noch nicht die Translokation und deren HpaB-Abhängigkeit untersucht. Der weitere Vergleich der beiden zuletzt beschriebenen XopA-HpaA-Chimäre könnte den Unterschied zwischen dem Sekretions- und Translokationssignal des Nicht-Effektors XopA und des Kontrollproteins HpaA klären.

Tabelle 15: Die Versuchsergebnisse mit den XopA-HpaA-Chimären.

In der Tabelle sind die Versuchsergebnisse mit den XopA-HpaA-Chimären aus dem Kapitel 3.3.6. und der Literatur Lorenz *et al.*, 2008a zusammengefasst. *Xcv*-Wildtyp, 85*; $\Delta hpaB$, 85* $\Delta hpaB$; Komplementiert, Komplementation von 85* $\Delta hpaA$; (Ja), partiell, nicht wie Wildtyp.

Chimer	<i>Xcv</i> -Wildtyp		$\Delta hpaB$		Komplementiert
	sekretiert	transloziert	sekretiert	transloziert	
XopA	Ja	Nein	Ja	Ja	n.a.
HpaA	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
XopA-HpaA_{C50}	Ja	Nein	Ja	Ja	n.a.
HpaA_{N70}-XopA	Ja	Nein	Ja	Ja	n.a.
HpaA_{N70}-XopA-HpaA_{C50}	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
XopA₅₀-HpaAΔN70 (Lorenz <i>et al.</i> , 2008a)	Ja	n.a.	Ja	n.a.	(Ja)

Die bisherigen Ergebnisse der XopA-HpaA-Chimäre zeigen, dass vermutlich die N- und C-terminale Region von HpaA essentiell sind für die HpaB-abhängige Translokation von HpaA, die zentrale Domäne von HpaA, als auch die C-terminale Region (Lorenz *et al.*, 2008a) sind vermutlich essentiell für die HrpF-Sekretion. Die HpaB-abhängige Sekretion ist nur von dem Wildtyp-HpaA zu beobachten.

Die HpaC-abhängige Sekretion und Translokation von HpaA

Dass HpaC die Sekretion von HpaA kontrolliert, war aus Vorarbeiten bekannt (Büttner *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008a). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die HpaC-Bindungsstelle in HpaA vermutlich in der zentralen Domäne lokalisiert ist (Kapitel

3.3.1.). Des Weiteren zeigten Translokationsanalysen, dass HpaA oder das HpaA-Derivat, in dem die HpaB-Bindungsstelle deletiert ist, HpaC-abhängig transloziert wurde.

Nach der Theorie bindet ein Chaperon an die N-terminale Region des Effektors oder direkt nach dem Translokationssignal in der zentralen Region (Stebbins und Galán, 2001; Büttner *et al.*, 2004; Triplett *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010; Büttner, 2012). Im Fall von HpaA liegt die Bindungsstelle des postulierten Chaperons HpaB in der C-terminalen Region, weit entfernt vom Translokationssignal (Lorenz *et al.*, 2008a). Es wäre durchaus denkbar, dass auf Grund der existierenden Daten und der Bindungsposition von HpaC in HpaA auch HpaC als Chaperon von HpaA in Betracht kommt. Interessanterweise wird aber auch die N-terminale Domäne von HpaA, wo die putative HpaC-Bindungsstelle deletiert ist, HpaC-abhängig transloziert. Dafür ist möglicherweise, wie bei der HpaB-abhängigen Translokation ein weiterer Marker im Sekretions- und/oder Translokationssignal vorhanden. In diesem Zusammenhang sollte das NLS1-Sequenzmotiv noch einmal genauer analysiert werden.

Eine *hpaC*-Mutante besitzt Wildtyp-gleiche Pili (Büttner *et al.*, 2006). Dennoch wird das „*inner rod*“-Protein HrpB2 transloziert und HrpF reduziert sekretiert (Büttner *et al.*, 2006). Es bleibt die Frage offen, inwieweit die HpaA-Translokation von einem korrekt eingebauten „*inner rod*“ oder von HrpF abhängig ist und nur indirekt von HpaC.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass HpaA bereits im ersten Substratspezifitätswechsel mit eingreift. Die Interaktionen zu den beteiligten Komponenten HrcU und HpaC (Kapitel 3.3.3. und 3.3.1.) sowie HrpB2 (Sabine Drehkopf, unveröffentlicht) wurden bereits nachgewiesen. Für die Hypothese spricht zudem die Tatsache, dass in einer *hpaA*-Mutante signifikant weniger Pili zu finden sind als beim *Xcv*-Wildtyp (Weber *et al.*, 2005). Ob HpaA bereits eine essentielle Komponente im ersten Substratspezifitätswechsel ist, müssen zukünftige Studien zeigen. Hinweise diesbezüglich könnten *in vitro*-Sekretionsstudien und Translokationsstudien geben, in denen zunächst die HrpB2-Sekretion und Translokation in einer *hpaA*-Mutante analysiert werden (Scheibner *et al.*, 2016).

Der Phänotyp der *hpaC*-Mutante, Wildtyp-gleiche Pili, Krankheitssymptome in der Pflanze, wenn auch zeitlich verzögert gegenüber *Xcv*-Wildtyp und keine HpaA-Translokation, zeigt, dass die HpaA-Translokation, wie im oberen Abschnitt bereits diskutiert, nicht essentiell ist für die Pathogenität von *Xcv*. Demzufolge ist vermutlich das NLS1-Sequenzmotiv in HpaA kein Translokationssignal.

4.3.2. Die zentrale Proteinregion in HpaA ist essentiell für die Pathogenität von *Xcv* und HrpF-Sekretion

Nachdem bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde, dass in der N-terminalen Domäne von Aminosäure 1-20 das Sekretionssignal lokalisiert ist und die C-terminale

Domäne von Aminosäure 225-275 als HpaB-Bindungsstelle identifiziert wurde (Lorenz *et al.*, 2008a), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der zentralen Domäne in HpaA geklärt werden. Das dafür analysierte HpaA_{ΔM}-Derivat besteht aus dem Sekretionssignal und der HpaB-Bindungsstelle. *In vitro*-Studien zeigten, dass es T3-abhängig sekretiert wird und mit HpaB interagiert (Kapitel 3.3.2.). Die HpaB-abhängige Sekretion und/oder Translokation des HpaA_{ΔM}-Derivates muss noch untersucht werden.

Die bisherigen Ergebnisse bestätigen das Modell von Lorenz *et al.*, 2008. Während das HpaA_{ΔC50}-Derivat, welches nicht mit HpaB interagiert, von einer *hpaA*-Deletionsmutante nicht sekretiert wird, kann HpaA_{ΔM} HpaB binden und sekretiert werden (Kapitel 3.3.2.) (Lorenz *et al.*, 2008a). Interessanterweise kann der Defekt der *hpaA*-Deletionsmutante bezüglich der HrpF-Sekretion und der Pathogenität von *Xcv* von beiden Derivaten nicht komplementiert werden (Kapitel 3.3.2.) (Lorenz *et al.*, 2008a). Dies deutet erneut darauf hin, dass auch die zentrale Domäne von HpaA einen entscheidenden Einfluss auf die HrpF-Sekretion ausübt (siehe oberer Abschnitt Ergebnisse XopA-HpaA-Chimäre).

Die in diesem Zusammenhang durchgeführten *in vitro*-Interaktionsstudien identifizierten die zentrale Domäne von HpaA als putative Bindungsstelle für die Komponenten des T3SS HrcU, HrcV, HrcN, HrcL, HrcQ und HrpB7, sowie für HpaC, HpaA und für Effektoren (Kapitel 3.3.3. und Sabine Drehkopf, unveröffentlicht). Die Beobachtung, dass HpaA ohne die zentrale Domäne nicht funktional ist, deutet darauf hin, dass diese Interaktionen für die Virulenzaktivität von HpaA essentiell sind.

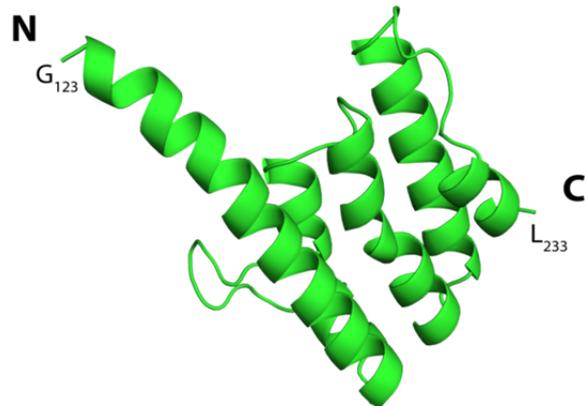
Kontrollproteine wie HpaA, welche die Sekretionshierarchie der Translokationsproteine und der ersten Effektoren regulieren, werden in der Literatur als „*gatekeeper*“ bezeichnet. Zu den *gatekeeper*-Proteinen zählt SepL aus *EPEC*, InvE aus *Salmonella* SPI-1 und SsaL aus *Salmonella* SPI-2, MxiC aus *Shigella*, der Komplex aus YopN und TyeA in *Yersinia* sowie PopN/Pcr1 aus *Pseudomonas aeruginosa* (Kubori und Galán, 2002; Deng *et al.*, 2005; Pallen *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010). Die *gatekeeper* besitzen eine einheitliche Struktur: ein N-terminales Sekretionssignal gefolgt von einer Chaperon-Bindungsstelle und einem Bündel aus α -Helices. Letzteres dient im Regulationsprozess als Bindungsstelle für multiple Interaktionspartner (Schubot *et al.*, 2005; Deane *et al.*, 2008).

Das Strukturvorhersageprogramm SWISS-MODEL sagt für HpaA ein Bündel aus α -Helices in der zentralen Domäne voraus (Abb. 44). Dieses Strukturmotiv könnte, wie bei den anderen *gatekeeper*-Proteinen, die Ursache für das breitgefächerte Spektrum an Interaktionspartnern mit der zentralen Domäne von HpaA sein. Im Fall von YopN, das *gatekeeper*-Protein aus *Yersinia pestis*, wurde bereits gezeigt, dass die effiziente YopN- und Effektortranslokation von dem helikalen Bündel in YopN abhängig ist (Bamyaci *et al.*, 2019). Zukünftige Studien könnten klären, ob das helikale Bündel in HpaA von *Xcv* ebenfalls für die

Effektortranslokation entscheidend ist. Gleichzeitig sollte die Interaktion dieses HpaA-Derivates mit den HpaA-Bindungspartnern überprüft werden.

Abb. 44: HpaA trägt das Strukturmerkmal der *gatekeeper*-Proteine.

Die *gatekeeper*-Proteine besitzen in der zentralen oder C-terminalen Region ein Bündel aus α -Helices (Schubot *et al.*, 2005; Deane *et al.*, 2008). Mittels SWISS-MODEL wurde das gleiche Strukturmerkmal für HpaA vorhergesagt. Es ist im C-terminalen Bereich der zentralen Domäne von HpaA lokalisiert, zwischen Gly123 und Leu233.



Interessant ist die Interaktion zu dem T3S4-Protein HpaC (Kapitel 3.3.1.), dessen Bindungsstelle in HpaA nicht mit der HpaB-Bindungsstelle kolokalisiert (Lorenz *et al.*, 2008a), was für einen ternären Komplex der drei Kontrollproteine sprechen könnte, zumal die Deletion auch nur eines dieser Proteine eine reduzierte oder unkontrollierte Translokation und eine reduzierte Effektorsekretion hervorruft (Büttner *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2008b; Scheibner *et al.*, 2016). Übereinstimmend damit wird auch in den tierpathogenen Bakterien *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *EPEC* und *EHEC* ein Komplex aus Kontrollproteinen und Chaperonen vermutet, der die Translokation und Effektorsekretion am T3SS kontrolliert (Day *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Younis *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017). So interagiert YopN aus *Yersinia pseudotuberculosis* mit TyeA, die mit Hilfe der Chaperone SycN und YscB zum T3SS gelangen (Ferracci *et al.*, 2005; Schubot *et al.*, 2005; Plano und Joseph, 2013). Der YopN-TyeA-Komplex reprimiert die T3S über einen unbekanntem Mechanismus bis YopN sekretiert wird (Schubot *et al.*, 2005).

Ein Nachweis für die Existenz eines ternären Komplexes in *Xcv* aus HpaA, HpaB und HpaC steht noch aus.

4.3.3. Modellvorstellungen der Funktion der *gatekeeper*-Proteine

Die Funktion der *gatekeeper*-Proteine ist vermutlich die Kontrolle des zweiten Substratspezifitätswechsels (Younis *et al.*, 2010; Cherradi *et al.*, 2013; Archuleta und Spiller, 2014; Gaytán *et al.*, 2017; Bamyaci *et al.*, 2019). Wie der *gatekeeper* die Reihenfolge der Substrate koordiniert, ist im Detail noch unklar. Allerdings sind dank zahlreicher Mutagenese- und Interaktionsstudien aus tierpathogenen Bakterien Proteine bekannt, die möglicherweise dem *gatekeeper* helfen. Auf der Grundlage dieser Interaktionspartner haben sich unterschiedliche Modelle entwickelt.

Ein *gatekeeper*-Modell beruht auf die nachgewiesene Interaktion zwischen dem *gatekeeper* und dem „*inner rod*“-Protein (Abb. 45) (Cherradi *et al.*, 2013; El Hajjami *et al.*, 2017; Bamyaci *et al.*, 2019). Es wird vermutet, dass das *gatekeeper*-Protein über die Interaktion mit dem „*inner rod*“-Protein am Exportapparat des T3SS assoziiert und von da aus zunächst die T3S hemmt (Cherradi *et al.*, 2013). Ein externes Signal, vermutlich die Erkennung einer Wirtszelle, initiiert eine allosterische Signalweiterleitung vom Pilusprotein zum *gatekeeper*, welche am Ende die Interaktion zwischen *gatekeeper* und „*inner rod*“-Protein auflöst (Cherradi *et al.*, 2013). Der freie *gatekeeper* fördert nun wahrscheinlich zusammen mit Chaperonen die Translokation. Anschließend wird er sekretiert und initiiert die Effektorsekretion (Cherradi *et al.*, 2013; El Hajjami *et al.*, 2017; Roehrich *et al.*, 2017).

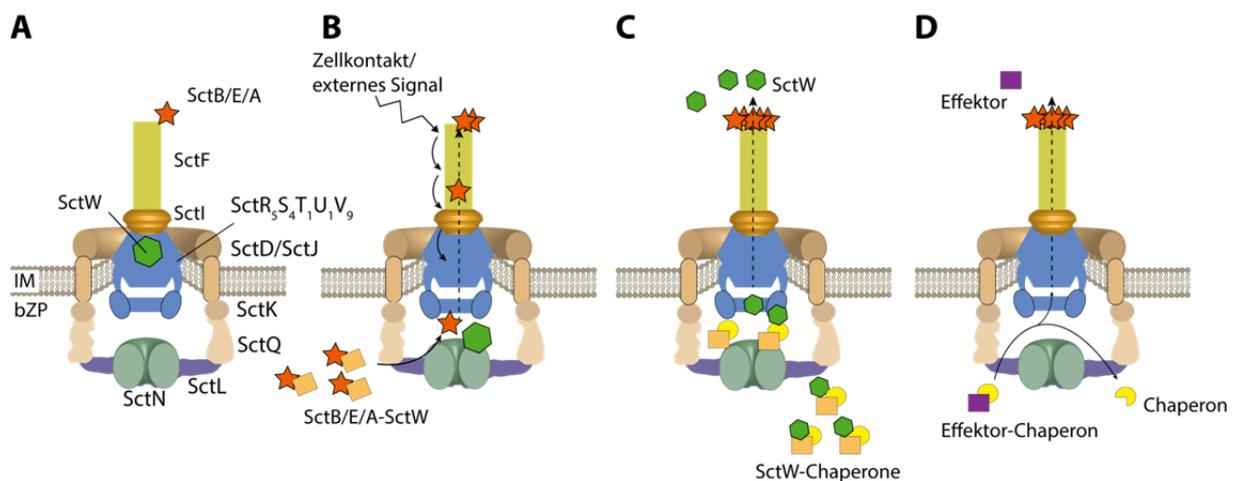


Abb. 45: Modellvorstellung der *gatekeeper*-Funktion auf der Grundlage der Interaktion mit dem „*inner rod*“-Protein (nach Cherradi *et al.*, 2013).

A. Vor der T3S-Induktion interagiert der *gatekeeper* SctW mit dem „*inner rod*“-Komplex SctI im Sekretionskanal und verschließt diesen. Ein kleiner Teil der Translokonproteine SctB/E/A wurde vermutlich bereits sekretiert. **B.** Die T3S-Induktion erfolgt über ein externes Signal, vermutlich ein Kontakt mit der Wirtszelle. Das Aktivierungssignal wird vermutlich allosterisch weitergeleitet von dem Pilusprotein SctF über den „*inner rod*“-Komplex SctI auf den *gatekeeper* SctW (Kenjale *et al.*, 2005; Martinez-Argudo und Blocker, 2010; Cherradi *et al.*, 2013). Dieser verlässt schließlich den Sekretionskanal in Richtung Zytoplasma der Bakterienzelle. Der *gatekeeper* oder auch andere Translokon-Chaperone fördern die anschließende Translokation. **C.** Nach der vollständigen Translokation sekretiert und transloziert der *gatekeeper* SctW reguliert von Chaperonen als erster Effektor. **D.** Im zytoplasmatischen Komplex des T3SS ist nun Platz für die Erkennung und anschließende Sekretion und Translokation der Effektoren.

Es gibt Punktmutanten vom *gatekeeper*-Protein oder auch „*inner rod*“-Protein, die zum Verlust der Interaktion zwischen den beiden Proteinen führen und eine unkontrollierte Effektorsekretion verursachen (El Hajjami *et al.*, 2017). Des Weiteren existieren auch Pilusprotein-Mutanten von *Shigella flexneri*, welche eine unkontrollierte Effektorsekretion aufweisen oder keine Effektorsekretion zeigen, aber die Translokation noch erlauben (Kenjale *et al.*, 2005). Diese Phänotypen der Mutanten könnten Hinweise darauf sein, dass eine allosterische Signalweiterleitung eines externen Signals ausgehend vom Pilusprotein

möglich wäre. Zudem wird vermutlich noch zwischen ein Signal für die Translokosekretion und der Effektorsekretion unterschieden (Kenjale *et al.*, 2005).

Im Einklang damit konnte für *Xcv* gezeigt werden, dass das putative *gatekeeper*-Protein HpaA mit den „*inner rod*“-Proteinen HrpB1 und HrpB2 interagiert (Sabine Drehkopf, unpubliziert). Dennoch ist eine direkte Interaktion zwischen dem *gatekeeper* und dem im T3SS bereits eingebauten „*inner rod*“-Protein, wie es im Modell beschrieben wird, eher unwahrscheinlich. Zum einen wäre der Abstand vom Eingang des T3SS bis zum „*inner rod*“-Komplex zu groß für eine direkte Interaktion und zum anderen scheint ein vorzeitiger Eintritt des *gatekeepers* in den Sekretionskanal bis zum „*inner rod*“-Komplex und anschließend wieder zurück zum zytoplasmatischen Komplex des T3SS als sehr energieaufwendig und fehleranfällig.

Zu diesem Modell passende Interaktionen wären die HpaA-HrcS-Interaktion und die HrcS-HrpB1-Interaktion (Kapitel 3.1.4.). HrcS als eine Komponente im Exportapparat (Berger *et al.*, 2010) könnte die Verbindung zwischen dem *gatekeeper* und dem „*inner rod*“-Komplex in der Signalweiterleitung darstellen. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass HrpB1 mit HrpB2 interagiert und HrpB1 mit dem Pilusprotein HrpE (Hausner *et al.*, 2013). Diese Interaktionen würden eine allosterische Signalweiterleitung eines externen Signals bis zum *gatekeeper* HpaA am Eingang des Sekretionskanals ermöglichen. Allerdings müsste dies über Phänotypisierung von Mutanten in *Xcv* in zukünftigen Studien noch analysiert werden.

Ein weiteres *gatekeeper*-Modell beruht auf die Interaktion zwischen dem *gatekeeper* und die Exportapparatkomponente SctV (Bange *et al.*, 2010; Shen und Blocker, 2016; Portaliou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). Dabei interagiert der *gatekeeper* vermutlich zunächst mit dem Translokon-Chaperon-Komplex und eskortiert diesen zur zytoplasmatischen Domäne von SctV (Abb. 46). Die Bindung an SctV könnte eine Konformationsänderung im Chaperon verursachen, welches das Translokonprotein durch den Sekretionskanal entlässt (Yu *et al.*, 2018). Der *gatekeeper* bleibt gebunden an SctV. Im flagellärem T3SS in *Bacillus subtilis* wird sogar vermutet, dass diese Bindung von FliJ, dem HrpB7-Homolog, noch verstärkt wird (Bange *et al.*, 2010). Die Anzahl der Bindungsstellen für den *gatekeeper* an den nonameren Ring aus SctV ist vermutlich begrenzt (Bange *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2018). Sind alle Bindungsstellen besetzt, startet ein unbekanntes Signal die Chaperon-vermittelte Sekretion und Translokation des *gatekeepers*. Anschließend folgt die Sekretion und Translokation der Effektoren (Yu *et al.*, 2018). Das Signal könnte wie bei dem zuerst beschriebenen Modell ein externes Signal sein und über allosterische Signalweiterleitung zum *gatekeeper* gelangen (Cherradi *et al.*, 2013). Eine mögliche Interaktion zwischen HrcS und HrcV konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (Kapitel 3.1.4.).

Dass SctV eine Rolle im zweiten Substratspezifitätswechsel spielen könnte, zeigt die Existenz von SctV-Mutanten mit dem Phänotyp der *gatekeeper*-Mutante (Bange *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Shen und Blocker, 2016; Gaytán *et al.*, 2017; Portaliou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). Auch für *Xcv* wurden HrcV-Mutanten gefunden, die einen Defekt in der HrpF-Sekretion zeigen und nicht pathogen sind, und somit dem Phänotyp der *hpaA*-Mutante widerspiegeln (Hartmann und Büttner, 2013).

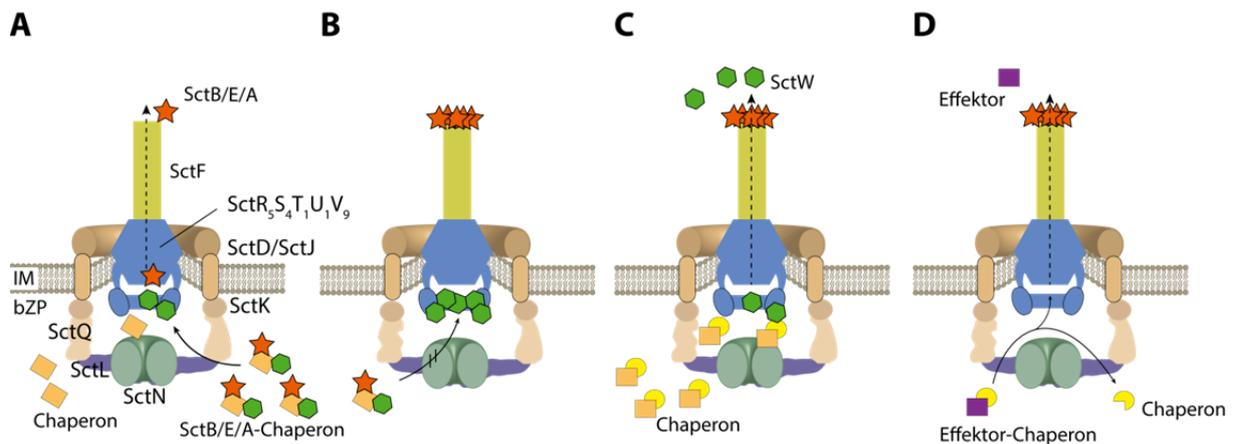


Abb. 46: Modellvorstellung der *gatekeeper*-Funktion auf der Grundlage der Interaktion mit SctV (nach Yu *et al.*, 2018; Bange *et al.*, 2010).

A. Über die Interaktion zwischen dem *gatekeeper* SctW und SctV assoziiert der Translokons(SctB/E/A)-Chaperon-*gatekeeper*-Komplex in die Sortierungsplattform (SctQ/SctL/SctN). Dieser Komplex verhindert vermutlich aus sterischen Gründen die Interaktion von Effektor-Chaperon-Komplexen mit der Sortierungsplattform. Die SctW-SctV-Interaktion löst vermutlich das Translokonsprotein von seinem Chaperon. Das freie Translokonsprotein wird sekretiert. Der *gatekeeper* verbleibt zunächst an den SctV-Bindungsstellen. **B.** Wenn alle Substratbindungsstellen an dem zytoplasmatischen SctV-Ring mit *gatekeeper* besetzt sind, ist das Translokons vollständig aufgebaut und die Translokonssekretion wird gestoppt. **C.** Chaperone vermitteln die Dissoziation des *gatekeepers* von SctV und dessen anschließende Sekretion und Translokation als erster Effektor. **D.** Es folgt die Chaperon-vermittelte Translokation weiterer Effektoren.

Neben HpaA interagiert in *Xcv* auch das T3S-Chaperon HpaB mit HrcV (Hartmann und Büttner, 2013). Entsprechend dem *gatekeeper*-Modell würde das T3S-Chaperon in Komplex mit einem Effektor erst nach der Translokation des *gatekeepers* an SctV binden (Yu *et al.*, 2018). Es wäre daher möglich, dass HpaA nicht HpaB blockiert, wie postuliert (Lorenz *et al.*, 2008a), sondern HpaA und HpaB konkurrieren um eine annähernd gleiche Bindungsstelle an HrcV. HpaA vermutlich im Komplex mit dem Translokonsprotein HrpF und seinem Chaperon könnte zunächst eine höhere Affinität zu HrcV besitzen. HrpF wird sekretiert und HpaA verbleibt an HrcV bis alle Bindungsstellen besetzt sind und HpaA seine höhere Affinität verlieren würde (Bange *et al.*, 2010). HpaB, eventuell in Kombination mit HpaC, könnte nun HpaA von HrcV lösen und die Sekretion von HpaA initiieren. Oder ein externes Signal löst die Interaktion zwischen HpaA und HrcV (Cherradi *et al.*, 2013). HpaB und HpaC unterstützen dann die Sekretion und Translokation den ersten Effektors HpaA (Lorenz *et al.*,

2008a). Anschließend könnte HpaB seine Aufgabe als T3S-Chaperon der Effektoren nachgehen, dank der freien Substratbindungsstelle an HrcV (Büttner *et al.*, 2004; Hartmann und Büttner, 2013).

Interaktionsstudien von HrcV mit den konkurrierenden Proteinen HpaA und HpaB, ähnlich dem *chaperone release assay* nach Lorenz *et al.*, 2009, könnten die Theorie stützen. Des Weiteren sollte in zukünftigen Studien geklärt werden, ob HpaA mit den HrcV-Mutanten (Hartmann und Büttner, 2013) interagiert, welche, wie oben beschrieben den Phänotyp der *hpaA*-Mutante widerspiegeln, und inwieweit sich der Phänotyp der HrcV-Mutanten verändert, wenn eines oder beide Kontrollproteine HpaA und HpaB zusätzlich deletiert oder überexprimiert ist oder sind.

Beide Modellvorstellungen von der Beteiligung des *gatekeeper*-Proteins am zweiten Substratspezifitätswechsel werfen noch viele offene Fragen auf. Zumal der Übergang von dem ersten Substratspezifitätswechsel in den zweiten Substratspezifitätswechsel ungeklärt ist. Eine Möglichkeit der Kommunikation zwischen den Sekretionsphasen wäre durch den *gatekeeper* gegeben. So ist bereits aus *E. coli* und *Xcv* bekannt, dass der *gatekeeper* mit dem T3S4-Protein, welches im ersten Substratspezifitätswechsel essentiell ist, interagiert (Gaytán *et al.*, 2017; Shaulov *et al.*, 2017) (Kapitel 3.3.1.). Ob die Interaktion wichtig ist für den Übergang in den nächsten Substratspezifitätswechsel, könnte eine genauere Analyse von *gatekeeper*- und/oder T3S4-Mutanten zeigen, welche nicht mehr miteinander interagieren, jedoch noch die Interaktion mit den anderen Interaktionspartnern besteht.

Literaturverzeichnis

- Abrusci, P., Vergara-Irigaray, M., Johnson, S., Beeby, M. D., Hendrixson, D. R., Roversi, P., Friede, M. E., Deane, J. E., Jensen, G. J., Tang, C. M., Lea, S. M. (2013) Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**:99.
- Akeda, Y., Galán, J. E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- André, I., Bradley, P., Wang, C., Baker, D. (2007) Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:17656-17661.
- Archuleta, T. L., Du, Y., English, C. A., Lory, S., Lesser, C., Ohi, M. D., Ohi, R., Spiller, B. W. (2011) The Chlamydia effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents microtubule assembly. *The Journal of biological chemistry* **286**:33992-33998.
- Archuleta, T. L., Spiller, B. W. (2014) A gatekeeper chaperone complex directs translocator secretion during type three secretion. *PLoS pathogens* **10**:e1004498-e1004498.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**:195-201.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**:977-983.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. And Und Struhl, K. (1996) Current protocols in molecular biology. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Bamyaci, S., Nordfelth, R., Forsberg, Å. (2019) Identification of specific sequence motif of YopN of Yersinia pseudotuberculosis required for systemic infection. *Virulence* **10**:10-25.
- Bange, G., Kümmerer, N., Engel, C., Bozkurt, G., Wild, K., Sinning, I. (2010) FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11295-11300.
- Baron, S. (1996) Introduction to Bacteriology. *Medical Microbiology 4th edition Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston 4th edition*.
- Bennion, B. J., Daggett, V. (2003) The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:5142-5147.

- Berger, C., Robin, G. P., Bonas, U., Koebnik, R. (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiology* **156**:1963-1974.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H. (2015) Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**:521-539.
- Björnfot, A.-C., Lavander, M., Forsberg, Å., Wolf-Watz, H. (2009) Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* Is Important for Regulation of Expression and Secretion of Yop Proteins. *Journal of Bacteriology* **191**:4259-4267.
- Blair, D. F. (1995) How Bacteria Sense and Swim. *Annual Review of Microbiology* **49**:489-520.
- Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M., Schneewind, O. (2006) Characterization of the *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion ATPase YscN and Its Regulator, YscL. *Journal of Bacteriology* **188**:3525-3534.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secreton. *Molecular Microbiology* **39**:652-663.
- Boch, J., Bonas, U. (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology* **48**:419-436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U. (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**:1509-1512.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H.-C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., Van Gijsegem, F. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* **20**:681-683.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., Stall, R. E. (1991) Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**:88.
- Bonas, U., Stall, R. E., Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular and General Genetics MGG* **218**:127-136.
- Botteaux, A., Sory, M. P., Biskri, L., Parsot, C., Allaoui, A. (2009) MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Molecular Microbiology* **71**:449-460.
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41**:459-472.
- Bradbury, J. F. (1984) Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1* (Krieg NR & Holt JG, eds):S. 199-210. Williams and Wilkins, London.

- Broz, P., Mueller, C. A., Müller, S. A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A., Cornelis, G. R. (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Molecular Microbiology* **65**:1311-1320.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S. V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology* **11**:82-88.
- Burkinshaw, B. J., Strynadka, N. C. J. (2014) Assembly and structure of the T3SS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**:1649-1663.
- Büttner, D. (2012) Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**:262-310.
- Büttner, D. (2016) Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews* **40**:894-937.
- Büttner, D., Bonas, U. (2002) Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal* **21**:5313-5322.
- Büttner, D., Bonas, U. (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:107-133.
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D., Bonas, U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular Microbiology* **54**:755-768.
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E., Bonas, U. (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology* **59**:513-527.
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B., Bonas, U. (2002) Functional Analysis of HrpF, a Putative Type III Translocon Protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **184**:2389-2398.
- Cherradi, Y., Hachani, A., Allaoui, A. (2014) Spa13 of *Shigella flexneri* has a dual role: chaperone escort and export gate-activator switch of the type III secretion system. *Microbiology* **160**:130-141.
- Cherradi, Y., Schiavolin, L., Moussa, S., Meghraoui, A., Meksem, A., Biskri, L., Azarkan, M., Allaoui, A., Botteaux, A. (2013) Interplay between predicted inner-rod and gatekeeper in controlling substrate specificity of the type III secretion system. *Molecular Microbiology* **87**:1183-1199.
- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., Lopez, R. (2017) Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic acids research* **45**:W550-W553.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., Johri, B. N. (2007) Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* **47**:289-297.
- Christie, P. J. (2016) The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* **7**:10.1128/ecosalplus.ESP-0020-2015.

- Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A., Lea, S. M. (2003) Helical Structure of the Needle of the Type III Secretion System of *Shigella flexneri*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:17103-17107.
- Dangl, J. L., McDowell, J. M. (2006) Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:8575-8576.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. W., Fielding, A. H. (1984) Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal* **3**:3323-3328.
- Day, J. B., Ferracci, F., Plano, G. V. (2003) Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Molecular Microbiology* **47**:807-823.
- Deane, J. E., Roversi, P., King, C., Johnson, S., Lea, S. M. (2008) Structures of the *Shigella flexneri* Type 3 Secretion System Protein MxiC Reveal Conformational Variability Amongst Homologues. *Journal of Molecular Biology* **377**:985-992.
- Delahay, R. M., Frankel, G. (2002) Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Molecular Microbiology* **45**:905-916.
- Delano, W. L. (2002) Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* **40**:82-92.
- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynadka, N. C. J., Puente, J. L., Finlay, B. B. (2005) Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity* **73**:2135-2146.
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J., Finlay, B. B. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **15**:323.
- Dickenson, N. E., Choudhari, S. P., Adam, P. R., Kramer, R. M., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., Picking, W. L., Picking, W. D. (2013) Oligomeric states of the *Shigella* translocator protein IpaB provide structural insights into formation of the type III secretion translocon. *Protein Science* **22**:614-627.
- Diepold, A. (2019) Assembly and Post-assembly Turnover and Dynamics in the Type III Secretion System. *Current topics in microbiology and immunology*.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., Cornelis, G. R. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *The EMBO Journal* **29**:1928-1940.
- Diepold, A., Armitage, J. P. (2015) Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**:20150020.
- Diepold, A., Kudryashev, M., Delalez, N. J., Berry, R. M., Armitage, J. P. (2015) Composition, Formation, and Regulation of the Cytosolic C-ring, a Dynamic Component of the Type III Secretion Injectisome. *PLOS Biology* **13**:e1002039.

- Diepold, A., Sezgin, E., Huseyin, M., Mortimer, T., Eggeling, C., Armitage, J. P. (2017) A dynamic and adaptive network of cytosolic interactions governs protein export by the T3SS injectisome. *Nature Communications* **8**:15940.
- Diepold, A., Wagner, S. (2014) Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiology Reviews* **38**:802-822.
- Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., Cornelis, G. R. (2012) Assembly of the Yersinia injectisome: the missing pieces. *Molecular Microbiology* **85**:878-892.
- Dietsche, T., Tesfazgi Mebrhatu, M., Brunner, M. J., Abrusci, P., Yan, J., Franz-Wachtel, M., Schärfe, C., Zilkenat, S., Grin, I., Galán, J. E., Kohlbacher, O., Lea, S., Macek, B., Marlovits, T. C., Robinson, C. V., Wagner, S. (2016) Structural and Functional Characterization of the Bacterial Type III Secretion Export Apparatus. *PLoS Pathogens* **12**:e1006071.
- Doidge, E. M. (1920) A tomato canker. *J Dep Agric Union S Afr* **1**:718-721.
- Drehkopf, S., Otten, C., Hausner, J., Seifert, T., Büttner, D. (2020) HrpB7 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is an essential component of the type III secretion system and shares features of HrpO/FliJ/YscO family members. *Cellular Microbiology* **22**:e13160.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., Barton, G. (2015) JPred4: A protein secondary structure prediction server, vol 43.
- Edqvist, P. J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, Å., Wolf-Watz, H., Lloyd, S. A. (2003) YscP and YscU Regulate Substrate Specificity of the Yersinia Type III Secretion System. *Journal of Bacteriology* **185**:2259-2266.
- El Hajjami, N., Moussa, S., Houssa, J., Monteyne, D., Perez-Morga, D., Botteaux, A. (2017) The inner-rod component of *Shigella flexneri* type 3 secretion system, Mxil, is involved in the transmission of the secretion activation signal by its interaction with MxiC. *MicrobiologyOpen*:e00520-n/a.
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S. (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE* **3**:e3647.
- Erhardt, M., Wheatley, P., Kim, E. A., Hirano, T., Zhang, Y., Sarkar, M. K., Hughes, K. T., Blair, D. F. (2017) Mechanism of type-III protein secretion: Regulation of FlhA conformation by a functionally critical charged-residue cluster. *Molecular Microbiology* **104**:234-249.
- Escolar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O., Bonas, U. (2001) Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Molecular Plant Pathology* **2**:287-296.
- Evans, L. D. B., Hughes, C. (2009) Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues Invl and YscO. *Fems Microbiology Letters* **293**:292-297.
- Evans, L. D. B., Stafford, G. P., Ahmed, S., Fraser, G. M., Hughes, C. (2006) An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:17474-17479.
- Feldman, M. F., Cornelis, G. R. (2003) The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiology Letters* **219**:151-158.

- Ferracci, F., Schubot, F. D., Waugh, D. S., Plano, G. V. (2005) Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Molecular Microbiology* **57**:970-987.
- Fields, K. A., Plano, G. V., Straley, S. C. (1994) A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the IcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **176**:569-579.
- Fraser, G. M., González-Pedrajo, B., Tame, J. R. H., Macnab, R. M. (2003) Interactions of FliJ with the Salmonella Type III Flagellar Export Apparatus. *Journal of Bacteriology* **185**:5546-5554.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual review of microbiology* **68**:415-438.
- Gaytán, M. O., Monjarás Fera, J., Soto, E., Espinosa, N., Benítez, J. M., Georgellis, D., González-Pedrajo, B. (2017) Novel insights into the mechanism of SepL-mediated control of effector secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*:e00571-n/a.
- Gazi, A. D., Bastaki, M., Charova, S. N., Gkoukoulia, E. A., Kapellios, E. A., Panopoulos, N. J., Kokkinidis, M. (2008) Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *The Journal of biological chemistry* **283**:34062-34068.
- Gazi, A. D., Sarris, P. F., Fadouloglou, V. E., Charova, S. N., Mathioudakis, N., Panopoulos, N. J., Kokkinidis, M. (2012) Phylogenetic analysis of a gene cluster encoding an additional, rhizobial-like type III secretion system that is narrowly distributed among *Pseudomonas syringae* strains. *BMC Microbiology* **12**:188.
- Gerlach, R. G., Hensel, M. (2007) Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* **297**:401-415.
- Ghosh, P. (2004) Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:771-795.
- Gill, U. S., Lee, S., Mysore, K. S. (2015) Host Versus Nonhost Resistance: Distinct Wars with Similar Arsenal. *Phytopathology* **105**:580-587.
- González-Pedrajo, B., Fraser, G. M., Minamino, T., Macnab, R. M. (2002) Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Molecular Microbiology* **45**:967-982.
- Green, E. R., Meccas, J. (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology Spectrum* **4**.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology* **163**:233-255.
- Hartmann, N., Büttner, D. (2013) The Inner Membrane Protein HrcV from *Xanthomonas* spp. Is Involved in Substrate Docking During Type III Secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**:1176-1189.

- Hartmann, N., Schulz, S., Lorenz, C., Fraas, S., Hause, G., Büttner, D. (2012) Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. *Microbiology* **158**:1334-1349.
- Haudenschild, D. R., Tondravi, M. M., Hofer, U., Chen, Q., Goetinck, P. F. (1995) The Role of Coiled-coil α -Helices and Disulfide Bonds in the Assembly and Stabilization of Cartilage Matrix Protein Subunits: A MUTATIONAL ANALYSIS. *Journal of Biological Chemistry* **270**:23150-23154.
- Hausner, J., Büttner, D. (2014) The YscU/FliH homologue HrcU from *Xanthomonas* controls type III secretion and translocation of early and late substrates. *Microbiology* **160**:576-588.
- Hausner, J., Hartmann, N., Jordan, M., Büttner, D. (2017) The Predicted Lytic Transglycosylase HpaH from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Associates with the Type III Secretion System and Promotes Effector Protein Translocation. *Infection and Immunity* **85**.
- Hausner, J., Hartmann, N., Lorenz, C., Büttner, D. (2013) The Periplasmic HrpB1 Protein from *Xanthomonas* spp. Binds to Peptidoglycan and to Components of the Type III Secretion System. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:6312-6324.
- Hausner, J., Jordan, M., Otten, C., Marillonnet, S., Büttner, D. (2019) Modular Cloning of the Type III Secretion Gene Cluster from the Plant-Pathogenic Bacterium *Xanthomonas euvesicatoria*. *ACS Synthetic Biology* **8**:532-547.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., Silverman, J. M., Ohlson, B. B., Hicks, K. G., Plemel, R. L., Li, M., Schwarz, S., Wang, W. Y., Merz, A. J., Goodlett, D. R., Mougous, J. D. (2010) A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell host & microbe* **7**:25-37.
- Hu, B., Lara-Tejero, M., Kong, Q., Galán, J. E., Liu, J. (2017) In Situ Molecular Architecture of the Salmonella Type III Secretion Machine. *Cell* **168**:1065-1074.e1010.
- Hu, B., Morado, D. R., Margolin, W., Rohde, J. R., Arizmendi, O., Picking, W. L., Picking, W. D., Liu, J. (2015) Visualization of the type III secretion sorting platform of *Shigella flexneri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:1047-1052.
- Hu, J., Worrall, L. J., Vuckovic, M., Hong, C., Deng, W., Atkinson, C. E., Brett Finlay, B., Yu, Z., Strynadka, N. C. J. (2019) T3S injectisome needle complex structures in four distinct states reveal the basis of membrane coupling and assembly. *Nature Microbiology*.
- Hueck, C. J. (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:379-433.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K., Bonas, U. (1998) hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Molecular Microbiology* **29**:1379-1390.
- Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T., Namba, K. (2011) Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**:277.

- Ibuki, T., Uchida, Y., Hironaka, Y., Namba, K., Imada, K., Minamino, T. (2013) Interaction between FliJ and FlhA, Components of the Bacterial Flagellar Type III Export Apparatus. *Journal of Bacteriology* **195**:466-473.
- Imada, K., Minamino, T., Uchida, Y., Kinoshita, M., Namba, K. (2016) Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**:3633-3638.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* **9**:342-353.
- Johnson, S., Kuhlen, L., Deme, J. C., Abrusci, P., Lea, S. M. (2019) The Structure of an Injectisome Export Gate Demonstrates Conservation of Architecture in the Core Export Gate between Flagellar and Virulence Type III Secretion Systems. *mBio* **10**:e00818-00819.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Bouzar, H. (1998) Diversity Among Xanthomonads Pathogenic On Pepper And Tomato. *Annual Review of Phytopathology* **36**:41-58.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**:323.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., Bonas, U. (2007) A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* **318**:648-651.
- Kenjale, R., Wilson, J., Zenk, S. F., Saurya, S., Picking, W. L., Picking, W. D., Blocker, A. (2005) The needle component of the type III secretin of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* **280**:42929-42937.
- Kim, J.-G., Stork, W., Mudgett, Mary b. (2013) Xanthomonas Type III Effector XopD Desumoylates Tomato Transcription Factor SIERF4 to Suppress Ethylene Responses and Promote Pathogen Growth. *Cell Host & Microbe* **13**:143-154.
- Kim, J.-G., Taylor, K. W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E. A., Mudgett, M. B. (2008) XopD SUMO Protease Affects Host Transcription, Promotes Pathogen Growth, and Delays Symptom Development in Xanthomonas-Infected Tomato Leaves. *The Plant Cell* **20**:1915-1929.
- Kim, J.-G., Taylor, K. W., Mudgett, M. B. (2011) Comparative analysis of the XopD type III secretion (T3S) effector family in plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* **12**:715-730.
- Knoop, V., Staskawicz, B., Bonas, U. (1991) Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *Journal of Bacteriology* **173**:7142-7150.
- Koebnik, R., Krüger, A., Thieme, F., Urban, A., Bonas, U. (2006) Specific Binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes. *Journal of Bacteriology* **188**:7652-7660.
- Kondo, K., Takeyama, Y., Sunamura, E.-I., Madoka, Y., Fukaya, Y., Isu, A., Hisabori, T. (2018) Amputation of a C-terminal helix of the γ subunit increases ATP-hydrolysis activity of cyanobacterial F1 ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1859**:319-325.

- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. (2019) Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System. *EcoSal Plus* **8**:10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., Hol, W. G. J. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology* **10**:336-351.
- Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1998) Response of Bell Pepper Cultivars to Bacterial Spot Pathogen Races that Individually Overcome Major Resistance Genes. *Plant Disease* **82**:181-186.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
- Kubori, T., Galán, J. E. (2002) Salmonella Type III Secretion-Associated Protein InvE Controls Translocation of Effector Proteins into Host Cells. *Journal of Bacteriology* **184**:4699-4708.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E., Aizawa, S.-I. (1998) Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. *Science* **280**:602-605.
- Kuhlen, L., Abrusci, P., Johnson, S., Gault, J., Deme, J., Caesar, J., Dietsche, T., Mebrhatu, M. T., Ganief, T., Macek, B., Wagner, S., Robinson, C. V., Lea, S. M. (2018) Structure of the core of the type III secretion system export apparatus. *Nature structural & molecular biology* **25**:583-590.
- Lacroix, B., Citovsky, V. (2019) Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annu Rev Phytopathol* **57**:231-251.
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., Galán, J. E. (2011) A Sorting Platform Determines the Order of Protein Secretion in Bacterial Type III Systems. *Science* **331**:1188-1191.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P. J., Lloyd, S. A., Wolf-Watz, H., Forsberg, Å. (2002) Proteolytic Cleavage of the FlhB Homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* Is Essential for Bacterial Survival but Not for Type III Secretion. *Journal of Bacteriology* **184**:4500-4509.
- Lee, P.-C., Zmina, S. E., Stopford, C. M., Toska, J., Rietsch, A. (2014) Control of type III secretion activity and substrate specificity by the cytoplasmic regulator PcrG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:E2027-E2036.
- Li, H., Sourjik, V. (2011) Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **80**:886-899.
- Liu, L. Y., Nie, P., Yu, H. B., Xie, H. X. (2017) Regulation of Type III Secretion of Translocon and Effector Proteins by the EsaB/EsaL/EsaM Complex in *Edwardsiella tarda*. *Infection and Immunity* **85**.

- Lonjon, F., Turner, M., Henry, C., Rengel, D., Lohou, D., Van De Kerkhove, Q., Cazalé, A.-C., Peeters, N., Genin, S., Vaillau, F. (2016) Comparative Secretome Analysis of *Ralstonia solanacearum* Type 3 Secretion-Associated Mutants Reveals a Fine Control of Effector Delivery, Essential for Bacterial Pathogenicity. *Molecular & Cellular Proteomics* **15**:598-613.
- Loquet, A., Sgourakis, N. G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D., Becker, S., Lange, A. (2012) Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* **486**:276-279.
- Lorenz, C., Büttner, D. (2009) Functional Characterization of the Type III Secretion ATPase HrcN from the Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **191**:1414-1428.
- Lorenz, C., Büttner, D. (2011) Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Molecular Microbiology* **79**:447-467.
- Lorenz, C., Hausner, J., Büttner, D. (2012) HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. *PLOS ONE* **7**:e51063.
- Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U., Büttner, D. (2008a) HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Molecular Microbiology* **69**:344-360.
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U., Büttner, D. (2008b) HpaC Controls Substrate Specificity of the *Xanthomonas* Type III Secretion System. *PLOS Pathogens* **4**:e1000094.
- Lorenzini, E., Singer, A., Singh, B., Lam, R., Skarina, T., Chirgadze, N. Y., Savchenko, A., Gupta, R. S. (2010) Structure and Protein-Protein Interaction Studies on *Chlamydia trachomatis* Protein CT670 (YscO Homolog). *Journal of Bacteriology* **192**:2746-2756.
- Mahrenholz, C. C., Abfalter, I. G., Bodenhofer, U., Volkmer, R., Hochreiter, S. (2011) Complex networks govern coiled-coil oligomerization--predicting and profiling by means of a machine learning approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**:M110.004994-M004110.004994.
- Majewski, D. D., Worrall, L. J., Hong, C., Atkinson, C. E., Vuckovic, M., Watanabe, N., Yu, Z., Strynadka, N. C. J. (2019) Cryo-EM structure of the homohexameric T3SS ATPase-central stalk complex reveals rotary ATPase-like asymmetry. *Nature Communications* **10**:626.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M., Galán, J. E. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**:637.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galán, J. E., Unger, V. M. (2004) Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex. *Science (New York, NY)* **306**:1040-1042.
- Marois, E., Van Den Ackerveken, G., Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* Type III Effector Protein AvrBs3 Modulates Plant Gene Expression and Induces Cell Hypertrophy in the Susceptible Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:637-646.

- Martinez-Argudo, I., Blocker, A. J. (2010) The Shigella T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors. *Molecular Microbiology* **78**:1365-1378.
- Mason, J. M., Arndt, K. M. (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **5**:170-176.
- Matteï, P.-J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., Dessen, A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS Journal* **278**:414-426.
- Mcdermott, J. E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E. D., Sharp, D., Adkins, J. N., Samudrala, R., Heffron, F. (2011) Computational Prediction of Type III and IV Secreted Effectors in Gram-Negative Bacteria. *Infection and Immunity* **79**:23-32.
- Mcdowell, M. A., Johnson, S., Deane, J. E., Cheung, M., Roehrich, A. D., Blocker, A. J., Mcdonnell, J. M., Lea, S. M. (2011) Structural and Functional Studies on the N-terminal Domain of the Shigella Type III Secretion Protein MxiG. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:30606-30614.
- Mcmurry, J. L., Van Arnam, J. S., Kihara, M., Macnab, R. M. (2004) Analysis of the Cytoplasmic Domains of Salmonella FlhA and Interactions with Components of the Flagellar Export Machinery. *Journal of Bacteriology* **186**:7586-7592.
- Ménard, R., Sansonetti, P. J., Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells. *Journal of Bacteriology* **175**:5899-5906.
- Michiels, T., Cornelis, G. R. (1991) Secretion of hybrid proteins by the Yersinia Yop export system. *Journal of Bacteriology* **173**:1677-1685.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., Macnab, R. M. (2000) Role of FliJ in Flagellar Protein Export in Salmonella. *Journal of Bacteriology* **182**:4207-4215.
- Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P. D., Namba, K. (2012) Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Molecular Microbiology* **83**:775-788.
- Minamino, T., Macnab, R. M. (1999) Components of the Salmonella Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates. *Journal of Bacteriology* **181**:1388-1394.
- Minamino, T., Macnab, R. M. (2000a) Domain Structure of Salmonella FlhB, a Flagellar Export Component Responsible for Substrate Specificity Switching. *Journal of Bacteriology* **182**:4906-4914.
- Minamino, T., Macnab, R. M. (2000b) Interactions among components of the Salmonella flagellar export apparatus and its substrates. *Molecular Microbiology* **35**:1052-1064.
- Minamino, T., Namba, K. (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**:485.

- Minsavage, G., Dahlbeck, D., Whalen, M., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B., Stall, R. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**:41-47.
- Morimoto, Y. V., Ito, M., Hiraoka, K. D., Che, Y.-S., Bai, F., Kami-Ike, N., Namba, K., Minamino, T. (2014) Assembly and stoichiometry of FliF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body. *Molecular Microbiology* **91**:1214-1226.
- Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Rossier, O., Bonas, U., Staskawicz, B. J. (2000) Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13324-13329.
- Mueller, C. A., Broz, P., Cornelis, G. R. (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular Microbiology* **68**:1085-1095.
- Mukaihara, T., Tamura, N., Iwabuchi, M. (2010) Genome-Wide Identification of a Large Repertoire of *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Proteins by a New Functional Screen. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**:251-262.
- Mukerjea, R., Ghosh, P. (2013) Functionally Essential Interaction between *Yersinia* YscO and the T3S4 Domain of YscP. *Journal of Bacteriology* **195**:4631-4638.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D. A., Keen, N. T. (1994) Characterization of pPT23B, the Plasmid Involved in Syringolide Production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid* **31**:275-287.
- Noël, L., Thieme, F., Gäbler, J., Büttner, D., Bonas, U. (2003) XopC and XopJ, Two Novel Type III Effector Proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **185**:7092-7102.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2002) Two Novel Type III-Secreted Proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Are Encoded within the *hrp* Pathogenicity Island. *Journal of Bacteriology* **184**:1340-1348.
- Notti, R. Q., Bhattacharya, S., Lilic, M., Stebbins, C. E. (2015) A common assembly module in injectisome and flagellar type III secretion sorting platforms. *Nature Communications* **6**:7125.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**:249-266.
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Abe, A. (2006) Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **188**:2801-2811.
- Oh, C.-S., Carpenter, S. C. D., Hayes, M. L., Beer, S. V. (2010) Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **156**:1211-1220.
- Ohgita, T., Hayashi, N., Hama, S., Tsuchiya, H., Gotoh, N., Kogure, K. (2013) A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force-dependent type III secretion apparatus rotation. *The FASEB Journal* **27**:2862-2872.

- Ohgita, T., Saito, H. (2019) Biophysical Mechanism of Protein Export by Bacterial Type III Secretion System. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **67**:341-344.
- Ohnishi, K., Fan, F., Schoenhals, G. J., Kihara, M., Macnab, R. M. (1997) The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *Journal of Bacteriology* **179**:6092-6099.
- Pallen, M. J., Beatson, S. A., Bailey, C. M. (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC microbiology* **5**:9-9.
- Palmer, T., Berks, B. C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* **149**:547-556.
- Papanikou, E., Karamanou, S., Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology* **5**:839.
- Park, D., Lara-Tejero, M., Waxham, M. N., Li, W., Hu, B., Galán, J. E., Liu, J. (2018) Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella*–host cell interface using cryo-electron tomography. *eLife* **7**:e39514.
- Parsot, C., Hamiaux, C., Page, A.-L. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **6**:7-14.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D. F., Hughes, K. T. (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**:489.
- Payne, P. L., Straley, S. C. (1998) YscO of *Yersinia pestis* Is a Mobile Core Component of the Yop Secretion System. *Journal of Bacteriology* **180**:3882-3890.
- Pellicic, V., Reyrat, J. M., Gicquel, B. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **178**:1197-1199.
- Plano, G., Joseph, S. (2013) The SycN/YscB chaperone-binding domain of YopN is required for the calcium-dependent regulation of Yop secretion by *Yersinia pestis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Balabanidou, V., Rayo, J., Tsigotaki, A., Crepin, V. F., Frankel, G., Kalodimos, C. G., Karamanou, S., Economou, A. (2017) Hierarchical protein targeting and secretion is controlled by an affinity switch in the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **36**:3517-3531.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V., Economou, A. (2016) Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends in Biochemical Sciences* **41**:175-189.
- Preiss, L., Hicks, D., Suzuki, S., Meier, T., Krulwich, T. (2015) Alkaliphilic Bacteria with Impact on Industrial Applications, Concepts of Early Life Forms, and Bioenergetics of ATP Synthesis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **3**:75.
- Prochaska, H., Thieme, S., Daum, S., Grau, J., Schmidtke, C., Hallensleben, M., John, P., Bacia, K., Bonas, U. (2018) A conserved motif promotes HpaB-regulated export of type III effectors from *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **0**.

- Pugsley, A. P., Francetic, O., Hardie, K., Possot, O., Sauvonnet, N., Seydel, A. (1997) Pullulanase: Model Protein Substrate for the General Secretory Pathway of Gram-Negative Bacteria. *Folia microbiologica* **42**:184-192.
- Riordan, K. E., Schneewind, O. (2008) YscU cleavage and the assembly of Yersinia type III secretion machine complexes. *Molecular microbiology* **68**:1485-1501.
- Robinson, C., Bolhuis, A. (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1694**:135-147.
- Roehrich, A. D., Bordignon, E., Mode, S., Shen, D.-K., Liu, X., Pain, M., Murillo, I., Martinez-Argudo, I., Sessions, R. B., Blocker, A. J. (2017) Steps for Shigella Gatekeeper Protein MxiC Function in Hierarchical Type III Secretion Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **292**:1705-1723.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauß, T., Bonas, U., Lahaye, T. (2007) Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science* **318**:645-648.
- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., Pérez-Vicente, R. (2019) Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Romo-Castillo, M., Andrade, A., Espinosa, N., Monjarás Fera, J., Soto, E., Díaz-Guerrero, M., González-Pedrajo, B. (2014) EscO, a Functional and Structural Analog of the Flagellar FliJ Protein, Is a Positive Regulator of EscN ATPase Activity of the Enteropathogenic Escherichia coli Injectisome. *Journal of Bacteriology* **196**:2227-2241.
- Rossier, O., Van Den Ackerveken, G., Bonas, U. (2000) HrpB2 and HrpF from Xanthomonas are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology* **38**:828-838.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K., Bonas, U. (1999) The Xanthomonas Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:9368-9373.
- Rüssmann, H., Kubori, T., Sauer, J., Galán, J. E. (2002) Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the Salmonella enterica InvJ protein. *Molecular Microbiology* **46**:769-779.
- Sani, M., Allaoui, A., Fusetti, F., Oostergetel, G. T., Keegstra, W., Boekema, E. J. (2007) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of Shigella flexneri. *Micron* **38**:291-301.
- Schechter, L. M., Valenta, J. C., Schneider, D. J., Collmer, A., Sakk, E. (2012) Functional and Computational Analysis of Amino Acid Patterns Predictive of Type III Secretion System Substrates in Pseudomonas syringae. *PLOS ONE* **7**:e36038.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**:305-310.
- Scheibner, F., Hartmann, N., Hausner, J., Lorenz, C., Hoffmeister, A.-K., Büttner, D. (2018) The Type III Secretion Chaperone HpaB Controls the Translocation of Effector and

- Noneffector Proteins From *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**:61-74.
- Scheibner, F., Marillonnet, S., Büttner, D. (2017) The TAL Effector AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Contains Multiple Export Signals and Can Enter Plant Cells in the Absence of the Type III Secretion Translocon. *Frontiers in Microbiology* **8**.
- Scheibner, F., Schulz, S., Hausner, J., Marillonnet, S., Büttner, D. (2016) Type III-Dependent Translocation of HrpB2 by a Nonpathogenic hpaABC Mutant of the Plant-Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:3331-3347.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E., Wolf-Watz, H. (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *Journal of Bacteriology* **178**:7227-7233.
- Scholtz, J. M., Barrick, D., York, E. J., Stewart, J. M., Baldwin, R. L. (1995) Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:185-189.
- Scholze, H., Boch, J. (2010) TAL effector-DNA specificity. *Virulence* **1**:428-432.
- Scholze, H., Boch, J. (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology* **14**:47-53.
- Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J. E., Marlovits, T. C. (2010) Topology and Organization of the *Salmonella typhimurium* Type III Secretion Needle Complex Components. *PLoS Pathogens* **6**:e1000824.
- Schraidt, O., Marlovits, T. C. (2011) Three-Dimensional Model of *Salmonella*'s Needle Complex at Subnanometer Resolution. *Science* **331**:1192-1195.
- Schubot, F. D., Jackson, M. W., Penrose, K. J., Cherry, S., Tropea, J. E., Plano, G. V., Waugh, D. S. (2005) Three-dimensional Structure of a Macromolecular Assembly that Regulates Type III Secretion in *Yersinia pestis*. *Journal of Molecular Biology* **346**:1147-1161.
- Schulte, R., Bonas, U. (1992a) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of Bacteriology* **174**:815-823.
- Schulte, R., Bonas, U. (1992b) A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. *The Plant Cell* **4**:79-86.
- Schulz, S., Büttner, D. (2011) Functional Characterization of the Type III Secretion Substrate Specificity Switch Protein HpaC from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Infection and Immunity* **79**:2998-3011.
- Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Krüger, A., Lee, J., Müller, O., Scheel, D., Szczeny, R., Thieme, F., Bonas, U. (2012) Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist* **195**:894-911.

- Shaulov, L., Gershberg, J., Deng, W., Finlay, B. B., Sal-Man, N. (2017) The Ruler Protein EscP of the Enteropathogenic Escherichia coli Type III Secretion System Is Involved in Calcium Sensing and Secretion Hierarchy Regulation by Interacting with the Gatekeeper Protein SepL. *mBio* **8**.
- Shen, D.-K., Blocker, A. J. (2016) MxiA, MxiC and IpaD Regulate Substrate Selection and Secretion Mode in the T3SS of Shigella flexneri. *PLOS ONE* **11**:e0155141.
- Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A.-K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M., Büttner, D. (2015) Xanthomonas campestris pv. vesicatoria Secretes Proteases and Xylanases via the Xps Type II Secretion System and Outer Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology* **197**:2879-2893.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I., Cornelis, G. R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the cyaA gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:11998-12002.
- Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N. S., Alegria, M. C., Barbosa, L. R. S., Salinas, R. K., Guzzo, C. R., Farah, C. S. (2015) Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications* **6**:6453.
- Stebbins, C. E., Galán, J. E. (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**:77.
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Sa-Pessoa Graca Santos, J., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., Palacios, L., Marshall, H., Hopley, L., Molina, M., Cid, V. J., Salminen, T. A., Bengoechea, J. A. (2020) Klebsiella pneumoniae type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS pathogens* **16**:e1007969-e1007969.
- Sukhan, A., Kubori, T., Galán, J. E. (2003) Synthesis and Localization of the Salmonella SPI-1 Type III Secretion Needle Complex Proteins PrgI and PrgJ. *Journal of Bacteriology* **185**:3480-3483.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U., Büttner, D. (2010) Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv vesicatoria. *New Phytologist* **187**:983-1002.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., Van Den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the Xanthomonas type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *The Plant Journal* **26**:523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the Xanthomonas AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* **46**:13-23.
- Tampakaki, A. (2014) Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J., Kokkinidis, M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology* **6**:805-816.

- Taylor, W. R., Matthews-Palmer, T. R. S., Beeby, M. (2016) Molecular Models for the Core Components of the Flagellar Type-III Secretion Complex. *PLoS ONE* **11**:e0164047.
- Thomas, N. A., Deng, W., Puente, J. L., Frey, E. A., Yip, C. K., Strynadka, N. C. J., Finlay, B. B. (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **57**:1762-1779.
- Torres-Vargas, C. E., Kronenberger, T., Roos, N., Dietsche, T., Poso, A., Wagner, S. (2019) The inner rod of virulence-associated type III secretion systems constitutes a needle adapter of one helical turn that is deeply integrated into the system's export apparatus. *Molecular Microbiology* **112**:918-931.
- Triplett, L. R., Melotto, M., Sundin, G. W. (2009) Functional Analysis of the N Terminus of the *Erwinia amylovora* Secreted Effector DspA/E Reveals Features Required for Secretion, Translocation, and Binding to the Chaperone DspB/F. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**:1282-1292.
- Troisfontaines, P., Cornelis, G. R. (2005) Type III Secretion: More Systems Than You Think. *Physiology* **20**:326-339.
- Tseytin, I., Mitrovic, B., David, N., Langenfeld, K., Zarivach, R., Diepold, A., Sal-Man, N. (2019) The Role of the Small Export Apparatus Protein, SctS, in the Activity of the Type III Secretion System. *Frontiers in Microbiology* **10**.
- Üstün, S., Bartetzko, V., Börnke, F. (2013) The *Xanthomonas campestris* Type III Effector XopJ Targets the Host Cell Proteasome to Suppress Salicylic-Acid Mediated Plant Defence. *PLoS Pathogens* **9**:e1003427.
- Van Den Ackerveken, G., Marois, E., Bonas, U. (1996) Recognition of the Bacterial Avirulence Protein AvrBs3 Occurs inside the Host Plant Cell. *Cell* **87**:1307-1316.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. (2004) The Transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**:895-908.
- Wagner, S., Grin, I., Malmsheimer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E., Westerhausen, S. (2018) Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiology Letters* **365**.
- Wagner, S., Königsmaier, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Marlovits, T. C., Galán, J. E. (2010) Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:17745-17750.
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., Xiao, H., He, P., Ou, H.-Y., Tao, J., Teng, Q., Lu, J., Wu, W., Yao, Y.-F. (2017) Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS pathogens* **13**:e1006246-e1006246.
- Wang, D., Roe, A. J., Mcateer, S., Shipston, M. J., Gally, D. L. (2008) Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir. *Molecular Microbiology* **69**:1499-1512.
- Waterhouse, A., Rempfer, C., Heer, F. T., Studer, G., Tauriello, G., Bordoli, L., Bertoni, M., Gumienny, R., Lepore, R., Bienert, S., De beer, T. A p., Schwede, T. (2018) SWISS-

- MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**:W296-W303.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**:1189-1191.
- Weber, E., Koebnik, R. (2005) Domain Structure of HrpE, the Hrp Pilus Subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **187**:6175-6186.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T. K., Bonas, U., Koebnik, R. (2005) The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants. *Journal of Bacteriology* **187**:2458-2468.
- Wengelnik, K., Bonas, U. (1996) HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* **178**:3462-3469.
- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M., Bonas, U. (1996a) Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *Journal of Bacteriology* **178**:1061-1069.
- Wengelnik, K., Rossier, O., Bonas, U. (1999) Mutations in the Regulatory Gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Result in Constitutive Expression of All hrp Genes. *Journal of Bacteriology* **181**:6828-6831.
- Wengelnik, K., Van Den Ackerveken, G., Bonas, U. (1996b) HrpG, a key hrp regulator protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators, vol 9.
- Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., Duhr, S. (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications* **1**:100.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., Trülsch, K. (2004) *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion Depends on the Proton Motive Force but Not on the Flagellar Motor Components MotA and MotB. *Infection and Immunity* **72**:4004-4009.
- Williams, A. W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S. I., Kawagishi, I., Macnab, R. M. (1996) Mutations in fliK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **178**:2960-2970.
- Wood, S. E., Jin, J., Lloyd, S. A. (2008) YscP and YscU Switch the Substrate Specificity of the *Yersinia* Type III Secretion System by Regulating Export of the Inner Rod Protein YscI. *Journal of Bacteriology* **190**:4252-4262.
- Worrall, L. J., Hong, C., Vuckovic, M., Deng, W., Bergeron, J. R. C., Majewski, D. D., Huang, R. K., Spreter, T., Finlay, B. B., Yu, Z., Strynadka, N. C. J. (2016) Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature* **540**:597.
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Brett Finlay, B., Miller, S. I., Strynadka, N. C. J. (2005) Structural

- characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**:702.
- Younis, R., Bingle, L. E. H., Rollauer, S., Munera, D., Busby, S. J., Johnson, S., Deane, J. E., Lea, S. M., Frankel, G., Pallen, M. J. (2010) SepL Resembles an Aberrant Effector in Binding to a Class 1 Type III Secretion Chaperone and Carrying an N-Terminal Secretion Signal. *Journal of Bacteriology* **192**:6093-6098.
- Yu, X.-J., Grabe, G. J., Liu, M., Mota, L. J., Holden, D. W. (2018) SsaV Interacts with SsaL to Control the Translocon-to-Effector Switch in the Salmonella SPI-2 Type Three Secretion System. *mBio* **9**:e01149-01118.
- Yu, X.-J., Mcgourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E., Holden, D. W. (2010) pH Sensing by Intracellular Salmonella Induces Effector Translocation. *Science* **328**:1040-1043.
- Zenk, S. F., Stabat, D., Hodgkinson, J. L., Veenendaal, A. K. J., Johnson, S., Blocker, A. J. (2007) Identification of minor inner-membrane components of the Shigella type III secretion system 'needle complex'. *Microbiology* **153**:2405-2415.
- Zhong, D., Lefebvre, M., Kaur, K., Mcdowell, M. A., Gdowski, C., Jo, S., Wang, Y., Benedict, S. H., Lea, S. M., Galan, J. E., De Guzman, R. N. (2012) The Salmonella Type III Secretion System Inner Rod Protein PrgJ Is Partially Folded. *The Journal of Biological Chemistry* **287**:25303-25311.
- Zhou, N. E., Kay, C. M., Hodges, R. S. (1993) Disulfide bond contribution to protein stability: Positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded .alpha.-helical coiled-coil. *Biochemistry* **32**:3178-3187.
- Zilkenat, S., Franz-Wachtel, M., Stierhof, Y.-D., Galán, J. E., Macek, B., Wagner, S. (2016) Determination of the Stoichiometry of the Complete Bacterial Type III Secretion Needle Complex Using a Combined Quantitative Proteomic Approach. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* **15**:1598-1609.
- Zipfel, C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology* **20**:10-16.

5. Anhang

Tabelle 16: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
Leervektoren		
pBRM	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>3xc-myc</i> , <i>Gent^R</i>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
pBRM-P	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>3xc-myc</i> , <i>Gent^R</i>	(Szczesny <i>et al.</i> , 2010)
pBRM(Stopp)	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, Stoppcodon, <i>Gent^R</i>	(Hausner <i>et al.</i> , 2017)
pBRM-P(Stopp)	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>lac</i> -Promotor und <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, Stoppcodon, <i>Gent^R</i>	(Hausner <i>et al.</i> , 2013)
pBRM-P+T	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>rmbT1</i> -Terminator, <i>lac</i> -Promotor und <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>3xc-myc</i> , <i>Gent^R</i>	Helm und Schmidtke, unpubliziert
pBR356	pBBR1MCS-5-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>avrBs3Δ2</i> (<i>AvrBs3_{Δ1-152}</i>)-FLAG, <i>Gent^R</i>	(Schulze <i>et al.</i> , 2012; Scheibner <i>et al.</i> , 2016)
pOGG2	Suizidvektor, pOK1-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, <i>lacZ</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>Spec^R</i>	(Schulze <i>et al.</i> , 2012)
pUC57	Klonierungsvektor, <i>SmaI</i> , <i>Amp^R</i>	Genscript, USA
pUC57 ptac <i>gst</i>	pUC57-Derivat, <i>tac</i> -Promotor und <i>gst</i> flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>Amp^R</i>	unpubliziert
pGEX-2TKM	pGEX-2TK-Derivat mit Polylinker von pDSK604, GST-Expressionvektor, <i>tac</i> -Promotor, <i>gst</i> , <i>lacI</i> , pBR322 <i>ori</i> , <i>Amp^R</i>	(Escolar <i>et al.</i> , 2001); Stratagene
pDSK602	„ <i>broad-host-range</i> “-Plasmid, 3 x <i>lacUV5</i> -Promotor, <i>Spec^R</i>	(Murillo <i>et al.</i> , 1994)
pDSK604	pDSK602-Derivat, modifizierter Polylinker, <i>Spec^R</i>	(Escolar <i>et al.</i> , 2001)
pGGE10	pQE-60-Derivat, T7-Promotor, <i>His₆-NusA</i> , Thrombin-Schnittstelle, <i>Chloramphenicol^R-ccdB</i> -Gen flankiert von <i>Bsal</i> -Schnittstellen, <i>Kan^R</i>	Thieme, unpubliziert
<i>hrcS</i>-Expressionskonstrukte		
pBRM <i>hrcS</i>	pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrcS</i> -c-Myc, <i>Gent^R</i>	Diese Arbeit
pBRM _{Δ<i>lac</i>} <i>hrcS</i>	pBRM-Derivat, Deletion im <i>lac</i> -Promotor (Δ40-131), kodiert <i>HrcS</i> -c-Myc, <i>Gent^R</i>	Bachelorarbeit Friederike Hantel, 2016
pBRM(Stopp) _{Δ<i>lac</i>} <i>hrcS</i>	pBRM(Stopp)-Derivat, Deletion im <i>lac</i> -Promotor (Δ40-131), kodiert <i>HrcS</i> , <i>Gent^R</i>	Diese Arbeit
pBRM _{Δ<i>lac</i>} <i>hrcS</i> _{Δ56-86}	pBRM-Derivat, Deletion im <i>lac</i> -Promotor (Δ40-131), kodiert <i>HrcS</i> _{Δ56-86} -c-Myc, <i>Gent^R</i>	Diese Arbeit
pBRM-P <i>hrcS</i>	pBRM-P-Derivat, kodiert <i>HrcS</i> -c-Myc, <i>Gent^R</i>	Diese Arbeit
pBRM-P+T <i>hrcS</i>	pBRM-P+T-Derivat, kodiert <i>HrcS</i> -c-Myc, <i>Gent^R</i>	Diese Arbeit
pGEX <i>hrcS</i>	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST- <i>HrcS</i>	Diese Arbeit
<i>hrpB7</i>-Expressionskonstrukte		
pBRM <i>hrpB7</i>	pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> -c-Myc, <i>Gent^R</i>	
pBRM(Stopp) <i>hrpB7</i>	pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> , <i>Gent^R</i>	
pBRM <i>hrpB7</i> _{C1A}	pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> _{C43A} -c-Myc, <i>Gent^R</i>	
pBRM(Stopp) <i>hrpB7</i> _{C1A}	pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> _{C43A} , <i>Gent^R</i>	(Drehkopf <i>et al.</i> , 2020)
pBRM <i>hrpB7</i> _{C2A}	pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> _{C29A,C36A} -c-Myc, <i>Gent^R</i>	
pBRM(Stopp) <i>hrpB7</i> _{C2A}	pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> _{C29A,C36A} , <i>Gent^R</i>	
pBRM <i>hrpB7</i> _{C3A}	pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert <i>HrpB7</i> _{C29A,C36A,C43A} -c-Myc, <i>Gent^R</i>	
pBRM(Stopp) <i>hrpB7</i> _{C3A}	pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	

pBRM hrpB7 _{C5A}	HrpB7 _{C29A,C36A,C43A} , Gent ^R pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	
pBRM(Stopp) hrpB7 _{C5A}	HrpB7 _{C29A,C36A,C43A,C50A,C57A} -c-Myc, Gent ^R pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	
pBRM hrpB7 _{Δ144-154}	HrpB7 _{C29A,C36A,C43A,C50A,C57A} , Gent ^R pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert HrpB7 _{Δ144-}	Diese Arbeit
pBRM(Stopp) hrpB7 _{Δ144-154}	154-c-Myc, Gent ^R pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	Diese Arbeit
pBRM hrpB7 _{144-154mut}	HrpB7 _{Δ144-154} , Gent ^R pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert HrpB7 ₁₄₄₋	Diese Arbeit
pBRM(Stopp) hrpB7 _{144-154mut}	154mut-c-Myc, Gent ^R pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	Diese Arbeit
pBRM hrpB7 _{Δ81-100}	HrpB7 _{144-154mut} , Gent ^R pBRM-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert HrpB7 _{Δ81-}	Diese Arbeit
pBRM(Stopp) hrpB7 _{Δ81-100}	100-c-Myc, Gent ^R pBRM(Stopp)-Derivat, <i>lac</i> -Promotor, kodiert	Diese Arbeit
pBRM-P(Stopp) ptac gst hrpB7	HrpB7 _{Δ81-100} , Gent ^R pBRM-P(Stopp)-Derivat, <i>tac</i> -Promotor, kodiert	(Drehkopf <i>et al.</i> , 2020)
pGGE10 hrpB7	GST-HrpB7, Gent ^R pGGE10-Derivat, kodiert His ₆ -NusA-HrpB7,	Diese Arbeit
	Kan ^R	
<i>hpaA</i>-Expressionskonstrukte		
pBRM hpaA	pBRM-Derivat, kodiert HpaA-c-Myc, Gent ^R	Lorenz, unpubliziert
pBRM hpaA _{Δ225-275}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{Δ225-275} -c-Myc,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBRM hpaA _{Δ2-69}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{Δ2-69} -c-Myc, Gent ^R	Lorenz, unpubliziert
pBRM hpaA _{Δ2-69,Δ225-275}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{Δ2-69,Δ225-275} -c-Myc,	Lorenz, unpubliziert
	Gent ^R	
pBRM hpaA _{Δ71-224}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{Δ71-224} -c-Myc, Gent ^R	Diese Arbeit
pBRM hpaA _{NLS1m}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{NLS1m} -c-Myc, Gent ^R	Diese Arbeit
pBRM hpaA _{NLS2m}	pBRM-Derivat, kodiert HpaA _{NLS2m} -c-Myc, Gent ^R	Diese Arbeit
pBR356 hpaA	pBR356-Derivat, kodiert HpaA-AvrBs3Δ2, Gent ^R	Diese Arbeit
pBR356 hpaA ₁₋₇₀	pBR356-Derivat, kodiert HpaA ₁₋₇₀ -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 hpaA _{Δ2-69}	pBR356-Derivat, kodiert HpaA _{Δ2-69} -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 hpaA _{NLS1m}	pBR356-Derivat, kodiert HpaA _{NLS1m} -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 hpaA _{Δ225-275}	pBR356-Derivat, kodiert HpaA _{Δ225-275} -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 hpaA _{NLS2m}	pBR356-Derivat, kodiert HpaA _{NLS2m} -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 hpaA _{Δ231-240}	pBR356-Derivat, kodiert HpaA _{Δ231-240} -AvrBs3Δ2,	Diese Arbeit
	Gent ^R	
pBR356 xopA	pBR356-Derivat, kodiert XopA-AvrBs3Δ2, Gent ^R	Hoffmeister, unpubliziert
pBR356 xopA-hpaA ₂₂₅₋₂₇₅	pBR356-Derivat, kodiert XopA-HpaA ₂₂₅₋₂₇₅ -	(Scheibner <i>et al.</i> , 2018)
	AvrBs3Δ2, Gent ^R	
pBR356 hpaA ₁₋₇₀ -xopA-hpaA ₂₂₅₋₂₇₅	pBR356-Derivat, kodiert HpaA ₁₋₇₀ -XopA-	Diese Arbeit
	HpaA ₂₂₅₋₂₇₅ -AvrBs3Δ2, Gent ^R	
pBR356 hpaA ₁₋₇₀ -xopA	pBR356-Derivat, kodiert HpaA ₁₋₇₀ -XopA-	Diese Arbeit
	AvrBs3Δ2, Gent ^R	
Deletionskonstrukte		
pOGG2:hrcS	pOGG2-Derivat, enthält die flankierenden	Hausner, unpubliziert
	Regionen von <i>hrcS</i>	
pOGG2:hrpB7	pOGG2-Derivat, enthält die flankierenden	Diese Arbeit
	Regionen von <i>hrpB7</i>	
Weitere verwendete Expressionskonstrukte		
pDSF300	pDSK602-Derivat, kodiert AvrBs3-FLAG, Spec ^R	(Van Den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996)
pDSK hrpF ₂₀₀₋₃₅₆	pDSK602- Derivat, kodiert HrpF ₁₋₂₀₀ -AvrBs3Δ2,	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
	Spec ^R	
pDSK xopF ₁₂₀₀₋₃₅₆	pDSK602-Derivat, kodiert XopF ₁₋₂₀₀ -AvrBs3Δ2,	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
	Spec ^R	
pDSK hpaB	pDSK604-Derivat, kodiert HpaB-c-Myc, Spec ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2004)
pDSK hpaC	pDSK604-Derivat, kodiert HpaC-c-Myc, Spec ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
pDSK hrcl	pDSK604-Derivat, kodiert Hrcl-c-Myc, Spec ^R	(Lorenz und Büttner,

pDSK hrcQ	pDSK602-Derivat, kodiert HrcQ-c-Myc, Spec ^R	2009)
pDSK xopF1	pDSK602-Derivat, kodiert XopF1-c-Myc, Spec ^R	Lorenz, unpubliziert
pBRM hrcVc	pBRM-Derivat, kodiert HrcV ₃₂₄₋₆₄₅ -c-Myc, Gent ^R	Lorenz, unpubliziert
pBRM xopJ	pBRM-Derivat, kodiert XopJ-c-Myc, Gent ^R	(Hartmann und Büttner, 2013)
pGEX hpaA	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HpaA, Amp ^R	(Lorenz und Büttner, 2011)
pGEX hpaB	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HpaB, Amp ^R	Lorenz 2009, Diss., (Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
pGEX hpaC	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HpaC, Amp ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
pGEX hrcVc	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrcV ₃₂₄₋₆₄₅ , Amp ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
pGEX hrcL	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrcL, Amp ^R	(Hartmann und Büttner, 2013)
pGEX hrcU	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrcU, Amp ^R	(Lorenz und Büttner, 2009)
pGEX hrcQ	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrcQ, Amp ^R	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008b)
pGEX hrcN	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrcN, Amp ^R	(Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
pGEX hrpB1	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrpB1, Amp ^R	(Lorenz und Büttner, 2009)
pGEX hrpB2	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-HrpB2, Amp ^R	(Hausner <i>et al.</i> , 2013)
pGEX xopJ	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-XopJ, Amp ^R	(Schulz und Büttner, 2011)
pGEX xopF1	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-XopF1, Amp ^R	(Lorenz <i>et al.</i> , 2012)
pGEX xopA	pGEX-2TKM-Derivat, kodiert GST-XopA, Amp ^R	(Büttner <i>et al.</i> , 2006)
		(Büttner <i>et al.</i> , 2004)

Kan - Kanamycin, Spec - Spectinomycin, Amp - Ampicillin, Gent - Gentamycin,^r - resistent

Tabelle 17: Verwendete Oligonukleotide.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung
pBBR1180_for	ATGCATGCGCCAATACGCAAAA	Sequenzierung des Inserts in pBRM
pBBRendlacZ_rev	CACTCATCGCAGTCGGCC	
pGEX_for	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGG	Sequenzierung des Inserts in pGEX-2TKM
pGEX_rev	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	
SH_hrcS_pB_for	TTTGGTCTCTTATGGACCATGACGATCTAG	Zur Erstellung von <i>hrcS</i> -Derivaten für pBRM
SH_hrcS_pB_rev	TTTGGTCTCTCACCTGGGAACGCCCTGCATC	
SD_hrcSDC30_pB_rev	TTTGGTCTCTCACCCACCAGCTTGAGCGCGAAC	
SH_prom_lacZ_for	TTTGGTCTCTATTGCGAGCTGGCAGACAG	Zur Erstellung von <i>hrcS</i> -Derivaten für pBRM-P
SH_prom_lacZ_rev	TTTGGTCTCTCATAGAATTCTCTGTG	
SD_hrcSohneprom_for	TTTGGTCTCTATTGCGACCATGACGATCTAG	
SD_hrcSSacl_for	TTTGAGCTCATGGACCATGACGATCTAG	Zur Erstellung von <i>hrcS</i> für pGEX-2TKM
SD_hrcSNhel_rev	TTTGCTAGCTCATGGGAACGCCCTGCATC	
SH_hrpB7_pB_for	TTTGGTCTCTTATGCGTGAGCCTGCCTAC	Zur Erstellung von <i>hrpB7</i> -Derivaten für pBRM
SH_hrpB7_pB_rev	TTTGGTCTCTCACCTCGGGCGCCCCATGTG	
SD_hrpB7_CA_pB_for	TTTGGTCTCTGGCCAGACAGGAAGCAGAGGCCGCCACC	
SD_hrpB7_CA_pB_rev	TTTGGTCTCTGGCCCTGGCAAGTTTCGCGGTGCGCGTG	
SD_hrpB7_CA2_pB_for	TTTGGTCTCTGCGTTGGAACACGCCGACCGCGAAC	
SD_hrpB7_CA2_pB_rev	TTTGGTCTCTACGCACGCCTGGCGTCACTCAGGCGTTCC	
SD_hrpB7_CA4/5_pB_for	TTTGGTCTCTGCTTGGCCAACGCCGATGCAGCAC	
SD_hrpB7_CA4/5_pB_rev	TTTGGTCTCTAAGCGCGTGGTGGCGGCCTCTGCTTC	
SD_(P)hrpB7Dactivesite_for	GCACTGGTCGGGCTGCGTTCGCAC	
SD_(P)hrpB7Dactivesite_rev	GCGTTGCGCCTGTCTGGCGCGCGCGCACTG	

SD_(P)hrpB7144-154mut_for	GCAGCGATCGCGGCACTGGTCGGGCTGCGTTC	
SD_(P)hrpB7144-154mut_rev	TGCTGCCGCCCTGCGTTCGCGTTGCGCCTGTCTG	
SD_(P)hrpB7D81-99_for	GATCAGTCATTGCATAGTGCCCGGATGAGCTC	
SD_(P)hrpB7D81-99_rev	TTCGTGCTGCAGGATCGTATCGATATCGATCGAAC	
SH_hrpB7_pB_for	TTTGGTCTCTTATGCGTGAGCCTGCCTAC	Zur Erstellung von
SH_hrpB7_pB_rev	TTTGGTCTCTCACCTCGGGCGCCCCATGTG	<i>hrpB7</i> -Derivaten für
		pBRM-P(Stopp) <i>ptac</i>
		GST
SD_hrpB7_pGGE_for	TTTGGTCTCATATGCGTGAGCCTGCCTACACCTG	Zur Erstellung von
SD_hrpB7_pGGE_mitStopp_rev	TTTGGTCTCTAAGCTTCATCGGGCGCCCCATGTGC	<i>hrpB7</i> für pGGE10
SH_hrcN500_pOGG2_for	TTTGGTCTCTCGACCATCTTCGCTGCAGCAGG	Für die Erstellung der
SH_hrpB7_18_pOGG2_rev	TTTGGTCTCTGTAGGCAGGCTCACGCATCGTC	flankierenden
SH_hrpB7_493_pOGG2_for	TTTGGTCTCTTACCATGGGGCGCCCGATGAACGAC	Fragmente von <i>hrpB7</i>
SH_hrcT_beforeSTOP_pOGG2_rev	TTTGGTCTCTATGGATGTCTCAATAAAGATCAG	und Klonierung in
		pOGG2
CL_hpaABsalfor	TTTGGTCTCTTATGATCCGTCGCATCTCG	
CL_hpaABsalrev	TTTGGTCTCTCACCTGGGCGAACCTCCTGAGC	
SH_hpaA(70/225)rev	TTTGGTCTCTGCACTTCATCCTCCTGGCCGTC	Zur Erstellung von
SH_hpaA(225)for	TTTGGTCTCTGTGCCAGCGCTACGCAATTTTC	<i>hpaA</i> -Derivaten für
SH_hpaA(225)rev	TTTGGTCTCTCACCCACCGGCTCCAACCTC	pBRM
SD_(P)hpaADhydro_for	AATGCGGAAAAACCGCGCAGAC	
SD_(P)hpaADhydro_rev	ATTGCGTAGCGCTGGCACC GGCTC	
CL_hpaABsalfor	TTTGGTCTCTTATGATCCGTCGCATCTCG	
SH_pBR356hpaA_rev	TTTGGTCTCTGATCTGGGCGAACCTCCTGAGC	
SH_pBR356hpaA(71)_rev	TTTGGTCTCTGATCGAATTCATCCTCCTGGC	Zur Erstellung von
SH_pBR356hpaA(225)_rev	TTTGGTCTCTGATCCACCGGCTCCAACCTC	<i>hpaA</i> -Derivaten für
SD_hpaADN70pBRM_for	TTTGGTCTCTTATGGAATTCGACGCCAACGAGC	pBR356
SD_hpaAN70XopA_for	TTTGGTCTCTATGATCAATTCATTGAATACGTCG	
SD_hpaAN70XopA_rev	TTTGGTCTCTTCATTTTCATCCTCCTGGCCGTCCAG	
DB_xopA_GATC_rev	TTTGGTCTCTGATCCTGCATCGATGCAG	

P_{lac}

1 11 21 31 41 51 61 71 81
GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG **TGAGCGCAAC** GCAATTAATG TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCAGG
 91 101 111 121 131 141 151 161
CTTTACACTT **TATGCTTCCG** **GCTCGIATGT** **TGTGTGGAAT** **TGTGAGCGGA** TAACAATTC ACACAGGAGA ATTC

Abb. 47: Nukleotidsequenz des *lacUV5*-Promotors im pBRM-Vektor.

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des Promotors im pBRM-Vektor. In grün hervorgehoben ist die Nukleotidsequenz des *lacUV5*-Promotors. Aufgrund der Sequenzwiederholung von sieben Basenpaaren (rot) im Abstand von 85 Nukleotide wird die dazwischenliegende Sequenz einschließlich des *lacUV5*-Promotors durch das zufällige übereinanderlegen der Wiederholungssequenz deletiert. Die unterstrichene Nukleotidsequenz ist die Sequenz des $P_{\Delta lac}$.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Sabine Drehkopf, geb. Hänsch
Geburtsdatum/-ort 05.09.1987, in Köthen (Anhalt)
Familienstand verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit Deutsch

Ausbildung

08/2000 bis 07/2007 Ludwigsgymnasium Köthen (Anhalt)
Abschluss: Abitur

10/2007 bis 09/2010 Bachelorstudium Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Bachelorarbeit: „*Rekombinante Herstellung und Charakterisierung des viralen Proteins NS3 von HCV*“

10/2010 bis 12/2012 Masterstudium Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Masterarbeit: „*Mechanistische Studien zur Inhibierung der HCV-Helikase NS3*“

01/2013 bis 06/2017 Praktische Arbeiten zur Promotionsarbeit am Institut für Biologie, Bereich Genetik an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von apl. Prof. Dr. Daniela Büttner; Thema: Funktionelle Charakterisierung von strukturellen und regulatorischen Komponenten des Typ 3-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

10/2014 bis 03/2015 Elternzeit

07/2017 bis 05/2018 Elternzeit

Seit 06/2018 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologie, Bereich Genetik an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg in der Gruppe von Prof. Dr. Ulla Bonas unter der Betreuung von apl. Prof. Dr. Daniela Büttner
Thema: Charakterisierung des Typ 2- und Typ 4-Sekretionssystems in *Xcv*.

Halle/Saale, den 16.12.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf diesem Weg der Dissertation begleitet haben.

Mein besonderer Dank geht an apl. Prof. Dr. Daniela Büttner für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ihr reges Interesse an meine Arbeit, ihre konstruktive Kritik und das Immerdasein bei praktischen und theoretischen Problemen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für dein Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Freiheiten, die du mir beim Forschen gelassen hast.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ulla Bonas für Ihre Neugier an mein Thema, Ihre kritischen Fragen zu meinen Ergebnissen sowie die guten Arbeitsbedingungen in unserer Abteilung.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pflanzengenetik für das freundliche, produktive und zugleich spaßige Arbeitsklima. Insbesondere gilt mein Dank den Kollegen aus dem Labor 222 für ihre hilfreichen Ratschläge auch außerhalb der Wissenschaft, ihr Fachwissen sowie abwechslungsreiche Gespräche.

Außerdem sei an dieser Stelle noch Jens für sein fleißiges und konstruktives Korrekturlesen gedankt.

Ein sehr herzliches Dankeschön möchte ich an meine Familie, insbesondere an meine Eltern richten, die mich während meines gesamten Studiums mit Rat, Tat und finanziell beiseite standen. Danke, dass ihr die Kinder von der Kita abgeholt hattet, wenn ich mal wieder eins, zwei Stunden länger im Labor stand.

Zu guter Letzt danke ich meinem wunderbaren Ehemann Thomas. Danke, dass du mich jeden Tag aufs Neue motiviert und, wo es nur ging, den Rücken frei gehalten hast.

Danke!

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Halle (Saale), den 16.12.2020

Sabine Drehkopf