



**MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON HRPE,
DER HRP-PILUS UNTEREINHEIT VON
XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM (DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DER
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FAKULTÄT
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

ERNST WEBER

GEB. AM 03.09.1975 IN SIEGBURG

GUTACHTER:

1. PD DR. RALF KOEBNIK
2. PROF. DR. DIERK SCHEEL
3. PROF. DR. MICHAEL GÖTTFERT

HALLE (SAALE), 23.05.06

urn:nbn:de:gbv:3-000010201

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010201>]

SUMMARY

The plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* possesses a type III secretion (TTS) system that is necessary for both pathogenicity in susceptible hosts and the induction of the hypersensitive response in resistant plants. This specialized protein transport system is encoded by a 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster (26).

This work showed that *X. campestris* pv. *vesicatoria* produces filamentous structures, the Hrp pili, at the cell surface under *hrp*-inducing conditions. Analysis of purified Hrp pili and immunoelectron microscopy revealed that the major component of the Hrp pilus is the HrpE protein which is encoded in the *hrp* gene cluster. Sequence homologues of *hrpE* are only found in other xanthomonads. Analysis of a nonpolar *hrpE* mutant demonstrated that the Hrp pilus is essential for the productive interaction of *X. campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. Furthermore, a functional Hrp pilus is required for type III-dependent protein secretion. Immunoelectron microscopy revealed a close contact of type III-secreted proteins, such as HrpF and AvrBs3, with the Hrp pilus during their secretion. By systematic analysis of nonpolar *hrp*, *hrc* (hrp conserved), and *hpa* (hrp associated) mutants, we found that Hpa proteins as well as the translocon protein HrpF are dispensable for pilus assembly, while all other tested Hrp and Hrc proteins are required (209).

Functional domains of HrpE were mapped by linker-scanning mutagenesis and by reporter protein fusions and suggest a two-domain structure of HrpE with an N-terminal surface-exposed variable region, including the type III secretion signal, and a C-terminal polymerization domain. Comparisons with a mutant study of HrpA, the Hrp pilin from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and hydrophobicity plot analyses of several nonhomologous Hrp pilins suggest a common architecture of Hrp pilins of different plant-pathogenic bacteria (208). Analysis of the evolutionary rate of the *hrpE* gene showed that parts of the HrpE N terminus are subjected to positive selection, whereas the C terminus is subjected to purifying selection. Despite the high sequence diversity at the N terminus an amphipathic α -helix was identified as the probable type III secretion signal of HrpE (210).

ZUSAMMENFASSUNG

Das pflanzenpathogene Bakterium *X. campestris* pv. *vesicatoria* verfügt über ein Typ-III-Sekretionssystem (TTS-System), welches sowohl für die Pathogenität auf suszeptiblen Pflanzen als auch für die Auslösung einer hypersensitiven Reaktion auf resistenten Pflanzen essenziell ist. Dieses Transportsystem wird im 23-kb großen *hrp*-Gencluster („*hypersensitive response and pathogenicity*“) kodiert (26).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *X. campestris* pv. *vesicatoria* unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen an der Zelloberfläche filamentöse Strukturen bildet, die Hrp-Pili. Eine Analyse der gereinigten Strukturen und Immunmarkierungsexperimente ergaben, dass die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus von HrpE gebildet wird. Sequenzhomologe konnten bisher nur in anderen Xanthomonaden identifiziert werden. Die Untersuchung nicht-polarer *hrpE* Mutanten zeigte, dass der Hrp-Pilus sowohl für die Translokation als auch für die Sekretion essenziell ist (209). Immunmarkierungsexperimente belegten, dass Typ-III-abhängig sekretierte Proteine, wie HrpF und AvrBs3, während des Sekretionsprozesses in der Nähe des Hrp-Pilus lokalisiert sind. Eine systematische Analyse nicht-polarer Mutanten in den *hrp*, *hrc* („*hrp conserved*“) und *hpa* („*hrp associated*“) Genen offenbarte, dass bis auf die Hpa-Proteine und dem Translokonprotein HrpF, alle Hrp- und Hrc-Proteine essenziell für die Assemblierung des Hrp-Pilus sind.

Die funktionelle Charakterisierung von HrpE mittels Linkerscanningmutagenese sowie translationale Fusionen mit einem Reporterprotein weisen auf zwei funktionelle Domänen hin - eine variable, oberflächenexponierte Domäne, die auch das Typ-III-Sekretionssignal beinhaltet, und eine hoch konservierte, C-terminale Polymerisierungsdomäne. Der Vergleich mit einer Mutantanalyse von HrpA, dem Hrp-Pilin von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, und die Ähnlichkeit der Hydrophobizitätsprofile weiterer nicht-homologer Hrp-Piline deutet eine gemeinsame Architektur der Hrp-Piline verschiedener pflanzenpathogener Bakterien an (208). Die Analyse der auf HrpE wirkenden evolutionären Einflüsse belegte, dass Teile des N-Terminus dem Einfluss der Diversifikation der Sequenz unterliegen („*positive selection*“), der C-Terminus jedoch unter einem die Sequenz bewahrenden Evolutionsdruck steht („*purifying selection*“). Weiterhin konnte trotz geringen Sequenzähnlichkeit eine amphipathische α -Helix als mögliches Typ-III-Sekretionssignal von HrpE identifiziert werden (210).

INHALTSVERZEICHNIS

Summary	II
Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	7
1.1 Das TTS-System.....	8
1.1.1 Supramolekulare Struktur des TTS-Systems.....	10
1.1.2 Erkennung der Substrate.....	11
1.2 TTS-Systeme pflanzenpathogener Bakterien	15
1.3 Das Modellsystem <i>Xanthomonas</i>	16
1.3.1 Substrate pflanzlicher TTS-Systeme	17
1.3.2 Das TTS-System von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	19
1.3.3 Regulation des TTS-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	20
1.3.4 Funktion der im <i>hrp</i> -Gencluster kodierten Proteine.....	21
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	29
2 Ergebnisse	30
2.1 Übersicht der Publikationen und Manuskripte	30
2.2 Der Typ-III-abhängige Hrp-Pilus ist essenziell für die Interaktion von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> mit der Paprika-Wirtspflanze	32
2.2.1 Artikel: Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005) The type III- dependent Hrp Pilus is required for productive interaction of <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> with pepper host plants. <i>J. Bacteriol.</i> , 187, 2458- 2468.	32
2.2.2 Ergänzende Ergebnisse.....	43
2.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	47
2.3 Analyse der Domänenstruktur der Hrp-Pilus Untereinheit HrpE von <i>X. campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	48
2.3.1 Artikel: Weber, E. and Koebnik, R. (2005) Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , 187, 6175-6186.....	48
2.3.2 Ergänzende Ergebnisse.....	60
2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	63
2.4 Die Hrp-Pilus Untereinheit HrpE von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> unterliegt einer positiven Selektion	64

2.4.1	Artikel: Weber, E. and Koebnik, R. (2006) Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen <i>Xanthomonas</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , 188, 1405-1410.....	64
2.4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
2.5	Verfeinerung der <i>hrpD</i> und <i>hrpE</i> Operonstruktur von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	71
2.5.1	Manuskript: Weber, E., Berger, C., Bonas, U. and Koebnik, R. Refinement of the <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria hrpD</i> and <i>hrpE</i> operon structure.	71
2.5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	92
3	Diskussion	93
3.1	Morphologie des Hrp-Pilus von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	93
3.2	Architektur des von HrpE gebildeten Hrp-Pilus	94
3.3	Einbindung des Hrp-Pilus in den TTS-Apparat	97
3.4	Domänenstruktur von HrpE	98
3.5	Der N-Terminus von HrpE ist eine multifunktionale Domäne	100
3.6	Regulation der Assemblierung von HrpE.....	104
4	Literaturverzeichnis	108
5	Anhang	118
5.1	Anhang A: Verwendete Primer	118
5.2	Anhang B: Abkürzungsverzeichnis.....	119

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Übersicht über die Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien.	9
Abbildung 2:	Morphologischer Vergleich des Flagellenbasalkörpers und des Nadelkomplexes.	10
Abbildung 3:	Übersicht über Typ-III-Sekretionssignale und der möglichen Funktion von TTS-Chaperonen.	13
Abbildung 4:	Bakterielle Fleckenkrankheit.	17
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des <i>hrp</i> -Genclusters von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	20
Abbildung 6:	Regulation des <i>hrp</i> -Genclusters in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	21
Abbildung 7:	Modell des TTS-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	28
Abbildung 8:	Analyse der Expression von HrpE.	44
Abbildung 9:	Der Einfluss von <i>hrpE</i> auf die Aktivität der <i>hrp</i> -Promotoren.	46
Abbildung 10:	Expression der dominant-negativen HrpE-Insertionsmutanten.	61
Abbildung 11:	Charakterisierung der Epitop-markierten HrpE-Varianten.	62
Abbildung 12:	Modell der Domänenstruktur von HrpE und vermutliche Anbindung an die an die Sekretinpore.	104
Abbildung 13:	Modell der Sekretion in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	107
Tabelle 1:	Bekannte Effektoren von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -Stamm 85-10.	19
Tabelle 2:	Konservierte Komponenten des TTS-Systems von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	25
Tabelle 3:	Hauptuntereinheiten der mit TTS-Systemen assoziierten Oberflächenstrukturen.	96
Tabelle 4:	In den Publikationen verwendete und nicht beschriebene Oligonukleotide.	118

1 EINLEITUNG

Übertragbare Krankheiten werden von den Menschen seit alters her als besondere Bedrohung empfunden. Eine große Anzahl antiker und mittelalterlicher Aufzeichnungen und Abbildungen bezeugen das Grauen aber auch die Hilflosigkeit, die diese sich unsichtbar ausbreitenden Krankheiten auf die damaligen Chronisten und Zeitgenossen ausübten. Als ein mikrobiologisches Problem wurden die übertragbaren Erkrankungen erst am Ende des neunzehnten Jahrhunderts durch die Arbeiten von Robert Koch, Louis Pasteur und anderer Mikrobiologen wahrgenommen. Einen besonders tiefen Eindruck hinterließ die Pest, ausgelöst von dem Gram-negativen Bakterium *Yersinia pestis*, die in mehreren Pandemien den vorderen Orient, den Mittelmeerraum und Nordeuropa entvölkerte. Der Pestepidemie von 1391 fielen 30-40 % der Bevölkerung Nord- und Mitteleuropas zum Opfer. Weitere den Menschen bedrohende Gram-negative bakterielle Pathogene wie *Salmonella* spp., *Shigella* spp. und pathogene *Escherichia coli* spp. lösen Nahrungsmittelvergiftung, Typhus, Dysenterie oder Diarrhö aus. Die Divergenz der ausgelösten Krankheitssymptome deutete auf jeweils einzigartige molekulare Mechanismen als Auslöser für diese Krankheiten hin. Es wurde jedoch auch ein gemeinsamer Faktor identifiziert, der essenziell für die jeweilige Pathogenität war - das Typ-III-Sekretionssystem (TTS-System). Dieses Transportsystem erlaubt es extrazellulär lokalisierten Bakterien, bakterielle Effektorproteine in das Zytoplasma der Zielzelle zu transportieren (170, 183). Diese Effektorproteine interferieren mit einer Vielzahl von zellulären Prozessen der Zielzellen und induzieren unter anderem morphologische Änderungen des Zytoskeletts oder modulieren die Wirtsabwehr (101). Neben tierpathogenen Mikroorganismen verfügen auch phytopathogene Bakterien über ein TTS-System. Gram-negative Bakterien der Gattungen *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* lösen auf vielen Nutzpflanzen Krankheiten aus und verringern zum Teil die Ernteerträge drastisch (228). Neben ihrer Bedeutung für die Pathogenität beeinflussen TTS-Systeme auch die Etablierung symbiotischer Beziehungen zwischen Eukaryonten und Prokaryonten, wie im Falle der landwirtschaftlich und ökologisch wichtigen Pflanzensymbionten der Gattung *Rhizobium* (130) und des Endosymbionten *Sodalis glossinidius* der Tsetsefliege (48). Das molekulare Verständnis des Transportvorgangs durch das TTS-System, das einen generellen Mechanismus des Proteintransfers zwischen den Reichen der Prokaryonten und der Eukaryonten darstellt, ist damit von besonderem Interesse.

1.1 Das TTS-System

Extrazelluläre Proteine stellen einen zentralen Faktor bakterieller Infektionsstrategien dar und weisen mannigfaltige Aktivitäten auf. Man findet u. a. Proteine, die eine zytotoxische, proteolytische, hydrolytische oder hämolytische Funktion besitzen. Allerdings wird der Transport all dieser Proteine durch eine begrenzte Anzahl von Sekretionssystemen übernommen. Es wird hierbei zwischen Export, Sekretion und Translokation unterschieden, wobei Export den Transport vom Zytoplasma ins Periplasma, Sekretion den Transport vom Zytoplasma über innere und äußere Membran in das Außenmedium und Translokation den Transport von Proteinen aus dem Zytoplasma der Bakterienzelle in das Zytosol der eukaryontischen Zielzelle beschreibt.

In Gram-negativen Bakterien wurden bisher sechs verschiedene Sekretionsmechanismen charakterisiert (113) (Abb. 1). Das Typ-I-Sekretionssystem, das Typ-II-Sekretionssystem, das „chaperon/usher“-System und die Autotransporter sekretieren ihre jeweiligen Substrate in das extrazelluläre Milieu der Bakterien. Der Transport der Substrate über die innere Membran ist hier in der Regel abhängig vom Sec-System (206). Das TTS- und das Typ-IV-System ermöglichen neben der Sekretion auch die Translokation von Effektorproteinen in das Zytosol der Zielzellen (33, 81). Die Substrate des TTS-Systems werden ohne nachweisbare periplasmatische Intermediate sekretiert bzw. transloziert. Das im N-Terminus lokalisierte Typ-III-Sekretionssignal ist auf Primärstrukturebene nicht konserviert und wird im Gegensatz zum ebenfalls N-terminal lokalisierten Signal Sec-System-abhängiger Substrate nicht proteolytisch prozessiert (89). Das TTS-System ermöglicht den Ferntransport in die Zielzelle über beide bakterielle Membranen, die physikalischen Barrieren eukaryontischer Zellen, wie die pflanzliche Zellwand oder die Mucosa von Darmepithelzellen, und die eukaryontische Plasmamembran. Der beide bakterielle Membranen durchspannende TTS-Apparat ist aus zirka 20 Komponenten aufgebaut. Die Komponente, die eine Pore in der äußeren Membran bildet, ist wie beim Typ-II-Sekretionssystem ein Mitglied der Sekretinfamilie (64). Eine große Anzahl von Komponenten weist auch Sequenzhomologien zu Komponenten des Flagellen-Systems auf. Im Flagellen-System sind diese Komponenten essenziell für die Sekretion und die Assemblierung der Komponenten des „hook“ und des Filaments (Abb. 2) (4, 23).

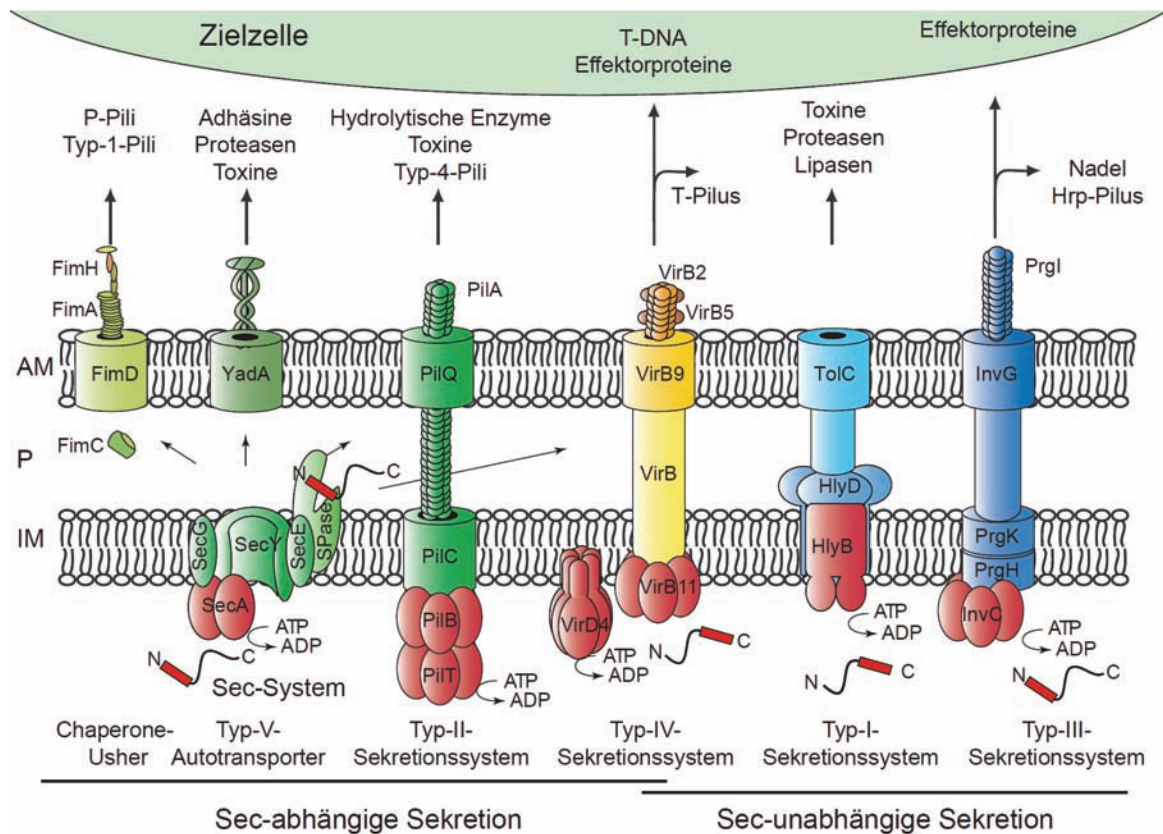


Abbildung 1: Übersicht über die Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien.

Dargestellt ist der schematische Aufbau der sechs Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien und ihrer Substrate, wobei ein Hauptaugenmerk auf die gebildeten Oberflächenstrukturen gelegt wurde. Die ATPasen der Systeme und die Lokalisierung der Transportsignale sind in Rot hervorgehoben. Vier von sechs Transportsystemen nutzen zum Export ihrer jeweiligen Substrate ins Periplasma das Sec-System, dessen Kern vom Heterotrimer SecYEG gebildet wird. Das N-terminal lokalisierte Signal wird von der Signalpeptidase (SPase) prozessiert. Zu den vier Sec-abhängigen Systemen zählen die Autotransporter, das „chaperon/usher“-System, das Typ-II-Sekretionssystem und das Typ-IV-Sekretionssystem. Das Adhäsine YadA von *Yersinia enterocolitica* stellt einen Autotransporter dar, welcher als Trimer vorliegt und mittels C-terminal lokalisierter β -Faltblätter in der äußeren Membran verankert ist. Der Transport über die äußere Membran erfolgt ohne weitere Transportsystemkomponenten (166). „Chaperon/usher“-Systeme, exemplarisch für den Typ-1-Pilus uropathogener *Escherichia coli* gezeigt, sind durch ein periplasmatisches Chaperon (FimC) und einen „Usher“ (FimD) in der äußeren Membran charakterisiert. Die Hauptstrukturkomponente des Typ-1-Pilus stellt FimA dar, wobei die adhäsive Spitze von FimH gebildet wird (149). Neben der Sekretion von degradierenden Enzymen und Toxinen bildet das Typ-II-Sekretionssystem auch Typ-4-Pili, die in die Adhäsion und „Twitching motility“ involviert sind. In *Pseudomonas aeruginosa* durchspannt der aus PilA Monomeren bestehende Typ-4-Pilus die äußere Membran mittels des zur Sekretinfamilie zählenden PilQ (64). Die Typ-IV-Sekretion kann sowohl Sec-abhängig (Pertussistoxin, *Bordetella pertussis*), als auch Sec-unabhängig (T-DNA und Effektortranslokation in *Agrobacterium tumefaciens*) erfolgen (33). Der *A. tumefaciens* Typ-IV-Apparat ist mit einem T-Pilus assoziiert, der von VirB2 und VirB5 gebildet wird (41). Der Transportvorgang bei Typ-III- und Typ-I-Sekretionssystemen ist unabhängig vom Sec-System. Typ-I-Sekretionssysteme bestehen aus nur drei Komponenten und stellen somit die einfachsten Transportsysteme dar. Sie transportieren Toxine, Lipasen und Proteasen ohne periplasmatische Intermediate. Gezeigt ist das α -Hämolyysin-Transportsystem aus *E. coli*. Es besteht aus einer ATPase (HlyB), einem Außenmembran-Protein (TolC) sowie einem den periplasmatischen Raum durchspannenden, in der inneren Membran verankerten sogenannten Membranfusionsprotein (HlyD) (72). Das TTS-System ist schematisch für *Salmonella typhimurium* dargestellt. Bei pflanzenpathogenen Bakterien ist das TTS-System nicht mit einer Nadel sondern mit einem Hrp-Pilus assoziiert (81).

1.1.1 Supramolekulare Struktur des TTS-Systems

Die supramolekulare Struktur des TTS-Systems wurde bei tierpathogenen Bakterien wie *Salmonella*, *Shigella* und enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) aufgeklärt (21, 49, 116). Die gereinigten und mittels Elektronenmikroskopie visualisierten Komplexe durchspannen beide bakteriellen Membranen und assemblieren einen „Nadelkomplex“ (Abb. 2B). Diese Nadelkomplexe weisen eine erstaunliche morphologische Ähnlichkeit zu den „hook basal bodies“ des Flagellensystems auf (23) (Abb. 2A/C). Die extrazelluläre Komponente des Nadelkomplexes besteht aus einer nadelartigen Struktur, wohingegen der „hook basal body“ mit einem „hook“ und einem Filament assoziiert ist. Neben der Homologie zahlreicher Komponenten deutet auch die morphologische Ähnlichkeit der Systeme auf eine funktionale Analogie hin. Die zylindrische Basis des Nadelkomplexes weist vier konzentrische Ringe auf, die der Verankerung des Apparates in den bakteriellen Membranen dienen. Im Zentrum befindet sich ein 2-3 nm durchmessender Kanal, der auch für das Flagellum beschrieben wurde (22, 142). Der Durchmesser des Kanals erlaubt den Transport der Substrate allerdings nur in entfaltetem oder teilgefaltetem Zustand. In Präparationen des *Shigella flexneri*-Nadelkomplexes kann zudem eine im Zytoplasma lokalisierte „Blase“ beobachtet werden, die möglicherweise analog zum flagellaren Zytoplasmakomplex ist (21).

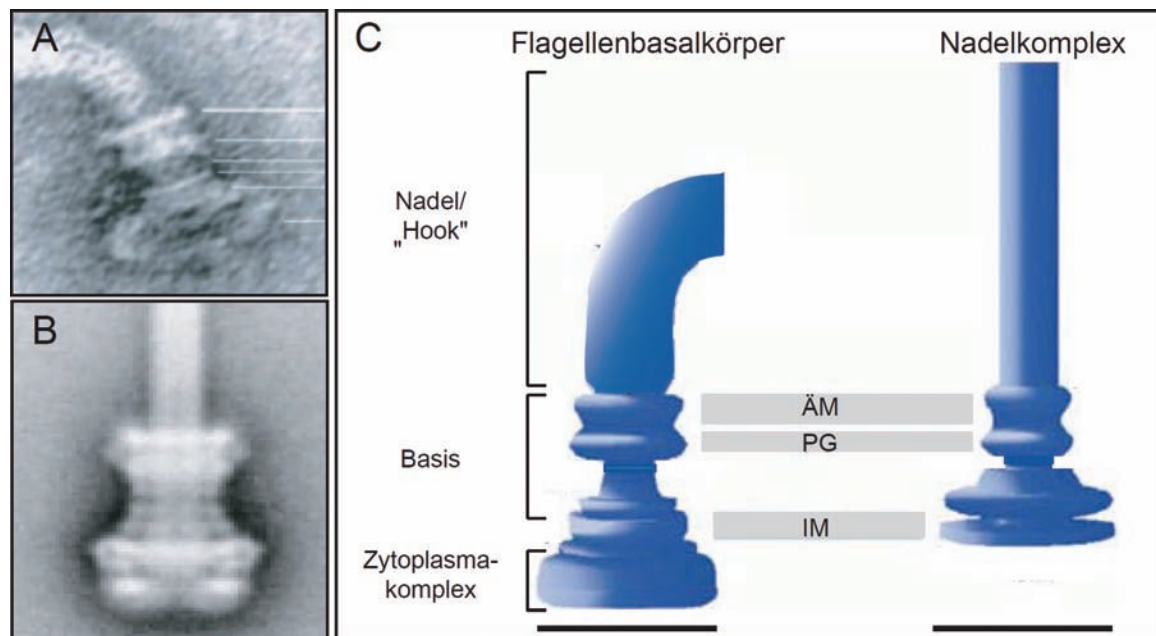


Abbildung 2: Morphologischer Vergleich des Flagellenbasalkörpers und des Nadelkomplexes.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Flagellenbasalkörpers von *S. typhimurium* (128). (B) Abbildung basierend auf der Durchschnittsberechnung von 437 elektronenmikroskopischen Einzelaufnahmen des *S. flexneri*-Nadelkomplexes (22). (C) Zeichnung des Flagellenbasalkörpers und des Nadelkomplexes von *S. typhimurium* modifiziert nach Minamino *et al.* 2005 (140). ÄM, äußere Membran; PG, Peptidoglycan; IM, innere Membran. Der Balken entspricht 40 nm.

1.1.1.1 Mit TTS-Systemen assoziierte Oberflächenstrukturen

Die mit dem TTS-Systemen assoziierten Nadeln sind aus vielen Kopien eines Proteins aufgebaut. Diese Untereinheiten sind selbst Substrate des TTS-Systems und assemblieren zu einer helikalen Struktur mit einem zentralen, 2,5 nm durchmessenden Kanal (44). Der Außendurchmesser der Nadeln beträgt 8-10 nm. Die Nadelstrukturen besitzen eine definierte Länge, 58 nm bei *Y. enterocolitica* (100), 80 nm bei *Salmonella typhimurium* (116) und 45 nm bei *Shigella* (194). Die strikte Längenkontrolle wird in *Yersinia* spp. durch YscP erreicht, das die Eigenschaft eines „molekularen Lineals“ besitzt (100). Im Gegensatz zu der nahezu identischen Gesamtarchitektur der Nadeln zeigen die Nadeluntereinheiten der unterschiedlichen Pathogene nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten (117).

Das EspA-Filament ist eine weitere TTS-abhängige Oberflächenstruktur, die von EPEC Stämmen gebildet wird (52, 110). EspA interagiert mit EscF, der Nadeluntereinheit in EPEC, und bildet eine Verlängerung der Nadel (49, 181). Das EspA-Filament besitzt einen Durchmesser von 12 nm und eine Länge von bis zu 600 nm. Es ist unabdingbar für die Translokation, allerdings nicht für die Sekretion von Effektoren.

1.1.1.2 Translokon-Komponenten

Die beschriebenen Oberflächenstrukturen stellen vermutlich die Verbindung zwischen der Basis des TTS-Systems und dem Typ-III-Translokon her. TTS-Translokons sind essenziell für den Transport von Effektoren durch die eukaryontische Plasmamembran. Die Komponenten des Translokons sind bakteriellen Ursprungs und werden ebenfalls TTS-abhängig sekretiert (34). In pathogenen *E. coli* konnte das TTS-Translokon durch „atomic force microscopy“ visualisiert werden. Die Proteine EspB und EspD bilden eine membranständige Pore, die einen Außendurchmesser von 50 nm und eine zentrale Öffnung von zirka 8 nm aufweist (94). Die Verbindung zwischen den Oberflächenstrukturen und dem Translokon erfolgt vermutlich nicht direkt, sondern über einen Komplex an der Spitze der Nadel wie in *Yersinia* beschrieben (146).

1.1.2 Erkennung der Substrate

In den bisher in biologischen Systemen beschriebenen Fällen des Proteintransports über biologische Membranen ist die Information für den Transport allein in der Polypeptidkette vorhanden (20). Diese Information kann in Form eines hydrophoben N-terminalen Signals, einer Reihe basischer Aminosäuren, einer spezifischen Aminosäuresequenz oder der

Tertiärstruktur kodiert sein (20, 104, 112, 158). Im Gegensatz dazu ist die Natur des Typ-III-Sekretionssignals auch nach nunmehr 15 Jahren intensiver Forschung nicht vollständig geklärt. Das Typ-III-Sekretionssignal eines Effektors kann von TTS-Systemen verschiedener bakterieller Spezies und dem Flagellensystem erkannt werden, was auf einen generellen Mechanismus der Substraterkennung und Sekretion hindeutet (120, 171, 187, 226, 227). Zurzeit werden zwei mögliche Szenarien der Sekretion bzw. Translokation diskutiert: (i) ein Signal auf mRNA-Ebene, das einen kotranslationalen Transport bedingen würde, oder (ii) eines auf Aminosäureebene (Abb. 3). Wie das Sec-Signal ist auch das Typ-III-Sekretionssignal am N-Terminus der Substrate lokalisiert. Translationale Fusionen der Effektoren YopE und YopH aus *Yersinia* an Reporterproteine zeigten, dass die ersten ca. 15 Codonen für die Sekretion ausreichend sind (184). Dieses Ergebnis wurde auch für die Effektoren AvrB und AvrPto von *P. syringae* sowie den Effektor AvrBs2 aus *X. campestris* bestätigt (10, 144).

1.1.2.1 Das mRNA-Signal

Die Kontroverse um die Natur des Typ-III-Sekretionssignals wird liegt in seiner großen Variabilität begründet. Das Fehlen konservierter Sequenzabschnitte oder Aminosäuren in den N-Termini Typ-III-abhängig sekretierter Substrate sowie der fehlende Einfluss gezielter, sequentieller Aminosäureaustausche im Sekretionssignal verschiedener *Yersinia*-Effektoren auf die Sekretionseffizienz führten zur Annahme, dass die mRNA als Typ-III-Sekretionssignal dient. Dies würde in Anlehnung an den Export von Substraten in das endoplasmatische Retikulum einen kotranslationalen Transport bedingen (8). Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Leserastermutationen in den ersten zirka 15 Codonen der Effektoren YopE, YopN, YopQ, AvrB, AvrPto und AvrBs2, die die Aminosäuresequenz des Typ-III-Sekretionssignals nachhältig, die Struktur der mRNA jedoch nur geringfügig beeinflussen, zu funktionalen Sekretionssignalen führen (8-10, 144). Die Leserastermutationen wurden durch das Einfügen oder die Deletion einer Base hinter dem Start-Codon generiert, wobei der Leserahmen am translationalen Fusionspunkt mit dem Reporterprotein wieder korrigiert wurde. Neueste Studien der Effektoren YopE und YopQ aus *Yersinia* zeigen allerdings, dass die Toleranz gegenüber diesen Leserastermutationen begrenzt ist. Die minimalen Sekretionssignale konnten mit sieben (YopE) oder zehn Codonen (YopQ) bestimmt werden, bei denen allerdings Leserastermutationen zum Funktionsverlust führen (163). Dieser Funktionsverlust kann durch die Fusion der 3'-gelegenen Codonen aufgehoben werden, wobei die Funktion dieser Suppressorregion

wiederum unabhängig von Leserastermutationen ist. Das Funktionsprinzip dieses als zweigeteilt postulierten Sekretionssignals ist allerdings noch ungeklärt. Die N-terminalen sieben bis zehn Aminosäuren befinden sich während der Translation noch im „Exit“-Kanal des Ribosoms. Somit ist fraglich, wie ein Ribosom mit der arretierten mRNA eines Effektors erkannt werden kann.

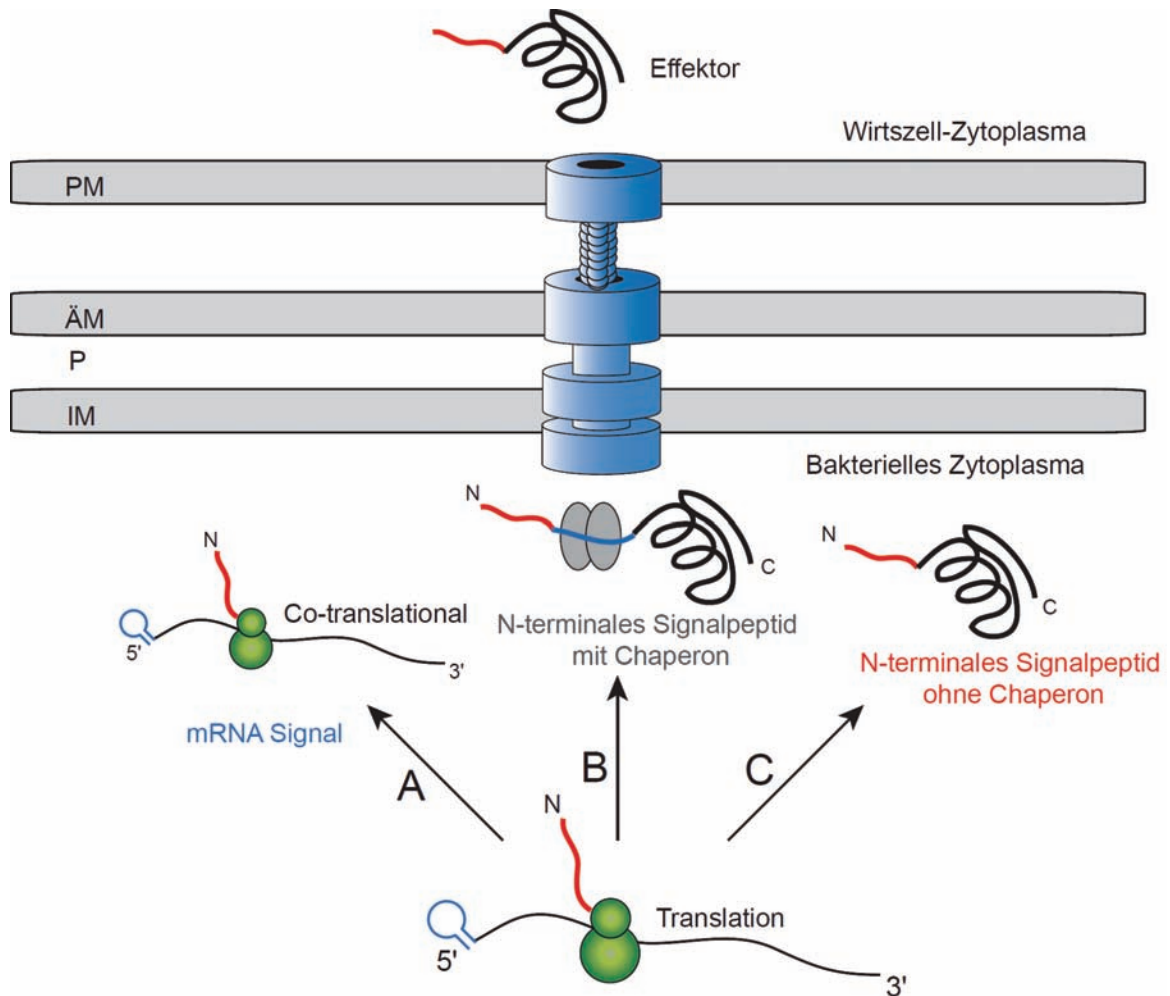


Abbildung 3: Übersicht über Typ-III-Sekretionssignale und der möglichen Funktion von TTS-Chaperonen.

Drei verschiedene Typ-III-Sekretionssignale wurden bisher beschrieben. (A) Die Erkennung des mRNA-Signals basiert möglicherweise auf der Bildung einer „stem loop“ Struktur, hier in blau gezeigt, wobei der Transport dann wahrscheinlich kotranslational erfolgt. (B) Chaperon-Dimere (graue Ellipsen) binden spezifisch an Chaperonbindedomänen von Effektoren (blaue Linie) und beeinflussen deren Stabilität, verhindern ihre Aggregation oder könnten als dreidimensionales Sekretionssignal dienen. (C) Die Sekretion ist allerdings auch in Abwesenheit des Chaperons durch ein N-terminales Signalpeptid (rote Linie) möglich. PM, Plasmamembran; ÄM, äußere Membran; P, Periplasma; IM, innere Membran.

1.1.2.2 Das Signal auf Aminosäureebene

Die Idee eines proteinogenen Typ-III-Sekretionssignals wird durch Experimente unterstützt, bei denen die Funktion des Sekretionssignals trotz einer dramatischen Veränderung der mRNA-Sequenz nicht beeinträchtigt wurde. Mutationen, die die Aminosäuresequenz des YopE-Sekretionssignals unverändert ließen, aber 17 von 27 Codonen veränderten, hatten keinen Einfluss auf Sekretionskompetenz des Signals (126). Dieses Ergebnis und der in vielen Fällen fehlende Einfluss von Leserastermutationen auf die Sekretion sprachen für ein stark degeneriertes Signal, das auf der Aminosäuresequenz basiert. Diese These wurde unterstützt durch die Funktionalität eines künstlichen Signals bestehend aus einer alternierenden Folge von Serinen und Isoleucinen (127). Die Analyse von Signalen bestehend aus Permutationen der Aminosäuren Serin und Isoleucin zeigte, dass der amphipathische Charakter des Signals essenziell ist (127). Vergleichende Analysen der Aminosäurekomposition funktionaler Typ-III-Sekretionssignale zeigten eine Präferenz für bestimmte Aminosäuren bzw. physikochemische Eigenschaften, die zwischen Tier- und Pflanzenpathogenen konserviert ist (76, 159). Die Frage, ob trotz des degenerierten Charakters des Typ-III-Sekretionssignals ein konserviertes Strukturmotiv als Signal dient kann durch die geringe Anzahl gelöster Strukturen von TTS-Substraten, die auch den N-Terminus beinhalten, nicht abschließend beantwortet werden. Der N-Terminus des Effektors YopM aus *Yersinia* ist unstrukturiert (58), der von YopH bildet eine amphipathische α -Helix (59), wohingegen die Periodizität von künstlichen funktionalen Sekretionssignalen eher auf einen amphipathischen β -Strang hinweisen (73).

1.1.2.3 Typ-III-Chaperone

Zusätzlich zum N-terminalen Sekretionssignal (mRNA oder Protein) benötigen einige Effektoren zur effizienten Sekretion oder zur Stabilisierung die Hilfe von TTS-Chaperonen (81). TTS-Chaperone sind durch ein geringes Molekulargewicht von zirka 15 kDa und einen niedrigen pI gekennzeichnet. Die Chaperone binden in der N-terminalen Hälfte ihres jeweiligen Substrats (81). Aufgrund ihrer Substratspezifitäten wurden die TTS-Chaperone in Klassen eingeteilt. Klasse IA-Chaperone besitzen nur einen Interaktionspartner, wohingegen Klasse IB-Chaperone mit mehreren Partnern interagieren, die keinerlei Sequenzhomologie aufweisen. Klasse II-Chaperone sind spezifisch für Translokonkomponenten (157). TTS-Chaperone erfüllen ihren positiven Einfluss auf die Sekretion durch verschiedene Mechanismen. Zum einen stabilisieren sie die Substrate und verhindern deren Aggregation, oder aber sie halten sie in einem teilentfalteten Zu-

stand, der möglicherweise die Sekretion erleichtert (69, 185). Des Weiteren könnten die gebundenen Klasse IA-Chaperone ein dreidimensionales Sekretionssignal darstellen, da sie, trotz einer geringen Sequenzidentität, im Komplex mit ihren Substraten nahezu identische 3D-Strukturen aufweisen (18, 73). Einen Beleg für diese Hypothese liefert auch die Interaktion von TTS-Chaperonen mit konservierten Komponenten des TTS-Systems (37, 71, 196, 197).

TTS-Chaperone wurden bisher hauptsächlich in Tierpathogenen identifiziert. Bei den Pflanzenpathogenen *E. amylovora* und *P. syringae* wurden bisher nur Klasse IA-Chaperone beschrieben, wohingegen in *Xanthomonas* spp. und *R. solanacearum* Hinweise auf Klasse IA-Chaperone fehlen (37, 81, 195).

1.2 TTS-Systeme pflanzenpathogener Bakterien

TTS-Systeme werden in nahezu allen Gram-negativen pflanzenpathogenen Bakterien kodiert, wobei *Agrobacterium* spp. und *Xylella* spp. eine Ausnahme bilden (204). In den Gattungen *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* wird das TTS-System durch *hrp*-Gene kodiert, („hypersensitive response and pathogenicity“), die essenziell für die bakterielle Pathogenität sind. Mutanten in den *hrp*-Genen sind nicht zur Vermehrung und Auslösung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen Pflanzen befähigt und induzieren keine HR („hypersensitive response“) in resistenten Pflanzen (124). Die *hrp*-Gene sind in 20-30 kb großen Genclustern organisiert, die entweder chromosomal oder, wie bei *Ralstonia*, megaplasmidkodiert sind. Die Abweichung der *hrp*-Gencluster im G+C Gehalt vom Durchschnitt des Genoms und die Assoziation mit mobilen Elementen, deuten darauf hin, dass die *hrp*-Gencluster Teile von Pathogenitätsinseln darstellen und durch horizontalen Gentransfer erworben wurden (51, 77). Phylogenetische Analysen zeigen, dass mit dem Flagellum-assoziierte TTS-Systeme nicht der Vorläufer der Virulenz-assoziierten TTS-Systeme sind (75). Vielmehr werden chlamydiale TTS-Systeme als Vorfahren diskutiert, da sie einen ähnlichen phylogenetischen Abstand zu Flagellum- und Virulenz-assoziierten TTS-Systemen zeigen und die Bildung eines zusammenhängenden Genclusters noch nicht abgeschlossen ist (155). Anhand der Sequenzhomologien, der Operonstruktur und der Regulationsprinzipien zählen die *hrp*-Gencluster von *Erwinia* und *Pseudomonas* zur Hrp1-Klasse, wohingegen *Ralstonia* und *Xanthomonas* spp. einen Hrp2 *hrp*-Gencluster kodieren (66, 81). Diese Einteilung ist unabhängig von der phylogenetischen Distanz der Organismen.

1.3 Das Modellsystem *Xanthomonas*

Bakterien der Gattung *Xanthomonas* infizieren mehr als 120 monokotyledone und 260 dikotyledone Pflanzenarten, zu denen wichtige Kulturpflanzen wie Reis, Wein, Tabak, Soja, Tomate und Paprika zählen (38). Die ausgelösten Krankheiten gehen mit chlorotischen und nekrotischen Läsionen, Welke und Fäule einher und führen zu erheblichen Ernteeinbußen. Beispielsweise verursachte die von *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* auf Reis ausgelöste bakterielle Fäule in Indien zwischen 1975 und 1988 Ernteverluste von bis zu 60 % (14).

Eines der phytopathogenen Modellsysteme zum Studium der molekularen Interaktionen zwischen bakteriellen Pathogenen und ihren Wirtspflanzen ist *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, das auch als *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* oder *Xanthomonas euvesicatoria* bezeichnet wird (99, 205). *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Tomate (*Lycopersicon* spp.) und Paprika (*Capsicum* spp.), durch die in den feuchtwarmen Anbaugebieten erhebliche Ernteaufschläge verursacht werden (3) (Abb. 4A/C). Die Bakterien gelangen mittels Wassertropfen durch Oberflächenöffnungen wie Hydathoden und Stomata, oder über Verwundungen in das pflanzliche Gewebe. *Xanthomonas* transportiert Effektorproteine direkt in die pflanzliche Zielzelle, die hier mit Wirtszellprozessen interferieren und so die Vermehrung im Interzellularraum und die Ausbildung von wässrigen Läsionen ermöglichen (Abb. 4B/D). Einige Effektorproteine (Avirulenzproteine, Avr-Proteine) werden in resistenten Pflanzen durch korrespondierende Resistenzgenprodukte (R-Proteine) erkannt (Gen-für-Gen-Hypothese) und lösen spezifische Abwehrreaktionen aus (65). Diese Abwehr beinhaltet häufig das lokale Absterben der pflanzlichen Zellen an der Infektionsstelle und verhindert so die weitere Vermehrung des Pathogens in der Pflanze. Diese sogenannte „hypersensitive Reaktion“ (HR) manifestiert sich als makroskopischer Laborphänotyp als lokale Nekrose des pflanzlichen Gewebes (Abb. 4D). Für beide Ergebnisse in der Wirt-Pathogen Interaktion ist ein funktionales TTS-System unabdingbar (26).

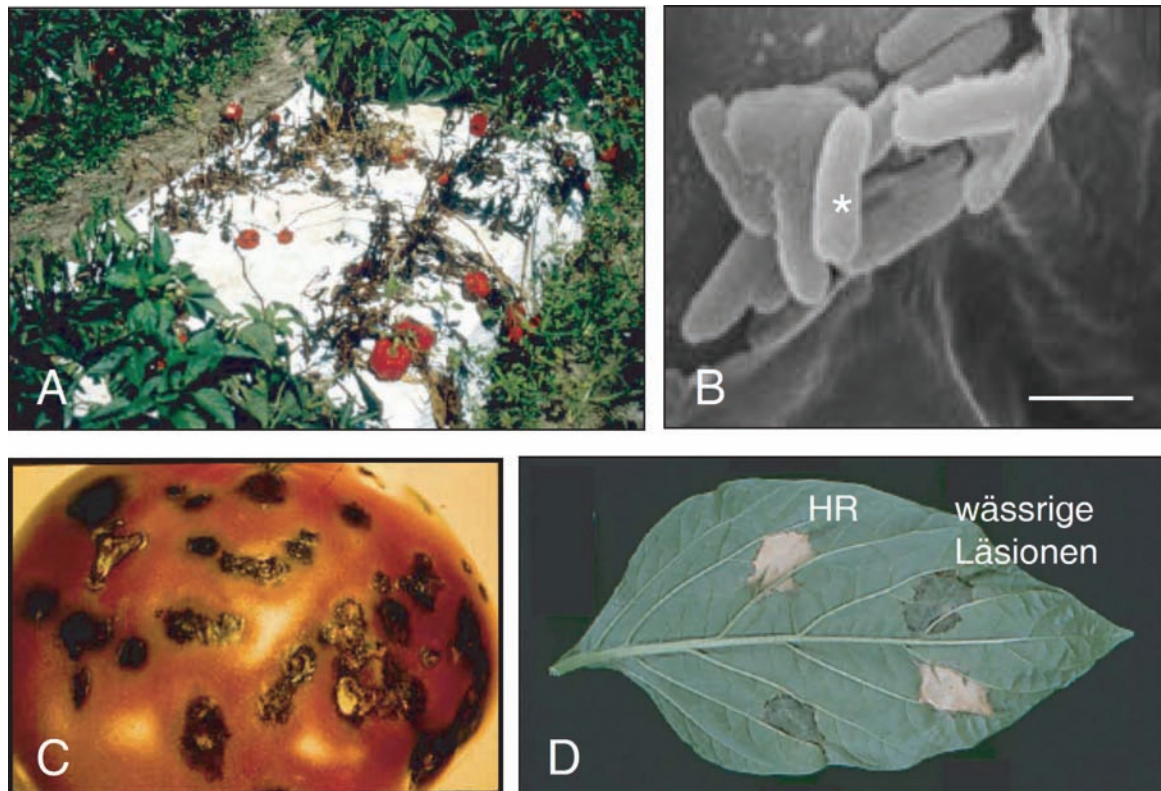


Abbildung 4: Bakterielle Fleckenkrankheit.

(A) Ein mit *X. campestris* pv. *vesicatoria* infiziertes Paprikafeld. Im Gegensatz zu den suszeptiblen Paprikapflanzen in der Bildmitte, zeigen die resistenten Pflanzen im Bildvordergrund keine Krankheitssymptome. (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *X. campestris* pv. *vesicatoria* im pflanzlichen Interzellularraum. Der Balken entspricht einem μm , ein Bakterium ist mit einem Stern markiert. (C) Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf einer Tomate. (D) Laborphänotypen, die durch Injektion einer bakteriellen Suspension hoher Zellzahl in den Interzellularraum hervorgerufen wurden. Die wässrigen Läsionen wurden durch einen virulenten, die HR durch einen avirulenten Stamm ausgelöst.

1.3.1 Substrate pflanzlicher TTS-Systeme

1.3.1.1 Harpine

"Harpine" stellen die zuerst identifizierte Klasse TTS-abhängig sekretierter Proteine dar (212). Sie zeichnen sich durch einen hohen Glycinanteil sowie das Fehlen von Cysteinen aus und induzieren in Nicht-Wirtspflanzen eine unspezifische HR (6, 70). Harpin-Proteine werden unter anderem von *Erwinia* spp. (HrpN und HrpW) (106, 212), *P. syringae* (HrpZ und HrpW) (40, 79), *R. solanacearum* (PopA) (12) und *X. campestris* pv. *glycines* (HpaG) kodiert (107).

X. campestris pv. *vesicatoria* verfügt über das HpaG-Homolog XopA (151). Im Gegensatz zu HpaG ist XopA kein unspezifischer Auslöser der HR, da das für diese Funktion notwendige Sequenzmotiv variiert ist (107). Die Harpine sind wahrscheinlich an der pflanzlichen Zelloberfläche lokalisiert, was für HrpZ und HrpW bereits gezeigt werden

konnte. Im Falle von HrpW könnte die Bindung an die Zellwand über eine N-terminale Pektatlyase-ähnliche Domäne erfolgen, für die eine Bindung von Kalziumpektat nachgewiesen wurde. (40, 87). Die biologische Funktion der Harpin-Proteine ist allerdings noch weitgehend unklar. HrpZ bildet *in vitro* Poren in Lipiddoppelmembranen, die der Freisetzung von Nährstoffen aus oder dem Transport von Virulenzfaktoren in die Wirtszelle dienen könnten (119). Einen Einfluss auf die Pathogenität konnte bisher allerdings nur für HrpN aus *E. amylovora* bzw. *E. chrysanthemi* und XopA gezeigt werden (15, 151, 212).

1.3.1.2 Effektoren

Im Gegensatz zu den vom TTS-System sekretierten Harpinen werden in die Pflanzenzelle translozierte Proteine als Effektoren bezeichnet. Die direkte Translokation von Effektoren in die Pflanzenzelle ermöglicht es dem extrazellulären Pathogen, die Physiologie suszeptibler Pflanzen zu beeinflussen (145). Wichtige Funktionen der Effektoren betreffen die Unterdrückung der Nichtwirts-Resistenz, der Gen-für-Gen-Resistenz und der basalen Pflanzenabwehr (153). Des Weiteren beeinflussen Effektoren die Ausbildung von Krankheitssymptomen und die Freisetzung von Bakterien an die Pflanzenoberfläche (39).

Im *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10 wurden bisher 15 Effektoren identifiziert (Tab. 1) (195). Eine Funktion *in planta* wurde bisher nur für XopD nachgewiesen, das eine Cysteinprotease mit einer Spezifität für das pflanzliche SUMO-Protein (SUMO, „small ubiquitin like modifier“) darstellt (86). Bemerkenswerterweise kodiert 85-10 kein Homolog der AvrBs3-Effektorfamilie, die typisch für *Xanthomonas* ist (195). Dies eröffnet die Möglichkeit, AvrBs3 als sensitiven Reporter zu nutzen (152).

AvrBs3 ist das in *X. campestris* pv. *vesicatoria* am besten charakterisierte Effektorprotein (25). In Paprikapflanzen, die das korrespondierende *Bs3* Resistenzgen enthalten, löst AvrBs3 eine HR aus, wohingegen es in suszeptiblen Pflanzen eine Hypertrophie, eine Vergrößerung der Parenchymzellen, verursacht (133). AvrBs3 besitzt eine außergewöhnliche Struktur. Der zentrale Abschnitt der Polypeptidkette besteht aus 17,5 Wiederholungen eines 34 Aminosäuren umfassenden, nahezu identischen Sequenzmotivs, die sowohl die Virulenz- als auch die Avirulenzaktivität beeinflussen (27, 133). Der C-Terminus von AvrBs3 verfügt mit einer sauren Aktivierungsdomäne und Kernlokalisierungssequenzen über Motive, die typisch für eukaryontische Transkriptionsfaktoren sind (191, 202). Beide Motive sind für die Auslösung einer HR und die Ausbildung der Hypertrophie essenziell. AvrBs3 wurde mittels immunzytologischer Methoden im pflanzlichen Zellkern nachgewiesen und vermittelt eine Transkriptionsaktivierung pflanzlicher Gene (133, 192).

Tabelle 1: Bekannte Effektoren von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85-10.

Gen-Name	Vorhergesagte Funktion/Homologie ^a	HrpG/HrpX-abh. ^b	G+C ^c (%)	Referenz
<i>avrBs1</i>	unbekannt	-	42,23	(169) (57)
<i>avrBs2</i>	Mögliche Glycerophosphoryl-diester phosphodiesterase	na	63,59	(190)
<i>avrRxv</i>	YopJ/AvrRxv-Familie, mögliche Cysteinprotease	-	52,32	(219) (42)
<i>xopB</i>	Homologie zu HopD1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	+	55,54	(150)
<i>xopC</i>	unbekannt	+	47,50	(152)
<i>xopD</i>	SUMO Cysteinprotease; C48 Familie	+	54,76	(151) (86)
<i>xopF1</i>	unbekannt	na	65,47	(165)
<i>xopF2</i>	unbekannt	na	64,72	(165)
<i>xopJ</i>	AvrRxv/YopJ-Familie, mögliche Cysteinprotease	+	56,86	(165)
<i>xopN</i>	unbekannt	na	63,44	(165)
<i>xopO</i>	Homologie zu HopK1 and AvrRps4 (<i>P. syringae</i>)	na	52,04	(165)
<i>xopP</i>	unbekannt	na	61,66	(165)
<i>xopQ</i>	HopQ1-1-Familie, mögliche Inosin-uridin-nucleosid N-ribohydrolase	na	68,88	(165)
<i>xopX</i>	unbekannt	na	65,95	(136)
<i>ecf</i>	“Early chlorosis factor”, Homologie zu HopAE1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>)	-	64,88	(141)

^a Vorhergesagte Funktion und Homologie zu bekannten Effektoren von *Pseudomonas syringae* oder anderer *Xanthomonas* sp. Für die *Pseudomonas* Effektoren wurde die Einheitsnomenklatur nach Lindeberg *et al.* (123) genutzt.

^b HrpG- und HrpX-abhängige Koregulation mit dem TTS-System (na, nicht analysiert).

^c G+C Gehalt der kodierenden Region.

Die Angaben erfolgen nach Thieme *et al.* (195).

1.3.2 Das TTS-System von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird das TTS-System von einem 23 kb großen chromosomalen *hrp*-Gencluster kodiert (Abb. 5) (26). Dieses besteht aus den Operonen *hrpA* bis *hrpF* und kodiert neben den Strukturkomponenten des TTS-Apparates auch Effektorproteine und Translokations-Kontrollkomponenten. Durch DNA-Sequenzanalysen und die Phänotypen nicht-polarer Mutanten wurden drei Genklassen identifiziert. Die zwischen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konservierten Komponenten werden als *hrc*-Gene („*hrp* conserved“) bezeichnet, welche die Grundausrüstung der TTS-Systeme darstellen. Die Buchstabenkennzeichnung entspricht der des jeweiligen homologen Gens aus *Yersinia* spp. (24). Zur Klasse der *hrp*-Gene zählen die Komponenten, die nicht in allen TTS-Systemen vorkommen, aber essenziell für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* sind. Die dritte Klasse umfasst die *hpa*-Gene („*hrp* associated“), die im Ge-

gensatz zu *hrc*- und *hrp*-Genen nicht essenziell für die Interaktion mit der Wirtspflanze sind, jedoch einen modulierenden Einfluss auf die bakterielle Pathogenität oder die Symptombildung ausüben (35, 36, 61, 62, 92, 93, 172, 216).

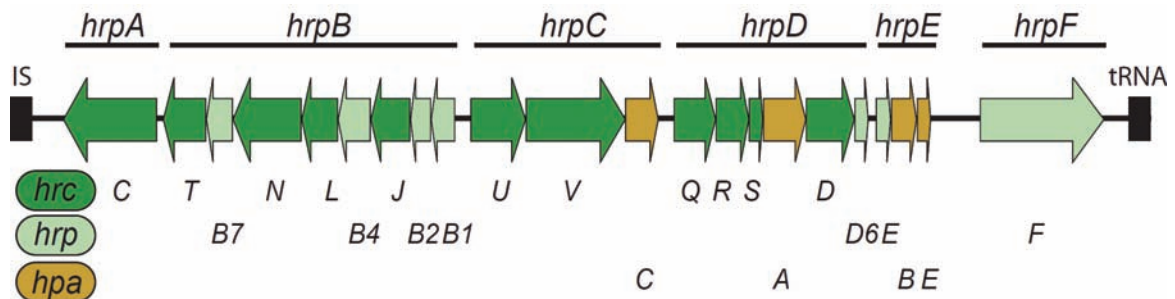


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Der *hrp*-Gencluster besteht aus den Operonen *hrpA* bis *hrpF*. Die *hrc*-Gene sind als dunkelgrüne, *hrp*-Gene als hellgrüne und die *hpa*-Gene als braune Pfeile dargestellt. Der *hrp*-Gencluster wird von einem Insertions-element (IS) und einer tRNA begrenzt (nicht maßstabsgetreu).

1.3.3 Regulation des TTS-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Die Aktivierung der *hrp*-Gene in *X. campestris* pv. *vesicatoria* erfolgt *in planta* und in induzierendem Medium über die Regulatoren HrpX und HrpG, die außerhalb des *hrp*-Genclusters kodiert sind (179, 215) (Abb. 6). Die Art und Weise durch die die Aktivierung des zur OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen zählenden HrpG erfolgt, ist nicht vollständig geklärt. Bisher konnten weder die postulierte Sensorkinase noch der pflanzliche Elicitor identifiziert werden. Eine mutierte Variante des Regulators HrpG, HrpG* (E44K), bildet vermutlich den phosphorylierten Zustand nach und bedingt eine konstitutive Expression der *hrp*-Gene (218). HrpG kontrolliert die Expression eines genomweiten Regulons, zu dem neben den Komponenten des TTS-Systems auch viele Typ-III-Effektoren zählen. Die Aktivierung der meisten Gene des HrpG-Regulons wird durch HrpX vermittelt (150, 217). HrpX gehört zur AraC-Familie von Transkriptionsaktivatoren und reguliert neben den Transkriptionseinheiten *hrpB* bis *hrpF* (215) auch *avrXv3* (13) und verschiedene *xop*-Gene (*Xop*, „*Xanthomonas* outer protein“) (151, 152). Viele HrpX-regulierte Gene weisen ein konserviertes Promotorelement mit der Konsensussequenz TTCGC-N₁₅-TTCGC, die so genannte PIP-Box (PIP, „plant inducible promoter“) auf, das in *X. oryzae* pv. *oryzae* essenziell für die Regulation ist (198). Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente, bei denen epitopmarkiertes HrpX mit einem die PIP-Box enthaltenden DNA-Fragment spezifisch aus einem *Xanthomonas* Gesamtproteinextrakt angereichert wurde (Krüger und Koebnik, unveröffentlichte Daten). PIP-Box-

ähnliche Sequenzen wurden nicht nur in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sondern auch in weiteren Xanthomonaden gefunden (47, 62, 118, 173).

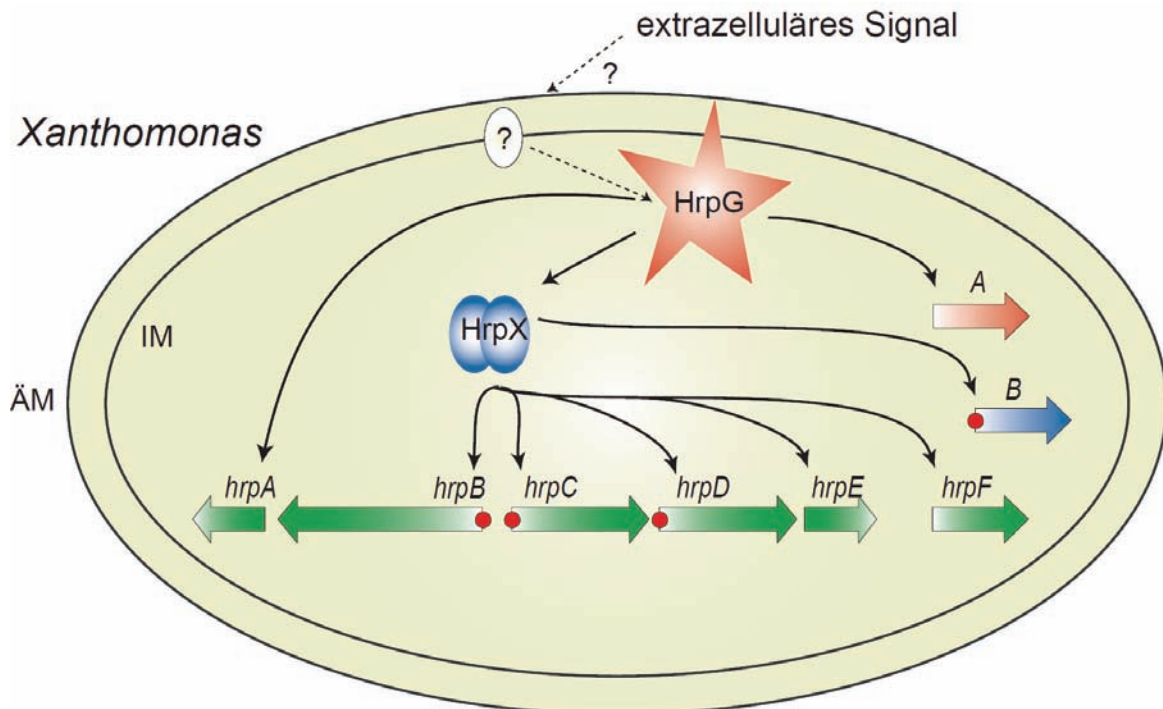


Abbildung 6: Regulation des *hrp*-Genclusters in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Der Zwei-Komponenten-Regulator der OmpR-Familie HrpG wird durch ein bisher nicht charakterisiertes Signal aktiviert. HrpG induziert die Expression von *hrpA*, des AraC-Typ-Regulators HrpX und weiterer nicht charakterisierter Gene (A), von denen eines Homologie zu einer Metalloprotease aufweist (150). HrpX aktiviert nachfolgend die Operone *hrpB* bis *hrpF* sowie weitere Gene (B), zu denen unter anderem die meisten *xop*-Gene gehören. Allerdings verfügen nicht alle HrpX regulierten Gene über eine perfekte PIP-Box. Die PIP-Boxen sind als rote Kreise dargestellt. ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran.

1.3.4 Funktion der im *hrp*-Gencluster kodierten Proteine

Unter den zirka 20 Proteinen, die in die Typ-III-Sekretion involviert sind, sind elf konserviert und bilden wahrscheinlich die Kernkomponenten eines funktionellen Sekretionsapparates (81, 147) (Abb. 7). Die große Sequenzähnlichkeit der Hrc-Proteine zu Komponenten aller TTS-Systeme und dem Flagellensystem erlaubt es, Beobachtungen, die an Komponenten dieser Systeme gemacht wurden, auf das vom *hrp*-Gencluster kodierte System zu übertragen. Eine Übersicht der im folgendem beschriebenen Interaktionen und der Lokalisierung der konservierten Komponenten ist in Tabelle 2 gegeben.

1.3.4.1 Äußere Membran

HrcC ist die einzige Komponente des TTS-Systems aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*, die in der äußeren Membran lokalisiert ist (216). HrcC gehört zur Familie der Sekretine und bildet höchstwahrscheinlich einen homomultimeren, ringförmigen Komplex, der für den Transport durch die äußere Membran essenziell ist. Die von den HrcC-Homologen YscC (*Y. enterocolitica*) und InvG (*S. typhimurium*) gebildeten Komplexe weisen einen Außendurchmesser von ca. 15 bzw. 20 nm und einem Innendurchmesser von 7 bzw. 5 nm auf (45, 114). Der YscC-Komplex besteht aus 13 Untereinheiten (32). C-terminale Sequenzabschnitte reichen in das Periplasma und ermöglichen vermutlich eine Interaktion mit Innenmembrankomponenten, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar ist (22, 178).

1.3.4.2 Komponenten der inneren Membran

HrcJ ist homolog zu EscJ aus EPEC, MxiJ aus *S. flexneri* und PrgK aus *S. typhimurium*. Es stellt damit vermutlich ein Mitglied der Lipoprotein-Familie dar, deren Mitglieder durch eine N-terminal kovalent gebundene Fettsäure und eine C-terminale Transmembranhelix in der inneren Membran verankert sind (22). Die Reinigung der Nadelkomplexe von *S. flexneri* und *S. typhimurium* zeigte, dass MxiJ/PrgK am Aufbau der inneren Ringe beteiligt sind (116, 194). Die von EscJ gebildete supramolekulare Struktur besteht aus 24 Monomeren, die einen Ring von 5 nm Höhe und einem Außendurchmesser von 18 nm formen. Der Kanal im Inneren verengt sich von der der Membran zugewandten Seite zum Periplasma von 12 nm auf 7,3 nm (224). Die durch Elektronenkryomikroskopie aufgeklärte Struktur des EscJ-Homologs FliF zeigt eine vergleichbare Form und mit vermutlich 26 Untereinheiten auch eine ähnliche Stöchiometrie (189).

Membrantopologieuntersuchungen zeigen, dass neben HrcJ auch HrcT, HrcU, HrcV, HrcR, HrcS und HrcD in der inneren Membran lokalisiert sind (7, 16, 63, 160). Die Komponenten zeigten im Hefe-Di-Hybrid System vielfältige Interaktionen untereinander, konnten allerdings bisher nicht gemeinsam mit dem Nadelkomplex gereinigt werden (46, 73). Eine der konservierten Innenmembrankomponenten könnte den Rezeptor für das Typ-III-Sekretionssignal von Effektoren darstellen. Diese Komponente wurde bisher nicht identifiziert, allerdings sollte sie auch im Flagellensystem konserviert sein, da mehrere Proteine sowohl mittels des TTS-Systems als auch mit dem Flagellensystem sekretiert werden können (120, 226, 227).

HrcV weist zehn Transmembranhelices (TMHs) auf, wobei eine ungefähr 250 Aminosäu-

ren große, C-terminale Domäne im Zytoplasma lokalisiert ist (16). Die Zytoplasmatischen Domänen von FhlA und FhlB, den HrcV- und HrcU-Homologen des Flagellensystems, bilden Homo- sowie Heterooligomere und interagieren des Weiteren mit FliF und zytoplasmatischen Komponenten wie der ATPase FliI (105, 229). HrcU besitzt wie HrcV eine C-terminale zytoplasmatische Domäne und vier TMHs (16). FhlB kontrolliert den Wechsel zwischen den Komponenten des „rods“ bzw. „hooks“ und des Flagellenfilaments (67). Im TTS-System von *Yersinia* ist YscU in den Wechsel der Sekretion von der Nadelkomponente YscF zu Effektorproteinen involviert (53).

HrcT, HrcR und HrcS sind homolog zu FliR, FliP und FliQ beim Flagellenapparat. HrcT besitzt eine TMH und eine zirka 220 Aminosäuren umfassende periplasmatische Domäne. HrcR weist vier TMHs, und zwischen den TMHs 2 und 3 eine etwa 80 Aminosäuren umfassende periplasmatische Domäne auf. HrcS ist ein bitopisches Membranprotein (16). Das Homolog von HrcR aus *E. coli*, EscR, interagiert in Hefe-Di-Hybrid-Analysen mit sich selbst, mit EscS sowie mit EscU (46). Die Funktionalität eines FliR-FhlB Fusionsproteins in einer *fliR fhlB* Doppelmutante deutet auf eine Interaktion dieser beiden Komponenten hin (201).

HrcD gehört zur am schwächsten konservierten Proteinfamilie. Es ist ein bitopisches Membranprotein mit einer vorhergesagten zytoplasmatischen FHA- („fork-head-associated“) Domäne, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist. Im periplasmatischen Teil des Proteins wird eine Phospholipidbindende BON- („bacterial Qs-mY and nodulation“) Domäne vorhergesagt (16, 156).

1.3.4.3 Zytosolische Komponenten

Das in *Xanthomonas* durch ein Gen kodierte Protein HrcQ besteht in *P. syringae* aus HrcQ_A und HrcQ_B. HrcQ_A ist hierbei zum N-Terminus und HrcQ_B zum C-Terminus des HrcQ-Proteins homolog. Die 80 C-terminalen Aminosäuren sind zwischen den Mitgliedern der HrcQ-Familie sowie FliN und FliM konserviert, welche Komponenten des flagellaren zytoplasmatischen Ringes sind (60). Die Kristallstruktur dieser konservierten Region wurde für HrcQ_B aus *P. syringae* und FliN aus *Thermotoga maritima* gelöst (31, 60). Die Domäne ist für die Interaktion des zytosolisch lokalisierten HrcQ_B und dem in der Membran verankerten HrcQ_A essenziell. (60). YscQ interagiert mit weiteren konservierten Komponenten, YscN und YscL, und könnte diese zum TTS-Apparat rekrutieren (95).

HrcN stellt die mit dem TTS-System assoziierte ATPase dar und verfügt über Sequenzähnlichkeiten zur katalytischen β -Untereinheit der mitochondrialen F₀F₁ ATP-Synthase. HrcN aus *P. syringae* sowie FliI liegen als Monomere sowie als Multimere vor, wobei die Oligomerisierung durch Phospholipide oder Membranassoziation gefördert wird (43, 161). In Analogie zu F₁ ATPasen und mit dem Typ-IV-Sekretionssystem assoziierten ATPasen bilden HrcN und FliI ringförmige Strukturen aus sechs Untereinheiten (1, 43, 161, 177). Die ATP-Hydrolyseaktivität ist beim *Pseudomonas* HrcN-Hexamer im Vergleich zum Monomer um den Faktor 700 erhöht und damit abhängig von der Oligomerisierung (161). Des Weiteren wird die ATPase-Aktivität durch die Bindung des negativen Regulators FliH kontrolliert (138). Eine Interaktion der FliH-Homologen YscL und HrcL mit den jeweiligen ATPasen der TTS-Systeme YscN bzw. HrcN wurde ebenfalls gezeigt (16, 95).

Tabelle 2: Konservierte Komponenten des TTS-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

<i>Xanthomonas</i>	Homologie		Interaktion mit ^c	Lokalisierung ^d	
	TTS-System ^a	Flagellum ^b			
HrcC	InvG	<i>Salmonella</i>	HrcJ (178)	Äußere Membran	
	YscC	<i>Yersinia</i>			
	MxiD	<i>Shigella</i>			
HrcT	YscT	<i>Yersinia</i>	FliR	HrcU (201)	Innere Membran
HrcN	YscN	<i>Yersinia</i>	FliI	HrcQ/HrcL (95) HrcN (5, 161)	Zytoplasma
HrcL	YscL	<i>Yersinia</i>	FliH	HrcN/HrcQ (95)	Zytoplasma
HrcJ	EscJ	EPEC	FliF	HrcU (105) HrcQ (143)	Innere Membran
	MxiJ	<i>Shigella</i>			
	PrgK	<i>Salmonella</i>			
HrcU	EscU	EPEC	FlhA	HrcR (46)	Innere Membran
				HrcJ (105)	
				HrcV (229)	
				HrcU (229)	
HrcV	YscV	<i>Yersinia</i>	FlhB	HrcU/HrcN/HrcV (5, 229)	Innere Membran
HrcQ	HrcQ _A / HrcQ _B	<i>Pseudomonas syringae</i>	FliM/FliN	HrcN (95, 143)	Innere Membran/ Zytoplasma
				HrcL (95)	
				HrcJ (143)	
HrcR	EscR	EPEC	FliP	HrcR/HrcS/HrcU(46)	Innere Membran
HrcS	EscS	EPEC	FliQ	HrcR (46)	Innere Membran
HrcD	PrgH	<i>Salmonella</i>		HrcJ (108)	Innere Membran

^a Homologie zu Komponenten in Virulenz-assoziierten TTS-Systemen oder ^b dem Flagellensystem von *S. typhimurium*.

^c Interaktionen in den jeweiligen Systemen wurde auf die *Xanthomonas*-Nomenklatur übertragen.

^d Angaben zur Lokalisierung basieren auf Studien verschiedener Bakteriengattungen.

1.3.4.4 Nicht-konservierte Komponenten des TTS-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Die Funktion der nicht-konservierten Komponenten des TTS-Systems von *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurde bisher nur in einigen Fällen aufgeklärt. Die zytosolisch lokalisierten Proteine HpaB und HpaC sind für die volle Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essenziell. Sie sind sowohl an der Sekretionskontrolle als auch an der Translokationskontrolle beteiligt. HpaB und HpaC binden an den N-Terminus von Effektorproteinen, aber auch an HrcV, und stellen so vermutlich die Verbindung zwischen den Substraten des TTS-Systems und dem TTS-Apparat her (5, 36, 37).

HpaA besitzt eine duale Funktion. Zum einen ist HpaA an der Typ-III-abhängigen Sekretion bestimmter TTS-Substrate beteiligt, interagiert in *X. axonopodis* pv. *glycines* mit HpaB und HrcV und scheint selbst ein Teil des TTS-Apparates zu sein (5, 172). HpaA ist jedoch auch ein Substrat des TTS-Systems und kodiert funktionale Kernlokalisierungssequenzen, was auf eine Funktion in der pflanzlichen Wirtszelle hindeutet (93). Auch HrpB2, HrpE und HrpF werden im *hrp*-Gencluster kodiert und sind Substrate des TTS-Systems.

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist HrpF die Hauptkomponente des TTS-Translokons. HrpF wird TTS-abhängig sekretiert und ist unabdingbar für die Translokation, nicht aber die Sekretion von Effektoren (92, 172). HrpF bindet an künstliche Lipidmembranen und bildet in ihnen Poren (35). Das TTS-Translokon wird vermutlich durch den Hrp-Pilus mit dem TTS-Apparat verbunden, allerdings wurde noch keine direkte Interaktion beschrieben.

1.3.4.5 Der Hrp-Pilus

Die Isolierung und Charakterisierung des TTS-Apparates pflanzenpathogener Bakterien ist im Gegensatz zu tierpathogenen Bakterien bisher nicht gelungen. Allerdings konnten mit dem TTS-Apparat assoziierte Oberflächenstrukturen visualisiert werden, die in Anlehnung an die Nomenklatur des TTS-Systems in Pflanzenpathogenen Hrp-Pili genannt wurden. Hrp-Pili besitzen eine hohe morphologische Ähnlichkeit zu den Nadeln der Tierpathogenen und haben einen Durchmesser von 8-10 nm. Im Gegensatz zu den Nadeln erreichen die Hrp-Pili eine Länge von mehreren Mikrometern und können so die mehr als 200 nm dicke pflanzliche Zellwand durchspannen (30, 88).

Hrp-Pili wurden bisher bei *P. syringae*, *R. solanacearum* und *E. amylovora* beschrieben und sind überwiegend aus einem Hrp-Protein aufgebaut: HrpA bei *P. syringae* (168), HrpY im Falle von *R. solanacearum* (203) und HrpA bei *E. amylovora* (98). Morphologisch verwandte Strukturen sind auch mit den TTS-Systemen der Pflanzensymbionten *S. fredii* bzw. *Rhizobium* NGR234 assoziiert und bestehen hier wahrscheinlich hauptsächlich aus dem Protein NopA (115, 131). Die verschiedenen Hrp-Pilus-Untereinheiten (Hrp-Piline) weisen ein geringes Molekulargewicht und eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur auf, wobei sie untereinander nur eine sehr geringe Sequenzähnlichkeit zeigen (111). Diese Sequenzhypervariabilität der Hrp-Piline ist auch zwischen nah verwandten Arten wie *P. syringae* pv. *syringae* und *P. syringae* pv. *tomato* (26 % Sequenzidentität von HrpA auf Aminosäureebene) beobachtbar (98).

Hrp-Pili sind entscheidend für die Interaktion des pathogenen Bakteriums mit der Wirtspflanze. *hrpA*-Mutanten in *P. syringae* und *E. amylovora* sowie *hrpY*-Mutanten in *R. solanacearum* lösen keine Krankheitssymptome in suszeptiblen und keine HR in resistenten Pflanzen aus. Weiterhin sind sie essenziell für die *in vitro* Sekretion von TTS-Effektoren (203, 211). Die direkte Beteiligung der Hrp-Pili an der Sekretion wird auch durch Immunmarkierungsexperimente nahe gelegt. So konnten TTS-abhängig sekretierte Substrate spezifisch entlang der Hrp-Pili lokalisiert werden, was eine bereits während der Hrp-Pilus Assemblierung stattfindende Sekretion andeutet (30, 97). Die Sekretion von Effektoren und die Assemblierung der Hrp-Pilus-Untereinheiten erfolgt an der Spitze des Hrp-Pilus, was durch eine „Entkopplung“ der HrpA-Sekretion von seiner Expression gezeigt werden konnte (97, 122). Es wird angenommen, dass die sekretierten Proteine im Inneren der Hrp-Pili transportiert werden und auf diese Weise zur pflanzlichen Wirtszelle gelangen. Dieser Sekretionsmechanismus wird auch vom flagellaren System genutzt. Hier werden teilgefaltete Flagellin-Untereinheiten durch einen zentralen Kanal des Flagellums transportiert und an der Spitze assembliert (55).

Neben seiner rein strukturellen Funktion als Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus besitzt HrpA aus *P. syringae* pv. *tomato* auch einen regulatorischen Einfluss. In einer HrpA-Mutante wird die Transkription von *hrp*-, *hrc*- und *avr*-Genen negativ beeinflusst (211).

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* konnte die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus bisher nicht identifiziert werden. Einen möglichen Kandidaten stellt HrpE dar. Die Reinigung des Kulturüberstandes von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und anschließende Sequenzierung der identifizierten Proteine zeigte, dass HrpE die dominante Komponente im Kulturüberstand darstellt. HrpE ist ein 9,7 kDa großes Protein, dessen Sekundärstruktur hauptsächlich α -helikal vorhergesagt wird. Die einzigen Homologen finden sich in den *Xanthomonas*-Stämmen *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *citri* und *X. campestris* pv. *campestris*. Die Analyse einer Transposoninsertionsmutante zeigte, dass HrpE für die Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen essenziell ist (U. Bonas, persönliche Mitteilung). Mit der Generierung einer HrpE-Insertionsmutantenbibliothek, die eine detaillierte Analyse von HrpE ermöglicht, wurde bereits in der Diplomarbeit begonnen (207).

Eine weitere Komponente des Hrp-Pilus könnte HrpB2 darstellen, da es selbst Typ-III-abhängig sekretiert wird, aber auch essenziell für die Sekretion von Effektoren ist (172).

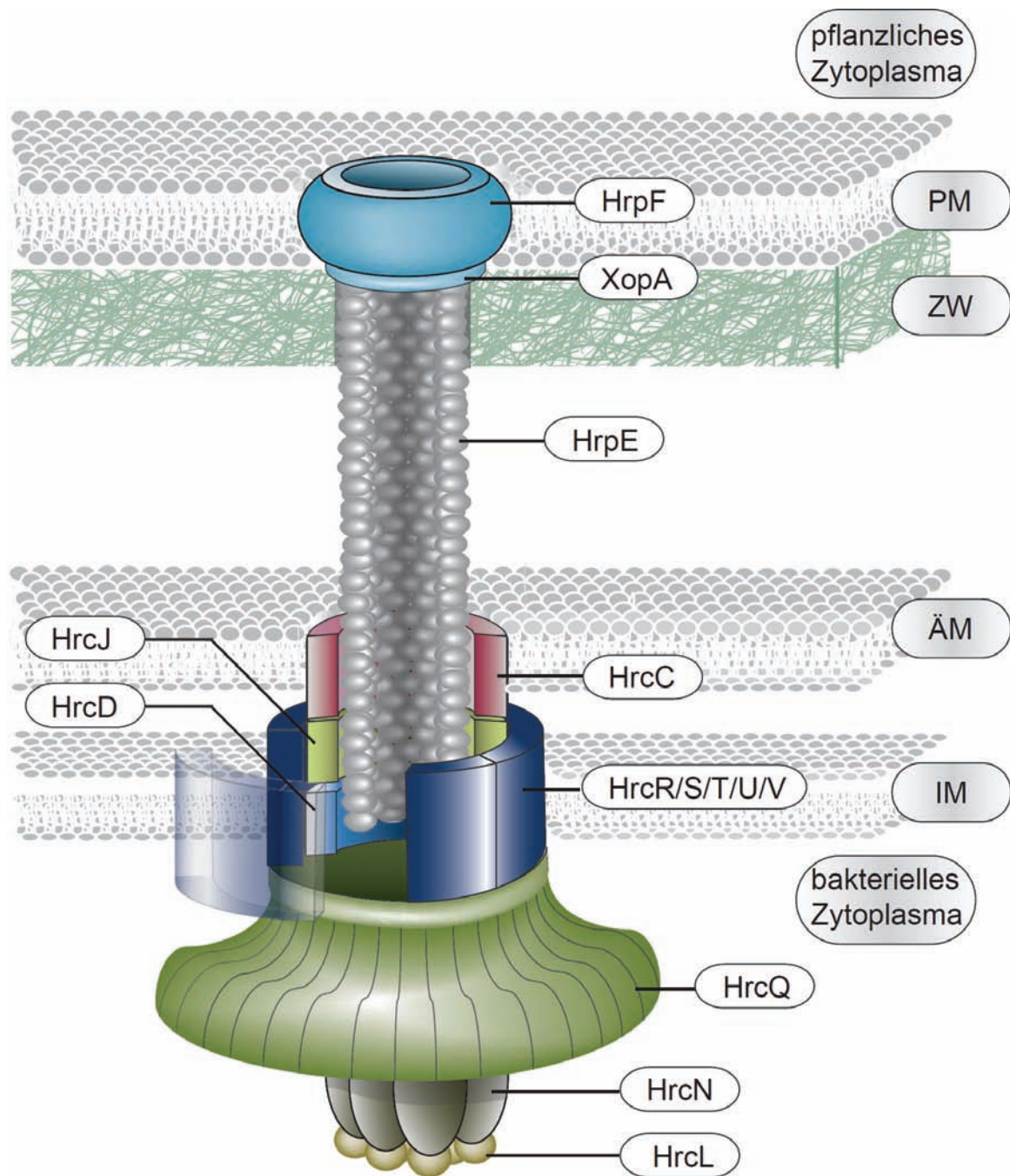


Abbildung 7: Modell des TTS-Systems von *X. campestris pv. vesicatoria*.

Der die beiden bakteriellen Membranen durchspannende TTS-Apparat ist mit dem extrazellulären Hrp-Pilus assoziiert, der die pflanzliche Zellwand (zirka 200 nm breit, nicht maßstabsgetreu dargestellt) durchspannt. Die Verbindung zum in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisierten Translokon wird möglicherweise durch XopA vermittelt. Die Anordnung der Hauptstrukturkomponenten in der inneren und äußeren bakteriellen Membran basiert auf den Beschreibungen in Kapitel 1.3.4. PM, Plasmamembran; ZW, Zellwand; ÄM, äußere Membran; IM, innere Membran.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die genetische und biochemische Charakterisierung des Hrp-Pilus von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Zur Analyse des möglichen Einflusses verschiedener Komponenten des TTS-Systems auf die Hrp-Pilus-Bildung sollten nicht-polare Mutationen in individuelle *hrp*-Gene eingeführt und ihre Auswirkung mittels Elektronenmikroskopie analysiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei neben der Untersuchung der Translokonkomponente HrpF die der *hpa*-Gene *hpaA*, *hpaB*, *hpaC* und *hpaE*. Der modulierende Einfluss dieser Gene auf die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* könnte in einem Einfluss auf die Anzahl, Morphologie oder der Länge der gebildeten Hrp-Pili begründet sein.

Im Fokus der experimentellen Arbeiten stand die Charakterisierung von HrpE, eines Typ-III-abhängig sekretierten Proteins von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, welches essenziell für die bakterielle Pathogenität ist (26). Die Hypothese, dass HrpE die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus ist, sollte durch einen immunzytologischen Nachweis bestätigt werden. Hierzu war neben der Etablierung von Bedingungen, unter denen *X. campestris* pv. *vesicatoria* Hrp-Pili assembliert, auch die Generierung eines spezifischen Antikörpers notwendig.

Da bisher keine Homologen von HrpE beschrieben waren, bestand ein weiteres Ziel in der Definition funktioneller Abschnitte des Proteins unter Verwendung einer Bibliothek von Peptidinsertionsmutanten. Die Insertionsmutanten sollten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen, ihrer Hrp-Pilus-Morphologie und ihres Sekretionsverhaltens analysiert werden. Die erhaltenen Phänotypen würden Anhaltspunkte über die voraussichtliche Funktion definierter Proteinbereiche liefern. Weiterhin war geplant, die erhaltenen Insertionsmutanten heterolog in *E. coli* zu exprimieren, um lösliche HrpE-Varianten zu identifizieren, die zur Strukturaufklärung führen könnten.

2 ERGEBNISSE

2.1 Übersicht der Publikationen und Manuskripte

Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005) The type III-dependent Hrp Pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria with pepper host plants. *J. Bacteriol.*, **187**, 2458-2468.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der folgenden Experimente: Etablierung der die Hrp-Pilus-Visualisierung ermöglichenden Bedingungen. Generierung und Komplementation einer nicht-polaren *hrpE*-Mutante. Heterologe Expression und Reinigung von HrpE zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers. Immunogoldmarkierung von HrpF, AvrBs3 und HrpE. *In vitro* Sekretionsanalysen von HrpE, HrpF und AvrBs1. Generierung nicht-polarer Mutanten in Komponenten des *hrp*-Genclusters im *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria-Stamm 85E*. Analyse des Einflusses dieser Mutationen auf die Hrp-Pilus Bildung.

Weber, E. and Koebnik, R. (2005) Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.*, **187**, 6175-6186.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Anfertigung des Manuskripts.

Weber, E. and Koebnik, R. (2006) Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.*, **188**, 1405-1410.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Anfertigung des Manuskripts.

Weber, E., Berger, C., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005) Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Einreichung geplant.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente mit Ausnahme der *hrcD* 5'-RACE und der funktionellen Annotation des *hrp*-Genclusters von *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Anfertigung des Manuskripts.

nicht in diese Arbeit eingegangene Publikationen:

Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klößgen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorhölter, F., **Weber, E.**, Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D. and Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.*, **187**, 7254-7266.

Eigenanteil: Funktionelle Annotation der COG-Gruppen („cluster of orthologous genes“) „cell motility“ und „extracellular appendages“, sowie 300 weiterer vorhergesagter Gene.

Büttner, D., Lorenz, C., **Weber, E.** and Bonas, U. (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.*, **59**, 513-527.

Eigenanteil: Erstellung und Komplementation einer nicht-polaren *hpaC* Mutante in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Pathogenitätstests auf suszeptiblen und resistenten Paprikapflanzen sowie Analyse des Wachstums der *hpaC* Mutante auf suszeptiblen Paprikapflanzen.

2.2 Der Typ-III-abhängige Hrp-Pilus ist essenziell für die Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit der Paprika-Wirtspflanze

2.2.1 Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Apr. 2005, p. 2458–2468
 0021-9193/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.187.7.2458–2468.2005
 Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 187, No. 7

The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants

Ernst Weber,¹ Tuula Ojanen-Reuhs,^{2†} Elisabeth Huguet,^{3‡} Gerd Hause,⁴
 Martin Romantschuk,^{2§} Timo K. Korhonen,² Ulla Bonas,^{1,3}
 and Ralf Koebnik^{1*}

Institute of Genetics,¹ and Biozentrum,⁴ Martin Luther University, Halle, Germany; General Microbiology, Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland²; and Institut des Sciences Végétales, CNRS, Gif-sur-Yvette, France³

Received 10 November 2004/Accepted 28 December 2004

The plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* expresses a type III secretion system that is necessary for both pathogenicity in susceptible hosts and the induction of the hypersensitive response in resistant plants. This specialized protein transport system is encoded by a 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster. Here we show that *X. campestris* pv. *vesicatoria* produces filamentous structures, the Hrp pili, at the cell surface under *hrp*-inducing conditions. Analysis of purified Hrp pili and immunoelectron microscopy revealed that the major component of the Hrp pilus is the HrpE protein which is encoded in the *hrp* gene cluster. Sequence homologues of *hrpE* are only found in other xanthomonads. However, *hrpE* is syntenic to the *hrpY* gene from another plant pathogen, *Ralstonia solanacearum*. Bioinformatic analyses suggest that all major Hrp pilus subunits from gram-negative plant pathogens may share the same structural organization, i.e., a predominant alpha-helical structure. Analysis of nonpolar mutants in *hrpE* demonstrated that the Hrp pilus is essential for the productive interaction of *X. campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. Furthermore, a functional Hrp pilus is required for type III-dependent protein secretion. Immunoelectron microscopy revealed that type III-secreted proteins, such as HrpF and AvrBs3, are in close contact with the Hrp pilus during and/or after their secretion. By systematic analysis of nonpolar *hrp/hrc* (*hrp* conserved) and *hpa* (*hrp* associated) mutants, we found that Hpa proteins as well as the translocon protein HrpF are dispensable for pilus assembly, while all other Hrp and Hrc proteins are required. Hence, there are no other conserved Hrp or Hrc proteins that act downstream of HrpE during type III-dependent protein translocation.

Pathogenic bacteria exploit different strategies to successfully colonize their eukaryotic hosts. One of the key bacterial pathogenicity mechanisms is the translocation of proteins into eukaryotic host cells by a type III secretion (TTS) system consisting of a *trans*-envelope multiprotein complex. Components of TTS systems are generally encoded by gene clusters which often reside in pathogenicity islands (25). Several TTS systems have been studied, but our knowledge on the mechanism of substrate recognition and translocation is still very limited. The injectisome of *Yersinia* is the prototype example of a TTS system (13). There are three hallmarks of type III protein secretion. First, upon secretion, there is no processing of the protein substrate (42). Second, targeting to the TTS system involves sequence information at the N terminus of the protein and/or the corresponding region of the mRNA (14).

Third, secretion across the bacterial cell envelope appears to occur in one step without a periplasmic intermediate (11).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato (8). The *X. campestris* pv. *vesicatoria* TTS system is encoded by a 23-kb chromosomal *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster which contains six operons, *hrpA* to *hrpF* (Fig. 1) (5, 20, 21, 30, 51; U. Bonas, unpublished data). Loss of *hrp* gene function results in a pleiotropic phenotype: *hrp* mutants are unable to grow in the plant, no longer cause disease symptoms, and fail to induce the hypersensitive reaction in resistant host and nonhost plants (5). The hypersensitive reaction is a rapid, local, programmed cell death that is induced upon recognition of the pathogen and is concomitant with the inhibition of pathogen growth within the infected plant tissue (35).

hrp gene expression is induced in planta (55) and is controlled by the regulatory genes *hrpG* and *hrpX*, which are located outside the *hrp* gene cluster. The HrpG protein belongs to the OmpR family of two-component regulatory systems (64) and controls the expression of a large gene regulon including *hrpX*. The AraC-type transcriptional activator HrpX regulates the expression of the operons *hrpB* to *hrpF* (61) and of most members of the *hrpG* regulon (46, 47). A mutated form of the key regulatory gene *hrpG*, *hrpG**, which leads to the

* Corresponding author. Mailing address: Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, D-06120 Halle (Saale), Germany. Phone: 49 345 5526293. Fax: 49 345 5527151. E-mail: koebnik@gmx.de.

† Present address: Purdue University, Department of Food Sciences, West Lafayette, IN 47907.

‡ Present address: Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR, CNRS 6035, Faculté des Sciences, F-37200 Tours, France.

§ Present address: University of Helsinki, Department of Ecological and Environmental Sciences, FIN-15140 Lahti, Finland.

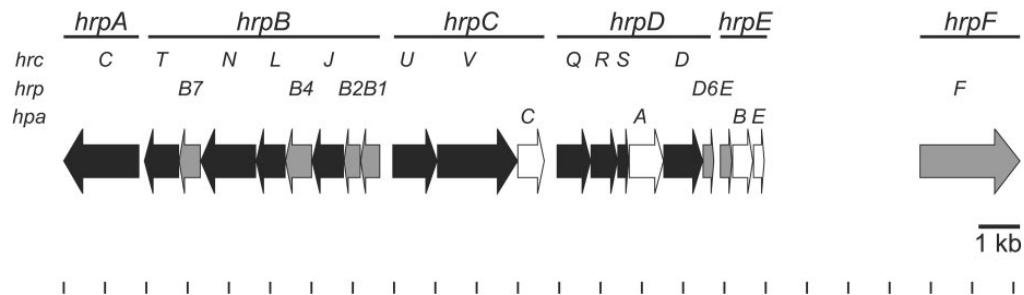


FIG. 1. Genetic organization of the *X. campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster. The solid lines at the top indicate the six *hrp* transcription units, A to F; the thick arrows indicate different genes. Conserved *hrc* genes are shown as black arrows, *hrp* genes are shown as grey arrows, and *hpa* genes are shown as open arrows.

constitutive expression of *hrp* and other genes, was instrumental for the comparison of the expression profiles of two isogenic *X. campestris* pv. vesicatoria strains, 85-10 and 85*, which differ in their *hrp* gene expression status (46, 63).

More than 20 proteins are encoded by the *hrp* gene cluster, 11 of which are conserved in plant and animal pathogenic bacteria (44). These genes were renamed *hrc* (*hrp* conserved) and are thought to encode the core components of the secretion apparatus (4). The role of nonconserved Hrp proteins is less clear. Two Hrp proteins, HrpB2 and HrpF, are secreted by the TTS system (51). HrpF is a component of the predicted type III translocon that inserts into the host cell membrane (10). Besides *hrc* and *hrp* genes, analysis of nonpolar mutants in the *hrp* gene cluster also identified *hpa* (*hrp* associated) genes that contribute to, but are not essential to, the interaction with the plant (9, 30, 47; U. Bonas and D. Büttner, unpublished data).

While the core components of TTS systems are highly conserved, their secreted substrates appear to be extremely diverse (15). Secreted proteins of *Xanthomonas* belong to several protein families of fundamentally different functions (15). Best-studied examples which play a role in pathogenicity are homologs of AvrBs3 (6) and peptidases of the C48 and C55 families, such as XopD and AvrXv4, respectively (27). Another class of secreted proteins are the subunits of type III-specific pili. Hrp pili were described for *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, and *Erwinia amylovora* (32, 49, 59) but not for any xanthomonad.

Using electron microscopy, we discovered Hrp pili in *X. campestris* pv. vesicatoria. Purification of these pili identified the HrpE protein as the major subunit, a finding that was confirmed by immunoelectron microscopy. Immunoelectron microscopy also revealed that type III-secreted proteins are in close contact with the Hrp pilus during and/or after their secretion. This finding agrees with the proposed role of Hrp pili to serve as conduits for the translocation of type III effector proteins (26, 50). Finally, we studied the influence of genes in the *hrp* gene cluster on the assembly of Hrp pili. Detection of Hrp pili required a functional TTS system as well as most nonconserved *hrp* genes, whereas *hpa* genes and *hrpF* were not essential for pilus assembly. This finding suggests that no other conserved Hrp or Hrc protein acts downstream of HrpE during the translocation process.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used are described in Table 1. Since the wild-type *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 produces large amounts of exopolysaccharides, the exopolysaccharide-negative strain 85E was used for most analyses. Plasmids were introduced into *Escherichia coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. vesicatoria by conjugation with pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (18, 22). *E. coli* cells were cultivated at 37°C in Luria-Bertani medium, and *X. campestris* pv. vesicatoria strains were cultivated at 30°C in NYG broth (16), in 1.5% NYG agar, in *hrp*-inducing XVM2 minimal medium (62), or in minimal medium A (2) supplemented with sucrose (20 mM) and Casamino Acids (0.3%). Since flagella were rarely observed after bacterial growth in minimal medium, XVM2 medium was used in most experiments. For pilus purification, *X. campestris* pv. vesicatoria was cultured with shaking at 120 rpm to the late logarithmic phase in XVM2 medium at 28°C. Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; tetracycline, 10 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml.

Plant material and plant inoculations. Pepper cultivar ECW and the near-isogenic line ECW-10R, which carries the resistance gene *Bs1*, were described previously (43). Inoculation of plant leaves and reisolation of bacteria from plant tissue were performed as described previously (5).

Construction of nonpolar mutants. To obtain nonpolar mutations, DNA regions upstream and downstream of the gene to be deleted were cloned in tandem into suicide vector pOK1. These constructs were then used to replace the corresponding chromosomal region as described previously (30). Most nonpolar mutants of strain 85E* were obtained by using available pOK1 derivatives (*hrpB1-hrcL* [51], *hrcU* [O. Rossier and U. Bonas, unpublished data], *hrcV* [52], *hrcQ-hrpD6* [30], *hpaB* [9], *hpaE* [L. Noël and U. Bonas, unpublished data], and *hrpF* [10]). Deletions of *hrcC*, *hrcI*, and *hrpB7* were constructed similarly by using PCR primers (Table 2) for amplification of approximately 1-kb DNA fragments. All mutations could be complemented.

A nonpolar mutation in *hrpE*, *hrpE*Δ9-93, was constructed as follows. A 4.6-kb BamHI-HindIII fragment of pKS-L2c2, encompassing the region from 1,178 bp upstream to 3,139 bp downstream of the *hrpE* coding sequence, was subcloned into pK194, leading to pK194-*hrpE*. From pK194-*hrpE*, a 2.1-kb NheI-SalI fragment (cleaved at approximately 900 bp upstream and downstream of *hrpE*) was transferred into XbaI-SalI-cleaved pOK1, leading to pOK-*hrpE*. GPS-LS linker-scanning mutagenesis (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.) was then used to isolate an insertion of a premature stop codon in *hrpE*. The sequence at codon 8 reads as GTA₇ AGT₈ GTT TAA ACA GTA₇ AGT₈ (stop codon underlined; DraI site in italics) (pOK-*hrpE*Δ9-93). This pOK1 derivative was checked by restriction digestion and DNA sequence analysis before its conjugation into *X. campestris* pv. vesicatoria (18, 22). The chromosomal wild-type copy of *hrpE* was replaced by two consecutive crossover events as described previously (34). The presence of the mutation in the derived strains was verified by detection of a diagnostic DraI site.

Primer extension analysis of *hrpE*. Bacteria were grown for 16 h in NYG or XVM2 or recovered from susceptible pepper plants 3 days after whole-plant infiltration. Bacterial RNA was extracted as described previously (1). Primer extension was performed as previously described (2, 62) with oligonucleotide 144 or 145 (Table 2) and reverse transcriptase Superscript RNase H⁻ reverse transcriptase Moloney murine leukemia virus (Gibco BRL, Eggenstein, Germany).

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
Strains		
75-3	Tomato pathogenic, wild type, Rif ^r	43
85-10	Pepper race 2, wild type, Rif ^r	6
85E	<i>eps</i> ::Tn3- <i>gus</i> insertion mutant of 85-10, <i>hrp</i> ⁺ Rif ^r Km ^r	62
85E*	Derivative of 85E carrying <i>hrpG</i> [*] , constitutive expression of <i>hrp</i> genes	63
85EΔAD	<i>hrpA</i> to <i>hpaA</i> deletion mutant of 85E, Rif ^r Km ^r Spc ^r	62
85E* Δ <i>hpa</i>	<i>hpa</i> deletion mutants of 85E*	This study
85E* Δ <i>hrc</i>	<i>hrc</i> deletion mutants of 85E*	This study
85E* Δ <i>hrp</i>	<i>hrp</i> deletion mutants of 85E*	This study
85-10 and 85E* <i>hrpE</i> Δ9-93	<i>hrpE</i> mutants of 85-10 and 85E* with a premature stop codon in <i>hrpE</i> ^a	This study
Plasmids		
pDSK300F	pDSK602 expressing AvrBs3 from the <i>lac</i> promoter	58
pDSM110	pDSK604 expressing a c- <i>myc</i> -tagged version of AvrBs1 from its own promoter	19
pK194	Cloning vector, p15a origin of replication, Km ^r	33
pK194- <i>hrpE</i>	Wild-type <i>hrpE</i> in pK194	This study
pKS-L2c2	4.5-kb EcoRV fragment containing <i>hrpE</i> in pBluescript KS+ (Stratagene)	Bonas, unpublished
pOK1	Suicide vector, <i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i> , Spc ^r	30
pOK- <i>hrpE</i>	Wild-type <i>hrpE</i> in pOK1	This study
pOK- <i>hrpE</i> Δ9-93	Stop codon insertion after codon 9 of <i>hrpE</i> in pOK1	This study
pRK2013	Helper plasmid for triparental matings, TraRK ⁺ Mob ⁺ Km ^r	22
pXV9: <i>hpaB</i> -75	pLAFR3 <i>hrpA</i> to <i>E</i> clone from <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria 75-3; Tn3- <i>gus</i> insertion in <i>hpaB</i>	Bonas, unpublished
pXV74	pLAFR3 <i>hrpA</i> to <i>F</i> clone from <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria 75-3	62

^a For details, see pOK-*hrpE* plasmids and Materials and Methods.

Preparation of Hrp pili and protein analysis. Pili were purified from strain 85E of *X. campestris* pv. vesicatoria by use of a deoxycholate-sucrose density gradient as described by Ojanen-Reuhs et al. (48). Briefly, after mechanical detachment from the bacterial cells, cells were pelleted and the pili-containing supernatant was concentrated by precipitation with ammonium sulfate, dialyzed, and solubilized in buffer containing deoxycholate. The sample containing the pili was purified further by ultracentrifugation in a sucrose gradient. Pili were found at the bottom of the gradient and were analyzed by Tricine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (54). For N-terminal sequence analysis, the pilus fraction was electrophoresed, blotted on a polyvinylidene difluoride membrane, and stained with Coomassie brilliant blue. The polypeptides were excised and subjected to Edman degradation in a gas-pulsed liquid-phase sequencer.

Preparation of recombinant HrpE and antibody production. For production of a monospecific polyclonal HrpE-specific antiserum, the coding region of the *hrpE* gene was amplified by PCR. The PCR-generated fragment was cloned into

pET15b (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) vector as a NdeI/BamHI fragment, leading to synthesis of an N-terminally hexahistidine-tagged HrpE variant. This expression plasmid was then introduced into *E. coli* JM109(DE3) cells (Promega GmbH, Mannheim, Germany). Expression of the HrpE fusion protein was initiated by induction with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The recombinant HrpE, which was purified by nickel-affinity column chromatography (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) under denaturing conditions with 8 M urea, was desalted. Further purification of HrpE was achieved by preparative SDS-PAGE. Antibodies against the purified recombinant HrpE were raised in a New Zealand White female rabbit at the Robert Koch Institut (Wernigerode, Germany).

An HrpE-specific antipeptide antibody was generated in rabbits against the highly conserved peptide L₇₆NKFIGKAGDNAKQ₈₉ (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Germany).

Type III secretion experiments and immunoblot analysis. In vitro secretion experiments were performed as described previously (52). Western blots were

TABLE 2. DNA oligonucleotides used in this study

Use	Oligonucleotide	Nucleotide sequence ^a	Relevant characteristic
Construction of nonpolar <i>hrcC</i> mutant	<i>hrcC</i> -Δ left-5'	GCTACTGGATCCGATCGCAGGCACGATGTT	BamHI site
	<i>hrcC</i> -Δ left-3'	GCTCTCGCTAGCATGCAACGGCTGTTTCTG	NheI site
	<i>hrcC</i> -Δ right-5'	GCTACTGCTAGCTCAGTACGGCGGCAAATG	NheI site
	<i>hrcC</i> -Δ right-3'	GCTACTCTAGAGCCTTGCTGGCCATTTC	XbaI site
Construction of nonpolar <i>hrpB7</i> mutant	<i>hrpB7</i> -Δ left-5'	GCTCCAGGATCCAATTGCGCGATGAAGACG	BamHI site
	<i>hrpB7</i> -Δ left-3'	GCTCCAGCTAGCCAGGTATACGCAGACAAG	NheI site
	<i>hrpB7</i> -Δ right-5'	GCTCCAGCTAGCACTCAGGCGTTCCTGCAT	NheI site
	<i>hrpB7</i> -Δ right-3'	GCTCCATCTAGACAGTGCGATGTCAATGTG	XbaI site
Construction of nonpolar <i>hrcJ</i> mutant	<i>hrcJ</i> -Δ left-5'	GCTCCAGGATCCTCTGTGCACGTGTCTG	BamHI site
	<i>hrcJ</i> -Δ left-3'	GCTCCAGCTAGCCTGCGCGAGTTGAAGAAA	NheI site
	<i>hrcJ</i> -Δ right-5'	GCTCCAGCTAGCCAGCAACCACAGGCATCT	NheI site
	<i>hrcJ</i> -Δ right-3'	GCTCCATCTAGAGGCAATTACGTGGAAGGT	XbaI site
Primer extension analysis	No. 144	GGGGTACCAACACGGGACCTCCACGAGC	Codons 15 to 8 of <i>hrpE</i>
	No. 145	GGGGTACCGAGTAGCGAATCCATCTGG	Codons 47 to 40 of <i>hrpE</i>

^a Underlined sequences, relevant restriction sites.

incubated with polyclonal antiserum against HrpE (diluted 1:500) or HrpF (diluted 1:50,000) (10) or with monoclonal antibodies against *c-myc* (diluted 1:1,000) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Blots were then probed with anti-rabbit (for HrpE and HrpF) or anti-mouse (for *c-myc*) horse-radish peroxidase-conjugated secondary antibody, which was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). The membranes were re-probed with a specific antibody against the intracellular protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred (52).

EM techniques. For electron microscopy (EM) analyses, bacteria were grown on EM grids according to a slightly modified published protocol (7). Briefly, bacterial cultures were grown for 24 h in NYG medium with shaking at 30°C. Bacteria were washed twice in 1 mM MgCl₂ and resuspended in minimal medium unless otherwise indicated. The bacterial suspension was adjusted to an optical density at 600 nm of 0.02, and a 15-µl droplet was applied to a 300-mesh gold EM grid (Sigma, Taufkirchen, Germany) coated with 1% Formvar (polyvinyl 1595E; Serva, Heidelberg, Germany). To avoid evaporation, the grids were placed in a 9-cm-diameter petri dish containing wet filter paper and sealed with Parafilm. Grids were incubated for 4 to 16 h in a growth chamber at 30°C before bacteria and pili were fixed by transferring the grid twice into a 20-µl drop of 2% formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 20 min. Specimens were then negatively stained for 10 s in 2% phosphotungstic acid and air dried before viewing.

For immunogold labeling, dried grids were washed with TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% acetylated bovine serum albumin, and 0.1% Tween 20 [pH 7.2]) and blocked with 1% acetylated bovine serum albumin in TBST for 30 min at room temperature. Primary antibodies (anti-HrpE, anti-HrpF [10], anti-AvrBs3 [36]) were used at a dilution of 1:500, and grids were incubated for 90 min at room temperature. For HrpE immunogold labeling, unfixed bacteria were used. Anti-rabbit immunoglobulin G-10-nm-diameter gold bead antibodies produced in goat (Sigma) served as secondary antibodies at a dilution of 1:100, and grids were incubated for 1 h at room temperature. All specimens were examined on an EM 900 electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at an operating voltage of 80 kV.

Bioinformatic analyses. The following eight prediction algorithms, most of which use neural networks, were applied to available HrpE amino acid sequences from *Xanthomonas* spp. (*X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 75-3, GenBank accession no. AAD21326; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain MAFF 311018, GenBank accession no. BAB07867; *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* strain 8ra, GenBank accession no. AAP34354; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306, GenBank accession no. AAM35288; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913, GenBank accession no. AAM40519): HNN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_hnn.html), MLRC (http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_mlr.html), PHD (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>), Prof (<http://www.aber.ac.uk/~phiwwww/prof/>), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), SAM-T99 (<http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-model-library-search.html>), Scratch and SsProm (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/>). A consensus prediction by residue-specific majority votes was derived for each sequence. The HrpE sequences were aligned by using the ClustalW website <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> with default parameters (57). This alignment was used to align the consensus secondary structure assignments, thus leading to a final consensus prediction for the HrpE protein family.

The promoter recognition program BPPROM (Softberry, Inc., Mt. Kisco, N.Y.) was used for prediction of bacterial sigma70 promoter motifs.

RESULTS

***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* produces type III-dependent surface appendages.** *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E was grown in *hrp*-inducing medium XVM2 (62). Electron microscopy of negatively stained bacteria revealed the appearance of pilus-like appendages of approximately 8 to 10 nm in diameter and up to more than 2 µm in length attached to the cell surface (Fig. 2A). The wild-type strains 85-10 and 75-3 also produced pili (data not shown). No pili were observed when 85E cells were grown in complex medium NYG, in which *hrp* gene expression is suppressed (55) (Fig. 2B). However, strain 85E*, which carries the constitutively active mutant form of the *hrp* regulator *hrpG*, also showed pili after growth in NYG (Fig. 2C). As *X. campestris* pv. *vesicatoria*

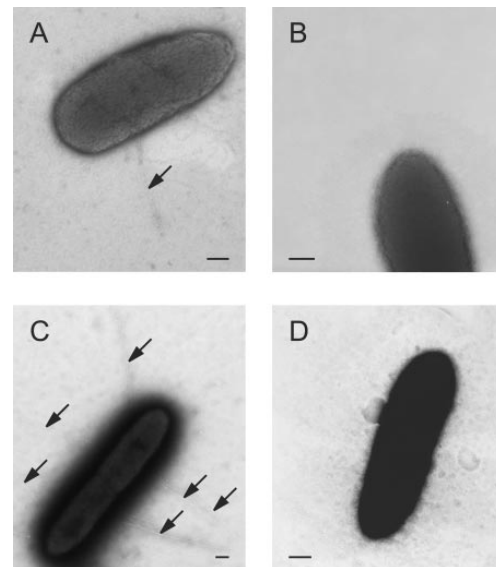


FIG. 2. Detection of Hrp pili at the surface of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Bacteria were incubated on coated gold grids for 6 h at 30°C. Transmission electron micrographs of negatively stained specimens are shown. Surface appendages with a diameter of 8 to 10 nm were observed only under *hrp*-inducing conditions: (A) growth of strain 85E in XVM2 medium; (C) presence of the HrpG* protein in strain 85E*. Neither the *hrpG* wild-type strain 85E grown in NYG medium (B) nor a TTS mutant (85E* Δ *hrcU*) (D) produced pili. Arrows indicate Hrp pili. Bars, 200 nm.

produces pilus-like appendages only under *hrp*-inducing conditions, we called them Hrp pili. The dimensions are comparable to those of Hrp pili from *P. syringae*, *R. solanacearum*, and *E. amylovora* (32, 49, 59). In contrast to findings with *R. solanacearum*, we did not observe a predominant appearance of pili in the polar region of the bacteria nor did we observe a bundling of detached pili. Up to 10 individual pili per cell were evenly distributed around the cell when strain 85E* was analyzed.

To assess whether formation of Hrp pili was dependent on the expression of other *hrp* genes, two *hrp* mutant strains were studied by electron microscopy. Neither the mutant 85E Δ AD, in which a 13-kb region comprising the operons *hrpA* to *hrpD* is deleted, nor the nonpolar *hrc* mutant 85E* Δ *hrcU* carried pili under any of the growth conditions tested (Fig. 2D and data not shown). Altogether, these data indicate that Hrp pilus formation requires an intact type III secretion system.

The HrpE protein is a major component of the Hrp pilus. To identify the protein components of the Hrp pili, they were purified from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E grown in XVM2 medium by deoxycholate solubilization and sucrose density gradient centrifugation. Proteins present in the pilus preparations were analyzed by Tricine SDS-PAGE. These preparations contained, as a major component, a series of small proteins with an apparent molecular mass below 10 kDa under denaturing conditions and variable amounts of other

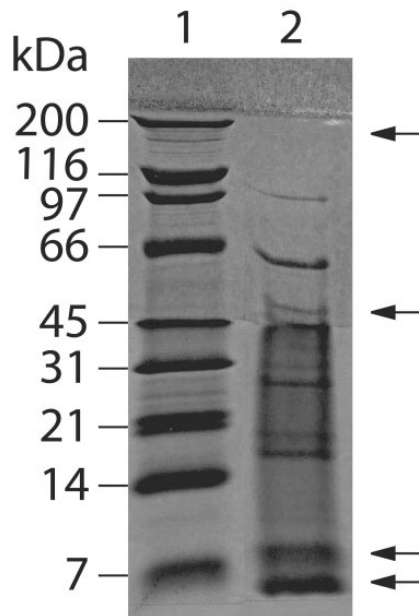


FIG. 3. Purification of Hrp pili. Pili were purified from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85E grown in XVM2 medium by deoxycholate solubilization and sucrose density gradient centrifugation. Proteins present in the pilus preparations were analyzed by Tricine SDS-PAGE. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, sample of Hrp pilus preparation. Arrows point to protein bands for which sequence information has been obtained.

proteins (Fig. 3). The small proteins were not detected in preparations of strain 85E grown in *hrp*-suppressing conditions and in the 85E Δ AD *hrp* mutant.

We attempted to obtain sequence information for the major proteins of the pilus preparation. The N-terminal sequence of a 200-kDa protein could not be resolved, but an internal sequence (QLDALAADVQT) was obtained and showed perfect identity to the outer membrane protein XadA from *X. campestris* pv. campestris (217 kDa) and *X. axonopodis* pv. citri (201 kDa) (17). An N-terminal sequence, LVPNDPFYA QYQXHLSNPNG, was obtained from the 45-kDa protein. It is 90% identical to an internal sequence of a putative extracellular serine protease from *X. campestris* pv. campestris and *X. axonopodis* pv. citri which is predicted to be processed to a mature protein of 47 kDa (17). Since the 200-kDa and 45-kDa proteins were also present in preparations of strain 85E Δ AD, they probably represent a contamination of the Hrp pilus preparation.

N-terminal sequencing of the small proteins generated the sequences MQIFPEVS, VSSWRSRV, and CFTGGLSNGI. All three sequences are present in the predicted *hrpE* gene product of *X. campestris* pv. vesicatoria (predicted molecular mass, 9.7 kDa) at amino acid positions 1 to 8, 7 to 14, and 20 to 29, respectively (47). The DNA sequence of *hrpE* has been determined previously (GenBank accession number AF056246),

but no functional studies of the HrpE protein have been performed yet. The fact that all predominant proteins in the pilus preparation correspond to the HrpE protein suggests that HrpE (or a fragment derived from HrpE) is the major Hrp pilus subunit. Possibly, N-terminally truncated fragments originated from proteolytic degradation during pilus preparation.

C termini of HrpE subunits may form core of the Hrp pilus. Comparisons of HrpE with the protein database did not reveal homologous sequences except for highly related proteins from other xanthomonads, i.e., *X. campestris* pv. campestris, *X. oryzae* pv. oryzae, *X. axonopodis* pv. citri, and *X. axonopodis* pv. glycines (Fig. 4). HrpE from *X. campestris* pv. campestris is less well conserved, as it lacks three amino acid residues at the N terminus and is only conserved at the very C terminus. Intriguingly, the last 24 amino acid residues of HrpE are 100% conserved in all five xanthomonads, suggesting that this region may be crucial for HrpE function (Fig. 4).

To elucidate possible structures of Hrp pilus subunits, secondary structure prediction algorithms were applied. Strikingly, the C-terminal half was predicted to contain several α -helices, whereas the N-terminal half was largely unstructured (Fig. 4). Although three helices were also predicted in the N-terminal half, their significance remains questionable, since they were not predicted for all HrpE proteins and their statistical significance is considerably lower than for the C-terminal helices (data not shown). Interestingly, the pattern of predicted secondary structure matches with the degree of sequence conservation along the polypeptide chains. From these analyses, we speculate that the C termini of HrpE subunits may form the core of the Hrp pilus.

Hrp pili are labeled by HrpE-specific antibodies. A polyclonal antiserum was produced against an N-terminally hexahistidine-tagged HrpE fusion protein. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 and the *hrpE* Δ 9-93 deletion mutant (see below and Materials and Methods) were analyzed for the production of HrpE-related proteins by Western blot analysis. Only in the wild type did we detect a protein of about 10 kDa in size which was missing in the *hrpE* deletion mutant (data not shown). No other protein was detected by the anti-HrpE antiserum, thus proving that the antiserum is monospecific.

To prove that HrpE is indeed the major pilus subunit, we used the anti-HrpE antiserum in immunoelectron microscopy. Strain 85E* was incubated on EM grids in XVM2 medium and subjected to immunogold labeling without prior fixation. Electron microscopy revealed that Hrp pili were heavily labeled by the HrpE-specific antiserum (Fig. 5A). Flagella, which were occasionally observed, were not labeled (Fig. 5A), thus proving specificity of the Hrp pilus labeling.

We also tested an anti-peptide antiserum which was raised against a conserved peptide segment at the C terminus (L₇₆NKFIGKAGDNAKQ₈₉). This antiserum was functional in Western blot analysis (data not shown). However, when this antiserum was used in immunoelectron microscopy, no labeling of Hrp pili was observed (data not shown). The epitope is probably masked in the native pilus structure, thus supporting the idea that the C terminus of HrpE may be involved in the polymerization process.

The *hrpE* promoter lies in the *hrpD* operon. The operon structure of the 23-kb *hrp* gene cluster has been deduced from complementation analyses (5) and DNA sequencing (21, 30,



FIG. 4. Multiple alignment and consensus secondary structure prediction of xanthomonad HrpE proteins. Five HrpE sequences from *X. campestris* pv. vesicatoria (*Xcv*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), and *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) were aligned by using the CLUSTAL X program (57) and subjected to secondary structure prediction (2D). Identical residues are shown in red, and similar residues are shown in blue. Predicted α -helical regions are indicated by a lowercase "h."

47). The *hrpE* gene is located downstream of *hrpD6* and upstream of *hpaB* (Fig. 1). A nonpolar deletion of 440 bp in *hrpD5* (735 bp upstream of the *hrpE* translation start codon) did not affect *hrpE* expression (30; Bonas, unpublished).

From promoter studies with *hrp::Tn3-gus* (β -glucuronidase) fusions, it was known that *hrpE* has a basal transcription level in complex medium which is up-regulated in XVM2 medium and in planta (61; K. Wengelnik and U. Bonas, unpublished data). The promoter regions of several plant-inducibile genes contain a conserved sequence motif, the PIP box (plant-inducibile promoter) (21, 29, 30, 47). Therefore, the region upstream of the translation start codon of *hrpE* was scrutinized for conserved sequence elements. No PIP boxes or canonical se-

quence elements of $\sigma 70$ -regulated promoters were found in a reasonable distance.

To define the transcriptional start site of *hrpE*, primer extension experiments were performed with oligonucleotide 144 or 145 (Fig. 6 and data not shown). Mapping of the strongest signal indicates that *hrpE* transcription starts at adenosine -101 (with respect to the *hrpE* translation start codon). As the translation stop codon of *hrpD6* is located 4 bp upstream of the *hrpE* transcriptional start site (30), the *hrpE* promoter resides in the *hrpD* operon.

Nonpolar mutants in *hrpE* do not produce Hrp pili and are defective in type III secretion. A nonpolar mutation in *hrpE* was constructed which carries an insertion of 15 nucleotides,

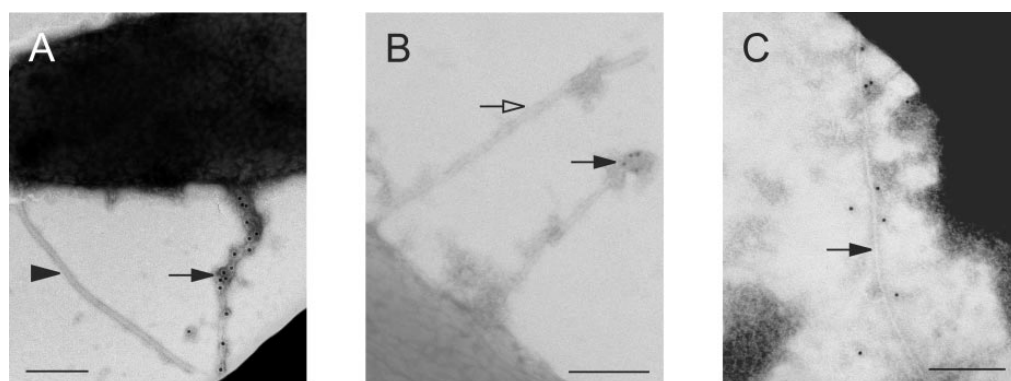


FIG. 5. Immunogold labeling of *X. campestris* pv. vesicatoria Hrp pili with anti-HrpE (A), anti-AvrBs3 (B), or anti-HrpF (C) antisera. Bacteria were incubated on EM grids for 6 h in minimal medium, followed by in situ immunogold labeling. The following strains were used for labeling of Hrp pili: 85E* (A and C) and 85* carrying the *avrBs3*-containing plasmid pDS300F (B). Filled arrows indicate labeled pili, open arrows indicate unlabeled pili, and an arrowhead points to a flagellum. Dark dots along or at Hrp pili are 10-nm-diameter gold particles. Bars, 200 nm.

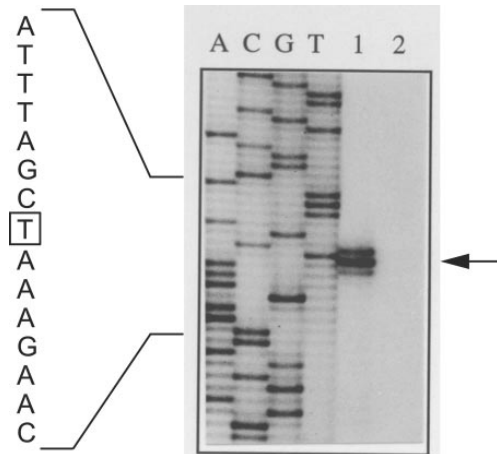


FIG. 6. Mapping of the transcriptional start site of *hrpE* by primer extension analysis. RNAs were extracted from strain 85E(pXV74) grown for 16 h in XVM2 (lane 1) and NYG (lane 2), annealed with oligonucleotide no. 144, and used as templates for reverse transcription. The nucleotide sequence is the reverse complement of the coding strand. The boxed nucleotide refers to the transcriptional start site which is indicated by an arrow.

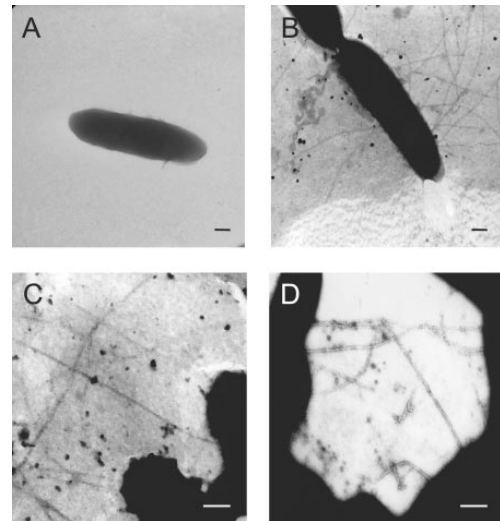


FIG. 8. Effects of *hrp* and *hpa* mutations on Hrp pilus assembly. Electron micrographs from 85E*-derived bacteria incubated in XVM2 medium are shown. Deletion mutants of *hrpF* (B), *hpaB* (C), and *hpaE* (D) produced pili, whereas the *hrpE*Δ9-93 mutant does not show any pili (A). Bars, 200 nm.

including a premature stop codon after codon 8 (*hrpE*Δ9-93). The mutation was introduced into *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85* and 85E* and resulted in an Hrp phenotype (Fig. 7 and data not shown). The *hrpE* mutants could be complemented by cosmid pXV9::*hpaB*-75 (5; Bonas, unpublished) which carries a transposon insertion in *hpaB*, the gene downstream of *hrpE* (Fig. 7 and data not shown). Electron microscopy analysis demonstrated that the *hrpE* mutant did not produce Hrp pili (Fig. 8A and data not shown).

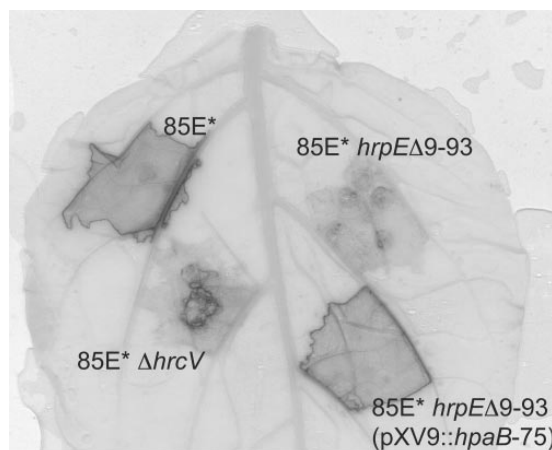


FIG. 7. Phenotype and complementation of an *hrpE* mutant. Bacteria at a concentration of about 2×10^8 CFU/ml were inoculated into a 5-week-old pepper leaf. After 2 days of cultivation, plant reactions were scored. A leaf after bleaching in ethanol is shown.

We then tested HrpE for protein secretion in a type III secretion in vitro assay. Western blot analysis of *X. campestris* pv. vesicatoria culture supernatants showed that the wild-type strain allowed detection of HrpE (Fig. 9), as expected. Next, we studied the effect of the *hrpE* mutation on type III protein secretion of other substrates. This analysis showed that only the *hrpE* wild-type strain allowed detection of HrpF, which is secreted by the TTS system (51), in culture supernatants (Fig. 9). This was confirmed by testing for secretion of the AvrBs1 protein, an effector that is translocated into the plant cell (19) (Fig. 9). These results demonstrate that *hrpE* is required not

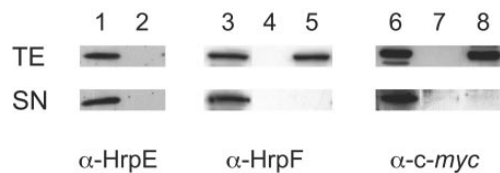


FIG. 9. Detection of HrpE protein in *X. campestris* pv. vesicatoria and effects of *hrpE* mutations on in vitro type III secretion. Immunoblotting analyses of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) of an *hrpE* wild-type strain (85E*) and an *hrpE*Δ9-93 mutant are shown. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The blots were probed with HrpE (lanes 1 and 2)-, HrpF (lanes 3 to 5)-, or c-myc (lanes 6 to 8)-specific antibodies, respectively. The anti-c-myc (α-c-myc) antibodies detect triple c-myc-tagged AvrBs1 molecules expressed from plasmid pDSM110. Lanes 1, 3, and 7, 85E*; lanes 2 and 5, 85E* *hrpE*Δ9-93; lane 4, 85E* Δ*hrpF*; lane 6, 85E*(pDSM110); lane 8, 85E* *hrpE*Δ9-93(pDSM110). α-HrpE, anti-HrpE; α-HrpF, anti-HrpF.

only for protein translocation into plant cells but also for protein secretion across the bacterial cell envelope.

AvrBs3 and HrpF are localized along the Hrp pilus. Recent data for Hrp pili from *P. syringae* suggest that the pili elongate at the tip and serve as conduits for type III-secreted proteins (31, 40). Although the number of pili produced by *X. campestris* pv. *vesicatoria* is much lower than for *P. syringae*, we tested bacteria grown on EM grids for secretion of AvrBs3, a well-studied type III effector from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Strain 85*(pDS300F), which expresses AvrBs3, was incubated on EM grids under secretion-permissive conditions (minimal medium A, pH 5.2) (52) and analyzed by electron microscopy. Immunogold labeling revealed the presence of AvrBs3 at more than 50% of the pili (one to five dots in a distance of 20 nm along the pilus) (Fig. 5B). This amount of labeling appears to be rather low, especially in comparison to labeling of harpin or pilus subunits in other plant pathogens (7, 28, 32, 40). However, there are at least 20 different effector proteins secreted by *X. campestris* pv. *vesicatoria* (19, 45, 47; Bonas et al., unpublished), which may lead to competition so that probably only a few AvrBs3 molecules are secreted via the Hrp pilus under our conditions. As a negative control, strain 85* without pDS300F was used (data not shown). In this case, of 150 randomly chosen pili, only four were labeled once and no pili were labeled by two or more dots.

The second type III-secreted protein that we analyzed was HrpF (10). While pili were clearly labeled by the HrpF-specific antiserum in the *hrpF* wild-type strain *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85E* (Fig. 5C), no labeling was observed in the case of the *hrpF* deletion mutant 85E* Δ *hrpF* (data not shown). These experiments suggest that type III-secreted proteins are in close vicinity to the Hrp pilus during and/or after their secretion.

Several genes in the *hrp* gene cluster are not required for assembly of Hrp pili. The mutant analysis (see above) suggested that Hrp pilus assembly depends on a functional TTS apparatus whose components are encoded within the *hrp* gene cluster. However, it was not known which genes are required for pilus assembly and whether *hpa* and other nonconserved *hrp* genes play a role. Although *hpa* genes are not essential for pathogenicity (30, 47; Bonas et al., unpublished), it is conceivable that Hpa proteins could modulate the assembly of Hrp pili with respect to their number, length, or other morphological and functional features. Therefore, nonpolar mutations were introduced into the genome of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E*. The following genes were tested: *hrcC*, *hrpB7*, *hrcL*, *hrpB4*, *hrcJ*, *hrpB2*, *hrpB1*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hpaA*, *hrcD*, *hrpD6*, *hpaB*, *hpaE*, and *hrpF* (see Materials and Methods for details). Electron microscopy revealed that all *hpa* mutants produced pili that were morphologically the same as those of the wild type (Fig. 8C and 8D). However, it appeared that the *hpaA* mutant produced significantly fewer pili. This is similar to observations of *R. solanacearum* (60). All *hrp* and *hrc* mutants, except for *hrpF*, failed to produce pili (Fig. 8B and data not shown). This finding is in agreement with the proposed role for HrpF. HrpF is part of the predicted type III translocon which inserts into the host cell plasma membrane (10). Therefore, HrpF acts downstream of HrpE during secretion and translocation of effector proteins. From this comprehensive analysis, we conclude that no other conserved Hrp or

Hrc protein acts downstream of HrpE during the translocation process.

DISCUSSION

In this study, we have shown that *X. campestris* pv. *vesicatoria* produces a novel surface appendage, the Hrp pilus, when bacteria are grown under conditions that mimic the in planta situation. This was achieved in vitro by growth of the bacteria in *hrp*-inducing medium or by use of an *hrpG** mutant which constitutively expresses the *hrpG* regulon. It is noteworthy to mention that no type IV fimbriae were observed under any of the growth conditions tested, although strain 85-10 was reported to carry a gene for type IV fimbriae (48). Altogether, these observations add another important plant pathogenic genus to the list of Hrp pilus-producing bacteria (32, 49, 59).

The *X. campestris* pv. *vesicatoria* Hrp pili have a diameter of about 8 to 10 nm and can reach more than 2 μ m in length. These dimensions are comparable to those of other Hrp pili, although the diameter appears to be slightly thicker than in the cases of *P. syringae* (6 to 8 nm), *R. solanacearum* (6.6 nm), and *E. amylovora* (8 nm) (32, 49, 59). Type III protein translocation serves to deliver proteins of bacterial origin across three membranes into the cytosol of eukaryotic host cells. In the case of plant pathogenic bacteria, however, membranes of both players cannot contact each other directly due to the plant cell wall, which is up to 500 nm thick. It is speculated that Hrp pili serve to bridge the distance between the bacterial cell surface and the plant cell plasma membrane, thus allowing directional protein transfer from the bacterium into the host cell cytosol (7, 28, 50).

The HrpE protein was identified as the major subunit of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* Hrp pilus. This conclusion was based on the following results. (i) The HrpE protein was the predominant component of pilus preparations, which were isolated according to a protocol previously used for the preparation of type IV pili from *E. coli* (48). In another study, HrpE was detected in supernatants of *hrp*-induced *X. oryzae* pv. *oryzae* but not in those of a type III secretion mutant, a finding that corroborates our hypothesis that HrpE is an extracellular entity (23). (ii) Hrp pili were heavily labeled by a monospecific anti-HrpE antiserum, as revealed by immunoelectron microscopy. (iii) Mutations in *hrpE* lead to loss of Hrp pili and can be complemented by an *hrpE*-containing cosmid. (iv) Based on sequence similarity and gene order (synteny), the *hrp* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria* is most closely related to that of *R. solanacearum*. The *hrpE* gene of *X. campestris* pv. *vesicatoria* is syntenic to *hrpY*, which encodes the major subunit of the Hrp pilus of *R. solanacearum* (59). (v) Although HrpE is not similar to other nonxanthomonad Hrp pilus subunits at the sequence level, it shares several characteristics with these proteins, i.e., it is small, predicted to be predominantly α -helical with the highest helical propensity at the C terminus, and unusually variable at the sequence level among several species and pathovars of the same genus (37).

Interestingly, the diameter of Hrp pili is similar to that of the needle structures which are present on top of the TTS systems of animal pathogens (3, 39, 56). TTS systems are evolutionary related to the flagellar systems (24, 53). The flagellar filament of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has an outer diameter of about 20 nm, forming a hollow cylinder which sup-

ports the internal transport of at least partially unfolded filament subunits and leads to growth at the tip (65). Collectively, the type III surface appendages are clearly thinner than the flagellar filament. So the question arises as to how protein translocation can occur through these appendages. X-ray fiber diffraction analysis and electron microscopy of the *Shigella* type III needle allowed the reconstruction of the needle structure with a resolution of 16 Å (12). Fitting of the protein subunits (MxiH) into the deduced structure revealed an internal diameter of about 20 Å, which is identical to the internal diameter of the flagellar filament (66). Such a canal would be large enough to accommodate partially unfolded proteins. The FliC flagellin is 494 amino acids long, and the flagellar hook protein FlgE is 402 amino acids long. Both proteins do not share sequence homology with MxiH (83 amino acids) or any other component of type III surface appendages (12). Nevertheless, it appears that these proteins are similar to each other at the structural level (predicted α -helices in common). It was therefore suggested that the small needle subunits may represent the minimum core required to build a supermolecular helical structure (12). The small size of the type III-dependent surface components appears to be a general phenomenon not only in animal pathogens (sizes ranging between 73 and 101 amino acids) but also in plant pathogens where the subunits of Hrp pili vary in size between 66 and 113 amino acids. Interestingly, rhizobial NopA proteins which may form type III-dependent pilus-like surface appendages in symbiotic bacteria are also small, ranging in size between 63 and 71 amino acids (38, 41). Moreover, Hrp pilus subunits appear to be mainly composed of α -helices (37). We therefore speculate that type III-dependent pili and needles share a common helical architecture and that both surface appendages form an internal canal of similar dimension. In line with this hypothesis, we showed by immunoelectron microscopy that two type III-secreted proteins (HrpF and AvrBs3) are in close contact with the Hrp pilus during and/or after their secretion. This finding fits nicely with the proposed role of Hrp pili to serve as conduits for the translocation of type III effector protein (26, 50). However, direct evidence for this possibility awaits experiments involving in situ immunogold labeling to visualize effector protein extrusion from the tips of the pili (31, 40).

From transcriptional β -glucuronidase fusions, it was known that *hrpE* has a basal transcription level in complex medium which is up-regulated in XVM2 minimal medium and in planta (61; Wengelnik and Bonas, unpublished). We therefore performed a comparative primer extension analysis and could identify the putative transcriptional start site of the messenger RNAs which are synthesized under *hrp*-inducing conditions. These data revealed that the corresponding *hrpE* promoter lies in the *hrpD* operon. However, we did not obtain another *hrp*-independent signal. Either the basal transcription level in complex medium is too low to be detected by our assay or the basal transcription starts from another promoter which is located considerably more upstream of *hrpE*. We could not identify any consensus promoter element upstream of the putative transcriptional start site. At present it is therefore unknown how *hrp*-dependent transcription of *hrpE* is achieved.

Mutant analyses demonstrated that Hrp pilus biogenesis depends on all *hrc* and *hrp* genes analyzed, except for *hrpF*, which encodes the type III-secreted translocon protein. We

found that *hpa* genes are dispensable for production of Hrp pili. However, *hpaA* had an influence on the number of Hrp pili produced, a finding that is similar to the situation in *R. solanacearum* (60). Absence of *hrpV*, the *hpaA* homolog of *R. solanacearum*, was also reported to result in fewer Hrp pili. A mutation in *hrpX*, which is the gene upstream of *hrpY* in *R. solanacearum*, resulted in loss of pili but still allowed export of the HrpY pilus subunit. We found that the syntenic gene in *X. campestris* pv. vesicatoria, *hrpD6*, is also required for pilus biogenesis. From these observations, we assume that the three genes upstream of *hrpE* (*hpaA-hrpD6*) may play a more specialized role in pilus assembly than the rest of the *hrp* gene cluster, which most probably encodes the core components of the TTS system.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hannelore Espenhahn for excellent technical assistance and Bianca Rosinsky for greenhouse work. We also thank Wiebke Streckel and Helmut Tschäpe for providing the polyclonal HrpE-specific antiserum. The assistance of Niina Järvinen and Nisse Kalkinen during preparation of Hrp pili and N-terminal protein sequencing is highly appreciated.

This work was funded in part by an ATIPE grant from CNRS to U.B. and by grants KO 1686/3-1 and /3-2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.K.

REFERENCES

1. Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe. 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **256**:11905–11910.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1996. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
3. Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, and P. Sansonetti. 1999. The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* **147**:683–693.
4. Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681–683.
5. Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:81–88.
6. Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **218**:127–136.
7. Brown, I. R., J. W. Mansfield, S. Taira, E. Roine, and M. Romantschuk. 2001. Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:394–404.
8. Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* **21**:5313–5322.
9. Büttner, D., D. Gürlebeck, L. Noël, and U. Bonas. 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**:755–768.
10. Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas. 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **184**:2389–2398.
11. Charkowski, A. O., H. C. Huang, and A. Collmer. 1997. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3866–3874.
12. Cordes, F. S., K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E. H. Egelman, A. Blocker, and S. M. Lea. 2003. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* **278**:17103–17107.
13. Cornelis, G. R. 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:742–752.
14. Cornelis, G. R. 2003. How Yops find their way out of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* **50**:1091–1094.
15. Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:735–774.

16. Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyk, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* 3:3323-3328.

17. da Silva, A. C. R., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, Jr., L. M. C. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. A. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. B. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. S. Ferreira, R. C. C. Ferreira, M. I. T. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, Jr., E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. M. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. M. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, Jr., A. Rossi, J. A. D. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. F. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. D. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.

18. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351.

19. Escobar, L., G. Van den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas. 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* 2:287-296.

20. Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas. 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:390-396.

21. Fenselau, S., and U. Bonas. 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:845-854.

22. Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.

23. Furutani, A., S. Tsuge, K. Ohnishi, Y. Hikichi, T. Oku, K. Tsuno, Y. Inoue, H. Ochiai, H. Kaku, and Y. Kubo. 2004. Evidence for HrpXo-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 186:1374-1380.

24. Gophna, U., E. Z. Ron, and D. Graur. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312:151-163.

25. Hacker, J., and J. B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641-679.

26. He, S. Y., and Q. Jin. 2003. The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:15-19.

27. Hotson, A., and M. B. Mudgett. 2004. Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:384-390.

28. Hu, W., J. Yuan, Q. L. Jin, P. Hart, and S. Y. He. 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:234-241.

29. Huguet, E., and U. Bonas. 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:488-498.

30. Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* 29:1379-1390.

31. Jin, Q., and S. Y. He. 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294:2556-2558.

32. Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones, and S. Y. He. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 40:1129-1139.

33. Jobling, M. G., and R. K. Holmes. 1990. Construction of vectors with the p15a replicon, kanamycin resistance, inducible *lacZ* alpha and pUC18 or pUC19 multiple cloning sites. *Nucleic Acids Res.* 18:5315-5316.

34. Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-141.

35. Klement, Z. 1982. Hypersensitivity, p. 149-177. *In* M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), *Phytopathogenic prokaryotes*, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y.

36. Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas. 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.* 173:7142-7150.

37. Koebnik, R. 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol.* 9:586-590.

38. Krishnan, H. B., J. Lorio, W. S. Kim, G. Jiang, K. Y. Kim, M. DeBoer, and S. G. Pueppke. 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific modulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:617-625.

39. Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280:602-605.

40. Li, C. M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk, and S. Taira. 2002. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J.* 21:1909-1915.

41. Marie, C., W. J. Deakin, V. Viprey, J. Kopcinska, W. Golinowski, H. B. Krishnan, X. Perret, and W. J. Broughton. 2003. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:743-751.

42. Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruyschaert, and G. R. Cornelis. 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect. Immun.* 58:2840-2849.

43. Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearney, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:41-47.

44. Nguyen, L., I. T. Paulsen, J. Tchieu, C. J. Hueck, and M. H. Saier, Jr. 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:125-144.

45. Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 185:7092-7102.

46. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* 41:1271-1281.

47. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, D., and U. Bonas. 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* 184:1340-1348.

48. Ojajnen-Reuhs, T., N. Kalkkinen, B. Westerlund-Wikstrom, J. van Doorn, K. Haahela, E. L. Nurmiaho-Lassila, K. Wengelnik, U. Bonas, and T. K. Korhonen. 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 179:1280-1290.

49. Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He. 1997. Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3459-3464.

50. Romantschuk, M., E. Roine, and S. Taira. 2001. Hrp pilus: reaching through the plant cell wall. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:153-160.

51. Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* 38:828-838.

52. Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas. 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9368-9373.

53. Saier, M. H., Jr. 2004. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol.* 12:113-115.

54. Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.

55. Schulte, R., and U. Bonas. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* 174:815-823.

56. Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sakakawa, and A. Abe. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11638-11643.

57. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

58. Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 87:1307-1316.

59. Van Gijsegem, F., J. Vasse, J. C. Camus, M. Marena, and C. Boucher. 2000. *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* 36:249-260.

60. Van Gijsegem, F., J. Vasse, R. De Rycke, P. Castello, and C. Boucher. 2002. Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* 44:935-946.

61. Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 178:3462-3469.

62. **Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas.** 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* **178**:1061–1069.
63. **Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas.** 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* **181**:6828–6831.
64. **Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:704–712.
65. **Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, and K. Namba.** 2000. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**:2148–2152.
66. **Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba.** 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**:643–650.

2.2.2 Ergänzende Ergebnisse

2.2.2.1 Kontrolle der HrpE-Expression

Die im vorangegangenen Artikel vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass alle *hrp*-Mutanten mit Ausnahme von HrpF einen Defekt in der Hrp-Pilus Bildung aufweisen. Dieser Defekt könnte auf ein allgemeines Sekretionsdefizit oder aber auf einen Defekt in der Assemblierung des Hrp-Pilus zurückzuführen sein. Erfolgt keine Assemblierung des Hrp-Pilins HrpE, könnten keine Hrp-Pili detektierbar werden, obwohl die Sekretion von HrpE nicht beeinträchtigt ist. Um diese beiden Möglichkeiten zu prüfen, wurden eine Reihe von Mutanten innerhalb des *hrp*-Genclusters einem Sekretionstest unterzogen (Abb. 8A und nicht gezeigt). Der Sekretionstest erfolgte hierbei im Stamm 85E*, der eine mutierte Variante des Regulators *hrpG* (*hrpG**) exprimiert. Dies führt zu einer konstitutiven Expression der *hrp*-Gene (218).

Die bakteriellen Zellen wurden in Minimalmedium A mit einem pH-Wert von 5,2 inkubiert (MA 5,2). *X. campestris* pv. *vesicatoria* sekretiert in saurem Minimalmedium A, welches vermutlich die Bedingungen im pflanzlichen Apoplasten simuliert, Typ-III-Substrate, während bei einem neutralen pH-Wert des Mediums keine Sekretion nachweisbar ist (171).

In den Kulturüberständen der Stämme 85E* Δ *hpaB*, 85E* Δ *hpaC*, 85E* Δ *hpaE* und 85E* Δ *hrpF* konnte HrpE detektiert werden, wohingegen bei den Stämmen 85E* Δ *hrcC*, 85E* Δ *hrpB2*, 85E* Δ *hrcV*, 85E* Δ *hpaA*, 85E* Δ *hrcD* und 85E* Δ *hrpD6* HrpE nicht im Überstand detektierbar war. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in allen Stämmen, die keinen Hrp-Pilus bilden, die Sekretion von HrpE beeinträchtigt ist. Mutanten, die HrpE noch sekretieren können, aber bei denen die Assemblierung des Hrp-Pilus gestört ist, konnten nicht identifiziert werden. Interessanterweise konnten bei dem Stamm 85E* Δ *hpaA* Hrp-Pili beobachtet werden, obwohl HrpE nicht im Überstand nachgewiesen wurde. Jedoch war die Anzahl der Hrp-Pili im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Somit ist eine Sekretion von HrpE wahrscheinlich, allerdings liegt die Menge vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

Überraschenderweise kann in den untersuchten sekretionsdefizienten Stämmen HrpE weder im Kulturüberstand noch im Totalextrakt detektiert werden (Abb. 8A und nicht gezeigt). HrpE stellt damit das erste Typ-III-abhängig sekretierte Protein von *X. campestris* pv. *vesicatoria* dar, dessen Stabilität in *hrp*-Mutanten beeinträchtigt ist (36, 171, 172). Diese destabilisierende Wirkung steht somit vermutlich nicht im Zusammenhang mit ei-

ner einzigen Komponente des Hrp-Operons, sondern ist auf die Sekretionskompetenz im Allgemeinen zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die starke Abhängigkeit der Hrp-Sekretion von den Mediumbedingungen bestärkt. Die Stämme 85E* und 85E* Δ hrpE wurden in MA-Medium mit einem pH-Wert von 5,2 (Sekretionsmedium) oder einem pH-Wert von 7,0 inkubiert (Abb. 8B). Wie in Abbildung 8B gezeigt, konnte bereits die Expression von HrpE ausschließlich unter Sekretionsbedingungen nachgewiesen werden, während bei pH 7,0 HrpE nicht detektiert werden konnte.

Trotz der in den verwendeten Stämmen kodierten HrpG-Variante HrpG*, die eine konstitutive Transkription der *hrp*-Gene gewährleistet, sollte ein möglicher Einfluss des niedrigen pH-Wertes auf die Aktivität des *hrpE*-Promotors untersucht werden. Hierzu wurden die Stämme 85E* pL3-AvrBs3::61 und 85E* pXV4::E525 in MA-Medium mit pH-Werten von 5,2 und 7,0 inkubiert. Da der Effektor AvrBs3 nicht mit dem TTS-System von *X. campestris* pv. vesicatoria koreguliert wird, sollte das Plasmid pL3-AvrBs3::61, das für eine Tn3-*gus* Insertion in dem Effektor AvrBs3 kodiert, als Kontrolle für einen unspezifischen Einfluss des niedrigen pH-Wertes auf die Transkriptionsaktivität dienen (109). Interessanterweise lysierte der Stamm 85E*pXV4::E525 in MA 5,2, so dass keine Aussage über einen die Transkription fördernden Einfluss des niedrigen pH-Wertes auf den *hrpE* Promotor getroffen werden konnten.

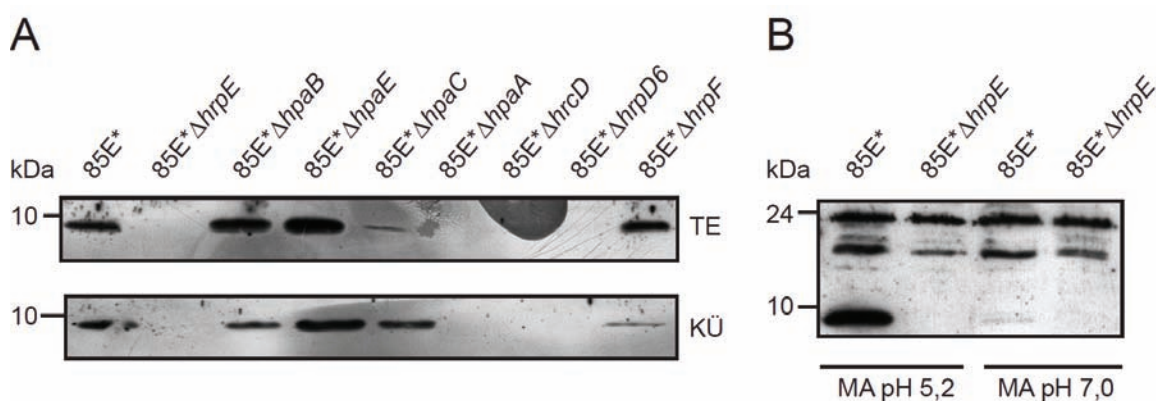


Abbildung 8: Analyse der Expression von HrpE.

(A) Die gezeigten *X. campestris* pv. vesicatoria-Stämme wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gleiche Proteinmengen von Totalextrakten (TE) und Kulturüberständen (KÜ) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalysen unter Verwendung des HrpE-spezifischen Antiserums analysiert. (B) Die Stämme 85E* und 85E* Δ hrpE wurden in Minimalmedium mit einem pH-Wert von 5,2 (Sekretionsmedium) und in Minimalmedium mit einem pH-Wert von 7,0 inkubiert. Gleiche Proteinmengen der Totalextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalysen unter Verwendung des HrpE-spezifischen Antiserums analysiert.

2.2.2.2 Einfluss einer *hrpE*-Mutante auf die Aktivität von *hrp*-Promotoren

HrpE ist eine essenzielle Komponente sowie auch ein Substrat des TTS-Systems. Die Sekretion von HrpE könnte den vollständigen und sekretionskompetenten Aufbau des TTS-System signalisieren, womit HrpE eine mögliche regulatorische Komponente des TTS-Systems darstellt. Die mögliche Rolle von *hrpE* in der Regulation der *hrp*-Gene wurde mit Hilfe von Reporterplasmiden untersucht, in denen die Promotoren der *hrp*-Gene transkriptional mit dem *uidA*-Gen, welches die β -Glucuronidase (GUS) kodiert, fusioniert wurden. Die Aktivität der β -Glucuronidase wird durch die Spaltung der β -glykosidischen Bindung des Substrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid nachgewiesen. Das hierbei freigesetzte fluoreszierende 4-Methylumbelliferon kann photometrisch bestimmt werden (96).

Die Reporterplasmide die das *uidA*-Gen unter der Kontrolle der *hrpA* (pPA2), *hrpB* (pPB1), *hrpC* (pPC490), *hrpD* (pPD3), *hrpF* (pPF142), *hrpX* (pPX2) und *hrpG* (pPG1)-Promotoren exprimieren, wurden in die Stämme 85-10 und 85-10 Δ *hrpE* konjugiert (218). Die Aktivität des *hrpE* Promotors wurde mittels des Cosmids pXV4::E525, welches eine Tn3-*gus* Insertion in *hrpE* enthält, analysiert (215). Die Bestimmung der GUS-Aktivitäten der Transkonjuganten erfolgte nach 16 stündigem Wachstum in nicht-induzierendem NYG-Medium (Abb. 9A). Im Gegensatz zu allen anderen *hrp*-Genen, deren Expression in NYG-Medium reprimiert ist und in der Pflanze oder XVM2-Medium induziert wird, zeigen *hrpE* und *hrpG* bereits eine basale Expression in NYG (215) (Abb. 9A). Die von den *hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE*, *hrpF* und *hrpX*-Promotoren vermittelten GUS-Aktivitäten, waren für den Wildtyp 85-10 und die korrespondierende *hrpE*-Mutante in NYG nahezu identisch. Der *hrpG*-Promotor ist in 85-10 Δ *hrpE* im Vergleich zu 85-10 um den Faktor 1,8 induziert. In vier unabhängigen Experimenten variierte diese Induktion zwischen 1,5 und 2,5fach. Damit besitzt *hrpE* unter nicht-induzierenden Bedingungen einen leicht reprimierenden Effekt auf den *hrpG*-Promotor.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob dieser reprimierende Einfluss von *hrpE* auf den *hrpG*-Promotor auch unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen besteht. Hierzu wurden die Stämme 85-10 und 85-10 Δ *hrpE* mit den Reporterplasmiden pPG1 und pPX2 für 16 Stunden in XVM2 angezogen (Abb. 10B). Beide Promotoren werden im Vergleich zum Wachstum in NYG in XVM2 induziert. Der reprimierende Einfluss von *hrpE* auf den *hrpG*-Promotor besteht demnach unter diesen Kulturbedingungen nicht.

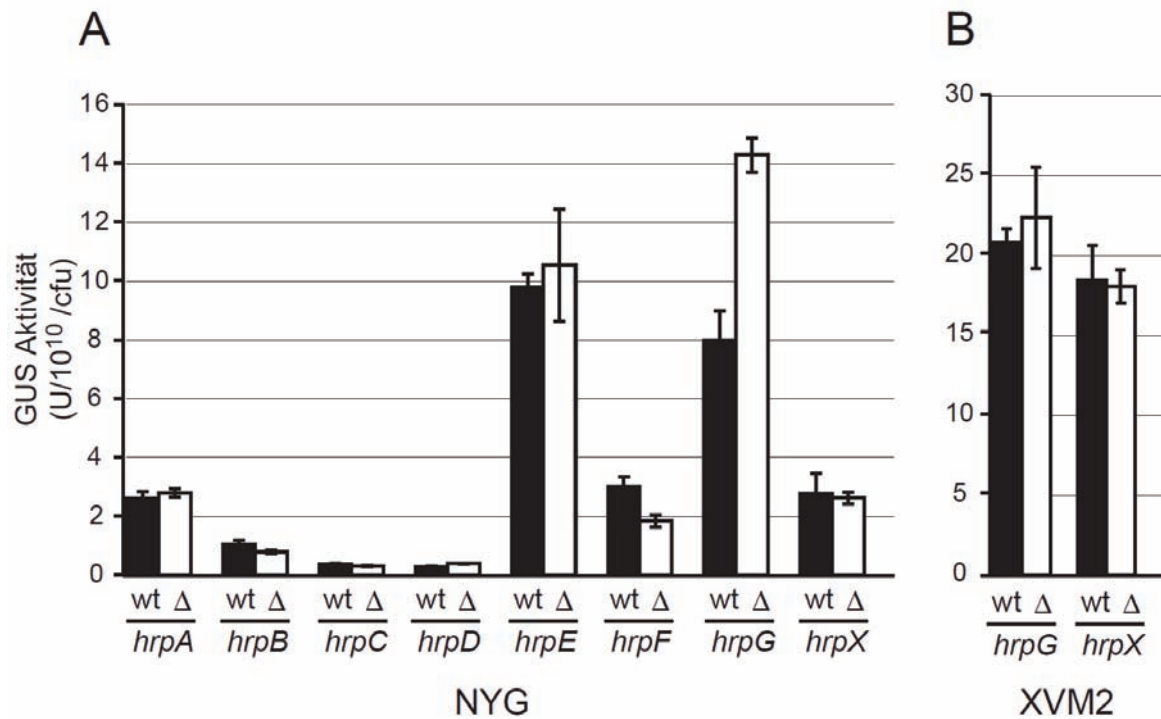


Abbildung 9: Der Einfluss von *hrpE* auf die Aktivität der *hrp*-Promotoren.

(A) Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 mit den Reporterplasmiden pPA2, pPB1, pPC490, pPD3, pXV4::E525, pPF142, pPG1 und pPX2 wurden 16 Stunden in NYG-Medium angezogen. Die gemessenen GUS-Aktivitäten sind für 85-10 (wt) als schwarze Säulen und für 85-10Δ*hrpE* (Δ) als weiße Säulen dargestellt. (B) Die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85-10 und 85-10Δ*hrpE* mit den Reporterplasmiden pPG1 und pPX2 wurden in XVM2-Medium angezogen. Die gezeigten GUS-Aktivitäten stellen den Durchschnitt von vier Proben dar. Eine Unit (U) GUS-Aktivität ist definiert als die Bildung von 1 nmol 4-Methylumbelliferon je Minute und Bakterium.

2.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse in der vorangegangenen Arbeit zeigen, dass *X. campestris* pv. *vesicatoria* unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen filamentartige Oberflächenstrukturen mit einem Durchmesser von 8-10 nm und einer Länge von mehreren Mikrometern bildet. Die N-terminale Sequenzierung der Hauptkomponente im Kulturüberstand und die nachfolgende Immunmarkierung mit einem gegen diese Komponente generierten Antikörper zeigten, dass HrpE die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus darstellt. Sequenzhomologe können ausschließlich in anderen Xanthomonaden gefunden werden, wobei *hrpE* synthenisch zu *hrpY*, der Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus des Pflanzenpathogens *R. solanacearum* ist. Bioinformatische Analysen deuten darauf hin, dass alle Hrp-Pilus-Untereinheiten Gram-negativer Pflanzenpathogene über eine ähnliche strukturelle Organisation, wie z. B. eine α -helikale Sekundärstruktur verfügen. Die Analyse einer nicht-polaren *hrpE*-Mutante bestätigte, dass *hrpE* für die Interaktion mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen essenziell ist. Weiterhin zeigten *in vitro* Sekretionsanalysen, dass *hrpE* für die Sekretion Typ-III-abhängiger Substrate unabdingbar ist. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen verdeutlichten, dass die TTS-abhängig sekretierten Substrate AvrBs3 und HrpF während des Transportprozesses in unmittelbarer Nähe des Hrp-Pilus lokalisiert sind. Eine systematische Analyse nicht-polarer *hrc*-, *hrp*- und *hpa*-Mutanten zeigte, dass außer den Hpa-Proteinen und der Translokon Komponente HrpF alle weiteren untersuchten Hrc- und Hrp-Proteine für die Hrp-Pilus Bildung essenziell sind. Weiterhin üben die Deletionsmutanten in den untersuchten *hrc*- und *hrp*-Genen einen negativen Einfluss auf die Stabilität bzw. Expression von HrpE aus. Die Analyse von *hrp*-Promotor-GUS-Fusionen zeigte, dass *hrpE* unter nicht-induzierenden Bedingungen einen leicht reprimierenden Einfluss auf den *hrpG* Promotor besitzt, der jedoch unter induzierenden Bedingungen aufgehoben wird.

2.3 Analyse der Domänenstruktur der Hrp-Pilus Untereinheit HrpE von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

2.3.1 Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Sept. 2005, p. 6175–6186
 0021-9193/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.187.17.6175–6186.2005
 Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 187, No. 17

Domain Structure of HrpE, the Hrp Pilus Subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Ernst Weber and Ralf Koenig*

Institute of Genetics, Martin Luther University, D-06120 Halle, Germany

Received 12 April 2005/Accepted 9 June 2005

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* possesses a type III secretion (TTS) system necessary for pathogenicity in susceptible hosts and induction of the hypersensitive response in resistant plants. This specialized protein transport system is encoded by a 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster. *X. campestris* pv. *vesicatoria* produces filamentous structures, Hrp pili, at the cell surface under *hrp*-inducing conditions. The Hrp pilus acts as a cell surface appendage of the TTS system and serves as a conduit for the transfer of bacterial effector proteins into the plant cell cytosol. The major pilus component, the HrpE pilin, is unique to xanthomonads and is encoded within the *hrp* gene cluster. In this study, functional domains of HrpE were mapped by linker-scanning mutagenesis and by reporter protein fusions to an N-terminally truncated avirulence protein (AvrBs3Δ2). Thirteen five-amino-acid peptide insertion mutants were obtained and could be grouped into six phenotypic classes. Three permissive mutations were mapped in the N-terminal half of HrpE, which is weakly conserved within the HrpE protein family. Four dominant-negative peptide insertions in the strongly conserved C-terminal region suggest that this domain is critical for oligomerization of the pilus subunits. Reporter protein fusions revealed that the N-terminal 17 amino acid residues act as an efficient TTS signal. From these results, we postulate a three-domain structure of HrpE with an N-terminal secretion signal, a surface-exposed variable region of the N-terminal half, and a C-terminal polymerization domain. Comparisons with a mutant study of HrpA, the Hrp pilin from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, and hydrophobicity plot analyses of several nonhomologous Hrp pilins suggest a common architecture of Hrp pilins of different plant-pathogenic bacteria.

Many gram-negative bacterial pathogens, including *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, possess a unique protein transport system called the type III secretion (TTS) system which transfers so-called effector proteins directly into the host cell. In plant bacterial pathogens, genes encoding the TTS system are referred to as hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) genes because mutations in these genes abolish induction of the hypersensitive response in resistant host plants and pathogenicity in host plants (36).

In *X. campestris* pv. *vesicatoria*, the *hrp* gene cluster is located in a 23-kb chromosomal region and is organized into six operons, designated *hrpA* to *hrpF* (6, 17, 18, 24, 25, 48, 58). Twenty-two genes are encoded within the *hrp* gene cluster, 11 of which are highly conserved among plant and animal pathogens and therefore have been renamed *hrc* (*hrp* conserved) genes (5, 56). Eight *hrc* gene products are associated with bacterial membranes and build up a transenvelope multiprotein complex (21). The remaining three proteins localize in the cytoplasm and are probably involved in energizing the transport process (20, 44). The role of the nonconserved *hrp* and *hpa* (*hrp*-associated) genes is less well understood. Two proteins, HrpE and HrpF, are substrates of the TTS system and serve in the delivery of type III effector proteins to and across the plant cell plasma membrane (8, 48, 56). Since these proteins are not translocated into the plant cell, they are referred to as noneffectors (9). Translocation of noneffectors is presum-

ably inhibited by HpaB, an export control protein. While in the wild type noneffectors, such as HrpF and XopA, are not translocated into the plant cell, they are translocated in an *hpaB* mutant, as indicated by reporter protein fusions (9).

hrp gene expression is activated in planta by two regulatory genes, *hrpG* and *hrpX* (50). HrpG is a member of the OmpR family of two-component response regulators and controls, in most cases via the AraC-type regulator HrpX, a large regulon including genes for type III effector proteins (42, 57, 59).

These effector proteins presumably interfere with the metabolic pathways of the host, providing an advantage for the pathogen, or suppress the plant defense reaction (54). Some of these effectors are recognized in resistant plants by corresponding *R* gene products, triggering a defense response called the hypersensitive response, which ultimately restricts bacterial growth. They were therefore designated avirulence (Avr) proteins (60). AvrBs3 is the best-characterized avirulence protein of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and serves as a well-established reporter for both secretion into the extracellular environment and translocation into plant cells (41).

In contrast to animal-pathogenic bacteria, plant-pathogenic bacteria have to overcome the plant cell wall for translocation of effector proteins. In order to fulfill this task, plant pathogens assemble a surface appendage, named the Hrp pilus. Hrp-dependent pili have been described in several plant-pathogenic or symbiotic bacteria that also contain a TTS system: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, and *Sinorhizobium fredii* (28, 32, 46, 55). The Hrp pilus elongates by the addition of Hrp pilin subunits at the distal end, and also TTS system substrates are secreted only from the pilus tip (27, 35). These results indicate that the Hrp

* Corresponding author. Mailing address: Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, D-06120 Halle (Saale), Germany. Phone: 49-345-5526293. Fax: 49-345-5527151. E-mail: koenig@gmx.de.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>X. campestris</i> pv. vesicatoria		
85E*	<i>eps</i> ::Tn3- <i>gus</i> insertion mutant of 85-10; <i>hrp</i> ⁺ Rif ^r Km ^r ; carrying <i>hrpG</i> * leading to constitutive <i>hrp</i> gene expression	59
85E*Δ <i>hrpF</i>	<i>hrpF</i> deletion mutant of 85E*; Rif ^r Km ^r	56
85E*Δ <i>hrcV</i>	<i>hrcV</i> deletion mutant of 85E*; Rif ^r Km ^r	56
85E*Δ <i>hrpE</i> Δ9-93	<i>hrpE</i> deletion mutant of 85E*; Rif ^r Km ^r	56
85E*Δ <i>hrpF</i> <i>hrpE</i> (Q56)	85E*Δ <i>hrpF</i> ; derivative carries <i>hrpE</i> (Q56)	This study
85E*Δ <i>hrcV</i> <i>hrpE</i> (Q56)	85E*Δ <i>hrcV</i> ; derivative carries <i>hrpE</i> (Q56)	This study
<i>E. coli</i>		
DH10b	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>endA1 recA1 deoR araΔ139</i> Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>nupG rpsL</i> (Sm ^r)	Invitrogen, Carlsbad, CA
DH5α <i>λpir</i>	F ⁻ φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15(<i>λpir</i>) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 deoR hsdR17</i> (τ _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> Nal ^r ; host for propagation of pOK derivatives	38
Plasmids		
pOK1	Suicide vector; <i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i> ; Spc ^r	25
pXV9	pLAFR3 <i>hrcC</i> to <i>hrpE</i> clone from <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria 75-3; Tc ^r	56
pRK2013	Helper plasmid for triparental matings; <i>traRK</i> ⁺ Mob ⁺ Km ^r	19
pDSM110	pDSK604 expressing a c-myc-tagged version of AvrBs1 from its own promoter; Spc ^r	16
pOK- <i>hrpE</i>	Wild-type <i>hrpE</i> in pOK1	56
pENTR/D-TOPO	Cloning vector; <i>attL</i> recombination sites; pUC- <i>ori</i> ; Km ^r	Invitrogen, Carlsbad, CA
pL6GW356	pLAFR6 derivative containing Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA) <i>attR</i> reading frame B cassette; Cm ^r Spc ^r	41
pGPS5	Transprimer donor; Km ^r Ap ^r	New England Biolabs, Beverly, MA
pL6HrpE _n -AvrBs3Δ2	pLAFR6 expressing a fusion protein between the N-terminal n amino acids of HrpE and AvrBs3Δ2 under control of the <i>hrpE</i> promoter	This study

pilus serves as a conduit through which substrates are transported. In all cases, the Hrp pilus subunits are small (6 to 11 kDa) and hypervariable, not only between different species, but also between pathovars. The best-characterized Hrp pilus subunit so far, the Hrp pilin HrpA from *P. syringae* pv. tomato, shares only 27% protein sequence identity with HrpA of *P. syringae* pv. *syringae* (14).

Based on preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, immunoelectron microscopy, and mutational analyses, HrpE was identified as the structural component of the Hrp pilus from *X. campestris* pv. vesicatoria (56). *hrpE* is unique to the genus of *Xanthomonas* and shows no sequence similarity to other pilin genes. Bacteria carrying mutations in the *hrpE* gene neither cause disease in susceptible host plants nor elicit the hypersensitive response in resistant host plants. Additionally, HrpE has been shown to be essential for the type III-dependent secretion of proteins such as HrpF, AvrBs1, and AvrBs3. Hence, the Hrp pilus is an indispensable component of a functional TTS system. The 9-kDa HrpE protein forms a slender pilus 8 to 10 nm in diameter and up to 4 μm in length (56).

The present study reports on the domain structure of HrpE as revealed by linker-scanning mutagenesis and reporter protein fusions. The linker-scanning mutants contain pentapeptides inserted randomly within the polypeptide chain. Previous studies using this technique yielded significant structure-function information (3, 11, 53). Several phenotypic classes of mutants were obtained and characterized in detail. By means of

reporter protein fusions, we identify a signal for type III secretion but not for translocation into plant cells. From these results, a three-domain structure of HrpE is predicted. Hydrophobicity plot analyses of several Hrp pilin proteins, such as HrpE, HrpA, and HrpY from *R. solanacearum*, reveal a common domain organization. These findings strongly suggest that plant-pathogenic bacteria, challenged with the task of overcoming the barrier of a plant cell wall, independently evolved structurally similar proteins.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Since the wild-type strain *X. campestris* pv. vesicatoria 85-10 produces large amounts of exopolysaccharides, which were suspected to affect electron microscopic (EM) analyses, the exopolysaccharide-negative strain 85E was used for most analyses. Plasmids were introduced into *Escherichia coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. vesicatoria by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (15, 19). *E. coli* cells were cultivated at 37°C in LB medium, and *X. campestris* pv. vesicatoria strains were grown at 30°C in NYG broth (13), on NYG 1.5% agar, in XVM2 minimal medium (57), or in MA secretion medium (49). Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: kanamycin, 25 μg/ml; tetracycline, 10 μg/ml; rifampin, 100 μg/ml; spectinomycin, 100 μg/ml.

Plant material and plant inoculations. Pepper cultivar ECW and the near-isogenic lines ECW-10R and ECW-30R, carrying the resistance genes *Bsl* and *Bs3*, respectively, have been described previously (39). Inoculation of and reisolation of bacteria from plant tissue were performed as previously described (6). If not indicated otherwise, 8-week-old pepper plants were used.

Construction of the *hrpE* linker-scanning library. The GPS-LS mutagenesis kit was used to perform linker-scanning mutagenesis of the *hrpE* gene according

to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Beverly, MA). Briefly, the mobilizable suicide vector pOK-*hrpE* (containing *hrcD* to *hpaE*) was used as the target DNA for mutagenesis. In an in vitro reaction including a transposon donor plasmid, the target DNA, and the transposase, the transposase excises the transposon from the donor and inserts it into the target DNA. Five base pairs of the target sequence are duplicated by the process. The insertions are expected to occur randomly. *E. coli* DH5 α *lambda* pir cells were transformed with 2 μ l of the in vitro transposition reaction mixture. Transformants were selected for spectinomycin resistance of the vector and kanamycin resistance of the pGPS5 transposon. Insertions in *hrpE* were mapped by colony PCR using a transposon border primer contributed by the manufacturer and the vector-specific primer *hrpE*(-200) (5'-G CATGAGCTCGAAATCCCAAGCACATGACATCCCTGC). To determine the exact insertion site, positive clones were sequenced using the transposon border primer. Transposon sequences were removed from selected clones by restriction digestion with PmeI and religation, resulting in a 15-bp insertion, leading to either an insertion of five amino acids (in two of three reading frames) or a TAA stop codon (in the remaining frame).

Generation of chromosomal *hrpE* peptide insertion mutants. The chromosomal wild-type copy of *hrpE* was replaced with mutant versions by two consecutive crossover events as described previously (29). For all strains, the replacement was confirmed by colony PCR spanning the *hrpE* region, followed by PmeI restriction analysis.

Construction of HrpE-AvrBs3 Δ 2 fusion proteins. To create protein fusions of HrpE with the reporter protein AvrBs3 Δ 2, plasmid pL6GW356 (41) containing the Gateway *attR* reading frame B cassette (Invitrogen, Carlsbad, CA) in front of *avrBs3 Δ 2* was used. DNA regions starting 2.5 kb upstream of *hrpE* and containing different N-terminal regions of *hrpE* were PCR amplified from genomic DNA of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85E* and cloned into the entry vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primer sequences are available upon request. The entry clones were then recombined with the destination vector pL6GW356, thus creating the expression clones pL6HrpE₁₀AvrBs3 Δ 2, pL6HrpE₁₇AvrBs3 Δ 2, pL6HrpE₁₉AvrBs3 Δ 2, pL6HrpE₂₃AvrBs3 Δ 2, pL6HrpE₄₂AvrBs3 Δ 2, pL6HrpE₅₀AvrBs3 Δ 2, and pL6HrpE₉₃AvrBs3 Δ 2. Constructs were conjugated into strains 85E*, 85E* Δ *hpaB*, and 85E* Δ *hrcV* by triparental matings as previously described (15).

Protein secretion experiments and immunoblot analyses. In vitro secretion experiments were performed as described previously (49). Western blots were incubated with polyclonal antiserum against HrpF (diluted 1:50,000) (10), a polyclonal antiserum against AvrBs3 (diluted 1:1,000) (30), or a monoclonal anti-c-myc antiserum (diluted 1:1,000) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), which was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech). The membranes were reprobed with an antibody against the intracellular protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred (49).

EM techniques. For electron microscopy analysis, bacteria were incubated on EM grids according to a slightly modified protocol (7). Bacterial cultures were grown for 24 h in NYG medium at 30°C. Bacteria were washed twice with 1 mM MgCl₂ and resuspended in minimal medium. The bacteria were adjusted to an optical density at 600 nm of 0.02, and a 15- μ l droplet was applied to a 300-mesh gold EM grid (Sigma, Taufkirchen, Germany) coated with 1% Formvar (polyvinyl 1595E; Serva, Heidelberg, Germany). To avoid evaporation, the grids were placed in a 9-cm petri dish containing wet filter paper which was sealed with Parafilm. Grids were incubated for 6 h in a growth chamber at 30°C before bacteria and pili were fixed by transferring the grid twice into a 20- μ l drop of 2% formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 20 min. Specimens were then negatively stained for 10 s in 2% phosphotungstic acid and air dried before examination on an EM 900 electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at an operating voltage of 80 kV.

Bioinformatic analyses. Pairwise BLAST comparisons were performed at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/bl2.html>). Hydrophobicity profiles and aliphatic and instability indices were calculated with the ProtScale and the ProtParam tool, respectively, available on the ExPASy proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.expasy.org/>).

RESULTS

Peptide insertion mutagenesis and initial screening of the mutants. To elucidate the domain structure of HrpE, we created a mutant collection containing pentapeptide insertions. A 2.3-kb region harboring *hrcD* to *hpaE*, including *hrpE*, was

cloned into the vector pOK. In vitro transposition mutagenesis was accomplished with the GPS-LS kit, which employs a Tn7-derived minitransposon carrying a selectable marker with modified inverted repeats at the ends harboring PmeI restriction sites (4). As a result, 5 bp of the target sequence are duplicated. Insertions were expected to occur randomly. After transformation of the transposition reaction mixture into *E. coli*, transformants were selected for the resistance markers of the target DNA and the transposon. The location of the transposon insertion was mapped by PCR and DNA sequencing. Restriction digestion of appropriate derivatives and recircularization led to insertion of 15 bp into the target DNA, either coding for five amino acids residues or creating a stop codon.

The *hrpE*-containing plasmid pOK-*hrpE* was mutagenized in two independent transposition reactions. In total, 5,000 clones were initially screened by PCR and 59 of those had an insertion in the *hrpE* region. DNA sequencing revealed that 34 insertions (including 10 siblings) were located in the coding sequence of *hrpE*. A premature stop codon was identified in 11 clones. In-frame insertions were found at 13 different positions in the *hrpE* gene. To avoid multicopy effects of these variants, they were introduced into the genomes of *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85E* and 85-10, thus replacing the wild-type copy of *hrpE*. The nomenclature of the insertion mutants is based on the location of the five additional amino acids. For instance, *hrpE*(W10) stands for an insertion after tryptophan at position 10. The variant with the earliest stop codon was used as a nonpolar *hrpE* mutant (*hrpE* Δ 9-93) (56), while the other truncated variants were not further analyzed. A list of all mutants and their relevant phenotypes is given in Table 2.































The N terminus of HrpE is permissive for pentapeptide insertions. The mutant collection was screened for the ability to translocate the effector proteins into plant cells. As an assay, we used the avirulence protein AvrBs1, which leads to a hypersensitive response in resistant *Bs1* pepper plants (47). Insertion mutant 85E**hrpE*(W10) showed a slightly reduced hypersensitive response when inoculated into 4-week-old resistant pepper plants. 85E**hrpE*(M18) and 85E**hrpE*(F21) reacted similarly to the wild type; however, on 12-week-old plants they showed strongly reduced responses. 85E**hrpE*(D53) elicited a strongly reduced and delayed reaction. All insertions between glutamine 56 and the C terminus of the protein exhibited an Hrp-negative phenotype, and even 5 days after inoculation, no hypersensitive response was observed (Table 2). These results show that the N-terminal half of HrpE tolerates pentapeptide insertions, whereas the C-terminal half does not.

The mutant 85EhrpE*(Q56) is able to secrete proteins although it does not elicit a hypersensitive response.** We wondered whether the inability to elicit a hypersensitive response is caused by a general defect in *hrp*-dependent secretion from the bacterium or by a defective translocation of avirulence proteins into the plant cell. Therefore we followed the in vitro secretion of two type III secreted proteins HrpF and AvrBs1. When wild-type bacteria were incubated in secretion medium, both proteins could be detected in total cell extracts by Western blot analysis (Fig. 1 and Table 2). In concordance with the hypersensitive-response assay, analysis of *X. campestris* pv. vesicatoria culture supernatants revealed that only strains 85E**hrpE*(W10) to 85E**hrpE*(D53) secreted HrpF and

TABLE 2. Phenotypes of HrpE insertion mutants used in this study

6178 WEBER AND KOEBNIK

J. BACTERIOL.

Mutation/ strain	Pentapeptide insertion ^a	HR ^b	Complementation ^c	Secretion of AvrBs1	HrpF	<i>in vitro</i> Hrp pili ^{d,e}
wt				+	+	+
<i>hrpE</i> Δ9–93				-	-	-
<i>hrpE</i> (W10)	CLNTW			+	+	+
<i>hrpE</i> (M18)	VFKHM	* 		+	+	600 nm
<i>hrpE</i> (F21)	CLNSF	* 		+	+	120 nm
<i>hrpE</i> (D53)	VFKQD			+	+	-
<i>hrpE</i> (Q56)	MFKHQ			-	+	-
<i>hrpE</i> (K62)	CLNNK			-	-	n.d.
<i>hrpE</i> (T64)	MFKHT			-	-	-
<i>hrpE</i> (K67)	MFKHK			-	-	n.d.
<i>hrpE</i> (N68)	CLNKN			-	-	-
<i>hrpE</i> (N73)	CLNIN			-	-	-
<i>hrpE</i> (N77)	CLNIN			-	-	-
<i>hrpE</i> (K82)	VFKHK			-	-	-
<i>hrpE</i> (K88)	CLNTK			-	-	-

^a Pentapeptide insertion encoded by the 15-bp insertion.
^b In most cases, strains were inoculated into 12-week-old ECW-10R plants and hypersensitive-response (HR) induction was scored after 2 days. In the cases of *hrpE*(M18) and *hrpE*(F21), 4-week-old (*) and 12-week-old plants were inoculated, respectively. *hrpE*(D53) was scored 5 days postinoculation.
^c Mutants were complemented with pXV9 carrying *hrpE*. The hypersensitive response was scored after 2 days.
^d n.d., not determined.
^e Average length is given.

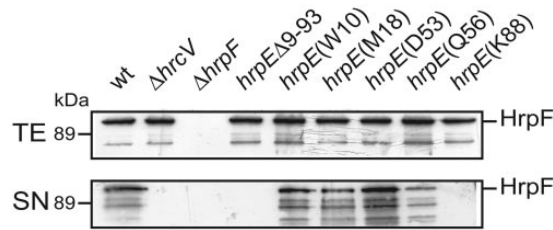


FIG. 1. Effects of *hrpE* insertion mutations on in vitro type III secretion. Immunoblot analyses of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) of an *hrpE* wild-type (wt) strain (85E*), a TTS-deficient mutant (85E* Δ *hrcV*), an *hrpF* deletion mutant (85E* Δ *hrpF*), an *hrpE* Δ 9-93 mutant, and insertion mutants 85E**hrpE*(W10), 85E**hrpE*(M18), 85E**hrpE*(D53), 85E**hrpE*(Q56), and 85E**hrpE*(K88) grown in secretion medium are shown. The blots were reacted with a polyclonal antiserum directed against HrpF.

AvrBs1. Mutants with insertions downstream of lysine 62 failed to secrete HrpF and AvrBs1. Intriguingly, mutant 85E**hrpE*(Q56), which did not show any reaction in planta, was able to secrete HrpF, although in slightly reduced amounts. However, we could not detect AvrBs1 in supernatants of 85E**hrpE*(Q56).

Hypersensitive-response reduction in resistant plants is mirrored by growth defects of bacteria in susceptible plants. In contrast to the hypersensitive response, which is based on the translocation of one specific Avr protein, growth in susceptible plants reflects the ability to initiate a compatible interaction with the host plant, requiring the coordinated translocation of a set of effector proteins. Therefore, the insertion mutants were inoculated into susceptible ECW pepper leaves. The resulting growth curves of strains 85E*, 85E**hrpE*(W10), 85E**hrpE*(D53), 85E**hrpE*(Q56), and 85E**hrpE* Δ 9-93 are shown in Fig. 2. Compared to the 85E* wild-type strain, the mutants showed a gradual decrease in growth, which correlated well with the different capacities to elicit a hypersensitive response in resistant plants (Table 2). The growth of 85E**hrpE*(M18) and 85E**hrpE*(F21) was intermediate between those of 85E**hrpE*(W10) and 85E**hrpE*(D53) (data not shown). One representative variant with an Hrp-negative phenotype, 85E**hrpE*(K88), behaved like the negative control 85E**hrpE* Δ 9-93. A remarkable exception is the mutant 85E**hrpE*(Q56), which was not detectable in the plant tissue after 48 h, whereas *hrp* mutants, such as 85E**hrpE* Δ 9-93, grew slightly during this period of time. This is a novel phenotype which has not been observed before. We suspect that either the mutant protein itself had a toxic effect on *X. campestris* pv. vesicatoria or the plant was able to respond to tiny amounts of an effector protein by an active defense reaction. This hypothesis was based on the in vitro secretion of reduced amounts of HrpF. Since AvrBs1 secretion was not detectable, it appeared conceivable that effector proteins were translocated in significantly reduced amounts, which may not be sufficient to suppress a plant defense reaction. To study this effect in more detail, *hrpE*(Q56) was introduced into secretion-defective (Δ *hrcV*) and translocation-defective (Δ *hrpF*) mutant backgrounds. Strain 85E* Δ *hrcV* *hrpE*(Q56) behaved like a typical *hrp* mutant, whereas the number of viable 85E* Δ *hrpF* *hrpE*

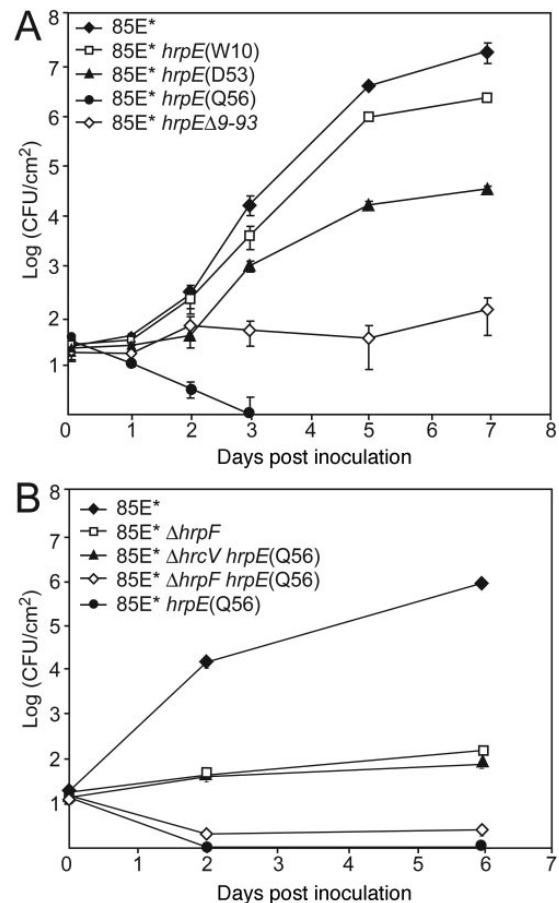


FIG. 2. Analysis of *hrpE* insertion mutants for growth in planta. (A) Bacterial growth of strains 85E*, 85E**hrpE*(W10), 85E**hrpE*(D53), 85E**hrpE*(Q56), and 85E**hrpE* Δ 9-93 in the susceptible pepper line ECW is shown. (B) Bacterial growth of strains 85E*, 85E* Δ *hrpF*, 85E* Δ *hrcV* *hrpE*(Q56), 85E* Δ *hrpF* *hrpE*(Q56), and 85E**hrpE*(Q56). Bacteria were inoculated into leaves at 10⁴ CFU/ml. Values are the means of four samples of two different plants taken at each time point, and the error bars indicate the standard deviations. Each graph is based on data from one representative experiment.

(Q56) cells was reduced in comparison to the *hrp* mutant (data not shown). Hence, HrpF is not required for this effect.

Peptide insertion mutants in the C-terminal region inhibit Hrp pilus assembly. To answer the question of whether some of the mutants can interfere with the function of wild-type HrpE, we introduced a low-copy-number cosmid with an extra copy of the entire *hrp* gene cluster, except for *hrpF*, into the mutant strains. Under these conditions, the wild-type protein was assumed to be expressed at a higher level than the mutant protein. To test for complementation, the strains were inoculated into resistant pepper plants and the AvrBs1-dependent hypersensitive response was monitored. Mutants which showed slightly reduced responses, 85E**hrpE*(W10) to 85E**hrpE*

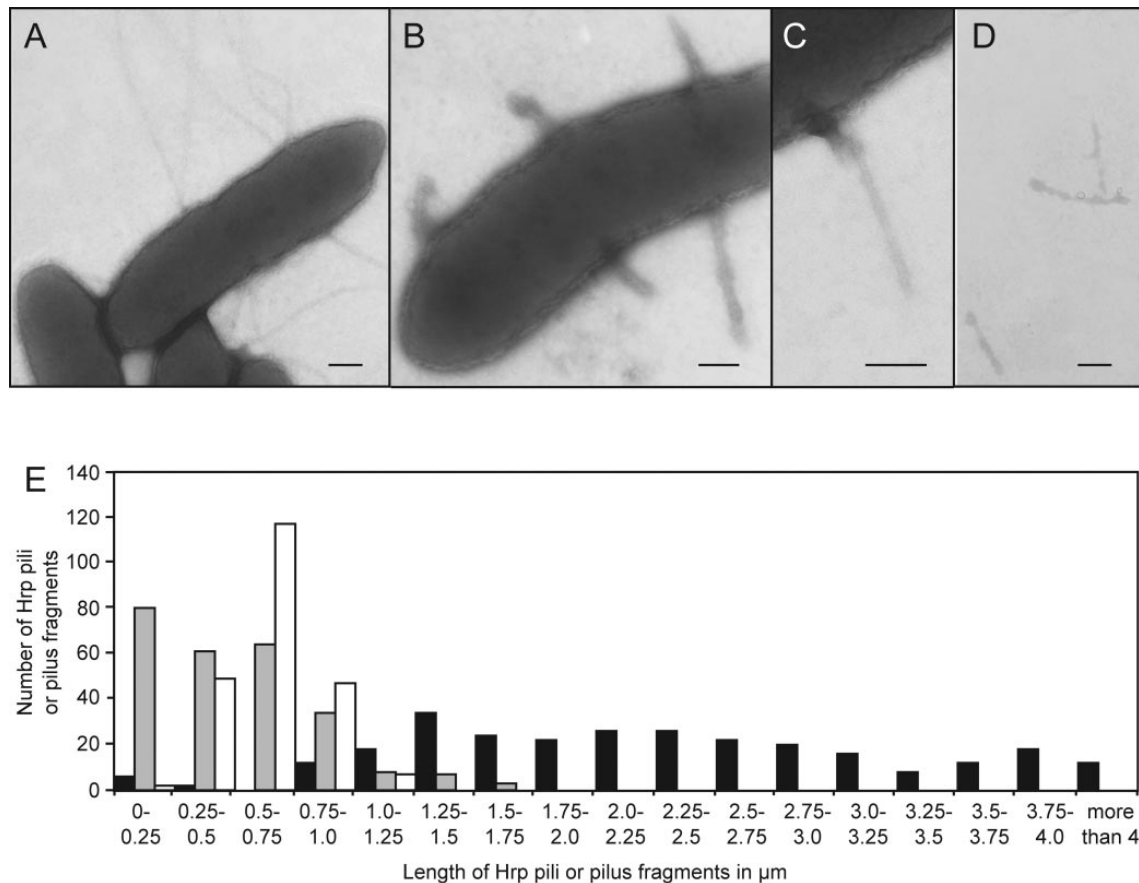


FIG. 3. Morphological characterization of 85E*hrpE(M18) cells and pili by electron microscopy. Bacteria were incubated on coated EM gold grids for 6 h at 30°C. Transmission electron micrographs of negatively stained specimen are shown. (A) 85E* forms Hrp pili with a diameter of 8 to 10 nm and a length of up to 4 μm. (B to D) Hrp pili of 85E*hrpE(M18) are not altered in diameter but are significantly shorter (B). Broken Hrp pili are in close contact with the bacterial cell (C) or being detached (D). Broken Hrp pilus fragments show a predominant length of 0.5 to 1 μm. Bars: 0.25 μm. (E) Length distribution of Hrp pili and pilus fragments of strain 85E*hrpE(M18). The number of Hrp pili connected to the bacterial cell (gray columns) or of broken pilus fragments (white columns) found with a given length was recorded. For comparison, the length distribution of Hrp pili formed by wild-type 85E* is illustrated by black columns.

(D53), as well as 85E*hrpE(K62), 85E*hrpE(K67), 85E*hrpE(K82), and 85E*hrpE(K88), could be complemented.

In four cases, 85E*hrpE(T64), 85E*hrpE(N68), 85E*hrpE(N73), and 85E*hrpE(N77), the ability to trigger a hypersensitive response could not be restored by the presence of wild-type *hrpE*. This dominant-negative effect suggests that the mutant variant may interfere with the assembly of the Hrp pilus.

Morphology studies reveal insertion mutants with shortened Hrp pili. Next we were interested in determining whether morphological peculiarities of the Hrp pili might be the reason for the observed phenotypes. Therefore, we investigated the *hrpE* mutants by electron microscopy. The pili of mutant 85E*hrpE(W10) showed no significant alteration in morphology or the number of pili per cell (see Fig. 4A). Insertion mutants 85E*hrpE(M18) and 85E*hrpE(F21), which led to a reduced hypersensitive response after inoculation of 12-week-

old plants, had significantly shorter pili (Fig. 3 and data not shown). The length of Hrp pili ranged from 0.25 μm to 1 μm, whereas wild-type pili reached more than 4 μm in length. Interestingly, numerous detached pilus fragments were observed (Fig. 3C and D). Both the short pili and the pilus fragments had a diameter of 8 to 10 nm, like the wild type. The length of the detached fragments varied in a remarkably small range, between 0.5 and 1 μm. There was a clear correlation between fragment length and the maximal length of the attached pili (Fig. 3E). The number of pili was similar to that of the wild type.

For 85E*hrpE(D53) and 85E*hrpE(Q56), which were still able to secrete proteins, no Hrp pili could be detected (Fig. 4B and C). Possibly, the Hrp pilus already starts within and is not only attached on top of the TTS apparatus. We also examined two of the dominant-negative mutants. As expected,

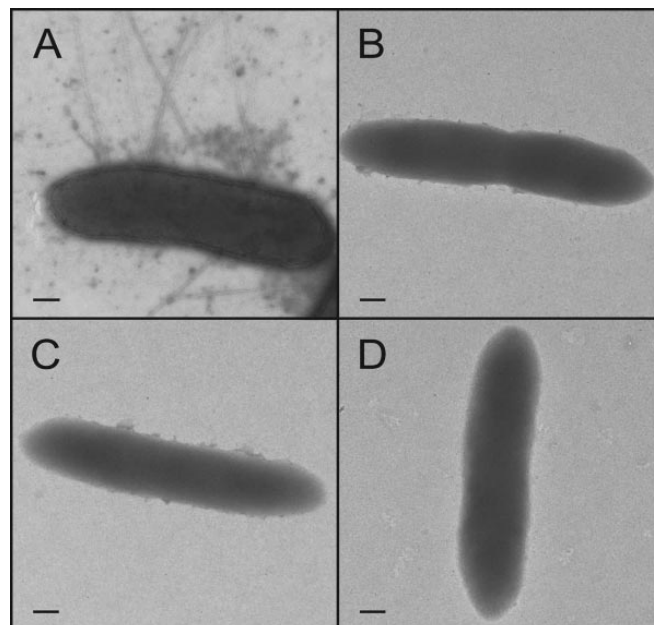


FIG. 4. Effects of insertion mutations on Hrp pilus assembly. Electron micrographs of 85E*-derived bacteria incubated in XVM2 medium are shown. Insertion mutant *hrpE*(W10) (A) produced pili, whereas *hrpE*(D53), *hrpE*(Q56), and *hrpE*(N73) did not show Hrp pili (B to D). Bars: 200 nm.

85E**hrpE*(N73) and 85E**hrpE*(N77) failed to assemble Hrp pili (Fig. 4D).

The TTS signal is located in the first 17 codons. In order to define the TTS signal of HrpE, protein fusions between N-terminal fragments of HrpE and an N-terminally truncated AvrBs3 reporter protein (AvrBs3Δ2) were generated. This truncated AvrBs3 variant, which is devoid of its own secretion signal, is able to cause a hypersensitive response when transiently expressed in planta using *Agrobacterium tumefaciens* (52). The resulting constructs (HrpE₁₀-, HrpE₁₇-, HrpE₁₉-, HrpE₂₃-, HrpE₄₂-, HrpE₅₀-, and HrpE₉₃-AvrBs3Δ2) were introduced into strain 85E*. Western blot analysis of total protein extracts demonstrated that all fusion proteins were expressed. After incubation in secretion medium, all fusions, except for HrpE₁₀-AvrBs3Δ2, were well detected in the culture supernatants (Fig. 5A). The HrpE₁₀-AvrBs3Δ2 fusion protein could be detected in very small amounts, demonstrating that even this short peptide is able to permit secretion, albeit at a reduced rate. To confirm that secretion follows the TTS pathway, construct HrpE₅₀-AvrBs3Δ2 was introduced into 85E*Δ*hrcV*. In this genetic background, no in vitro secretion of the reporter protein could be detected (Fig. 5A). These results show that a minimal TTS signal is encoded within the first 10 codons, but full secretion efficiency was only observed with 17 or more codons.

HrpE is not translocated into plant cells by strains 85E* and 85E*Δ*hpaB*. To test whether HrpE-AvrBs3Δ2 fusions are translocated into plant cells, 85E* strains expressing HrpE₁₀-, HrpE₁₇-, HrpE₁₉-, HrpE₂₃-, HrpE₄₂-, HrpE₅₀-, and HrpE₉₃-AvrBs3Δ2 were inoculated into ECW-30R pepper leaves ex-

pressing the *Bs3* resistance gene. As shown in Fig. 5B, none of the HrpE-AvrBs3Δ2 fusions elicited a hypersensitive response, indicating that the HrpE-AvrBs3Δ2 fusions were not translocated into the plant cell. Instead, water-soaked lesions were formed, indicating that the fusion proteins had no inhibitory effect on the translocation of other effector proteins.

Recently it was shown that the N termini of noneffectors, such as XopA and HrpF, target the AvrBs3Δ2 reporter into plant cells in a Δ*hpaB* mutant but not in the wild type. This finding suggested that these noneffectors contain not only a secretion signal but also a translocation signal but that their translocation is inhibited by HpaB (9). Therefore, translocation of HrpE_n-AvrBs3Δ2 fusions was also tested in an 85E*Δ*hpaB* background. Like 85E*, 85E*Δ*hpaB* strains did not elicit a hypersensitive response, whereas the noneffector fusion HrpF₂₀₀-AvrBs3Δ2 did (Fig. 5B). These results indicate that the pilin HrpE is not delivered across the plant plasma membrane regardless of whether or not *hpaB* was present. Hence, HrpE does not possess a translocation signal controlled by HpaB.

Hrp pilins share similar physicochemical profiles. The major subunits of Hrp pili of *P. syringae* (HrpA), *R. solanacearum* (HrpY), and *X. campestris* (HrpE) assemble into pilus structures which are nearly identical in diameter and length (46, 55, 56). Surprisingly, their sequences are not conserved (Fig. 6A), which implies the existence of other common properties necessary for their function. To elucidate structural homology among Hrp pilins despite low sequence conservation, we analyzed the physicochemical features of the three proteins. This approach has already been described for components of the

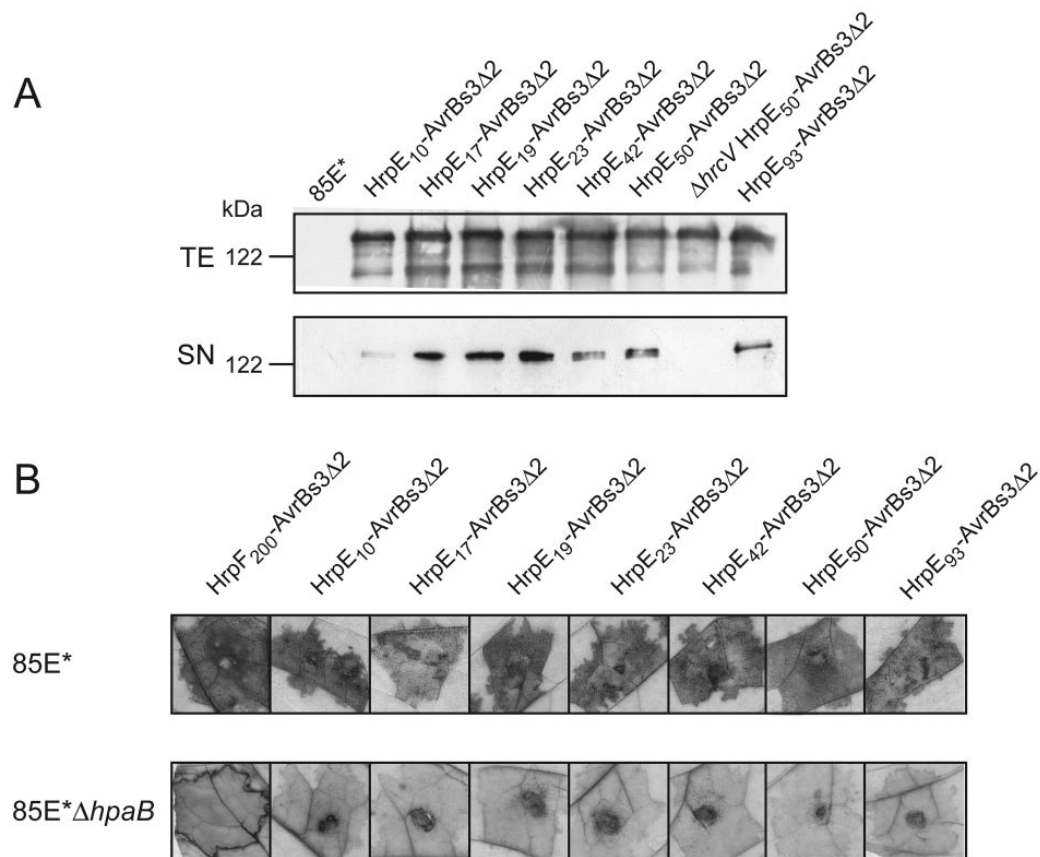


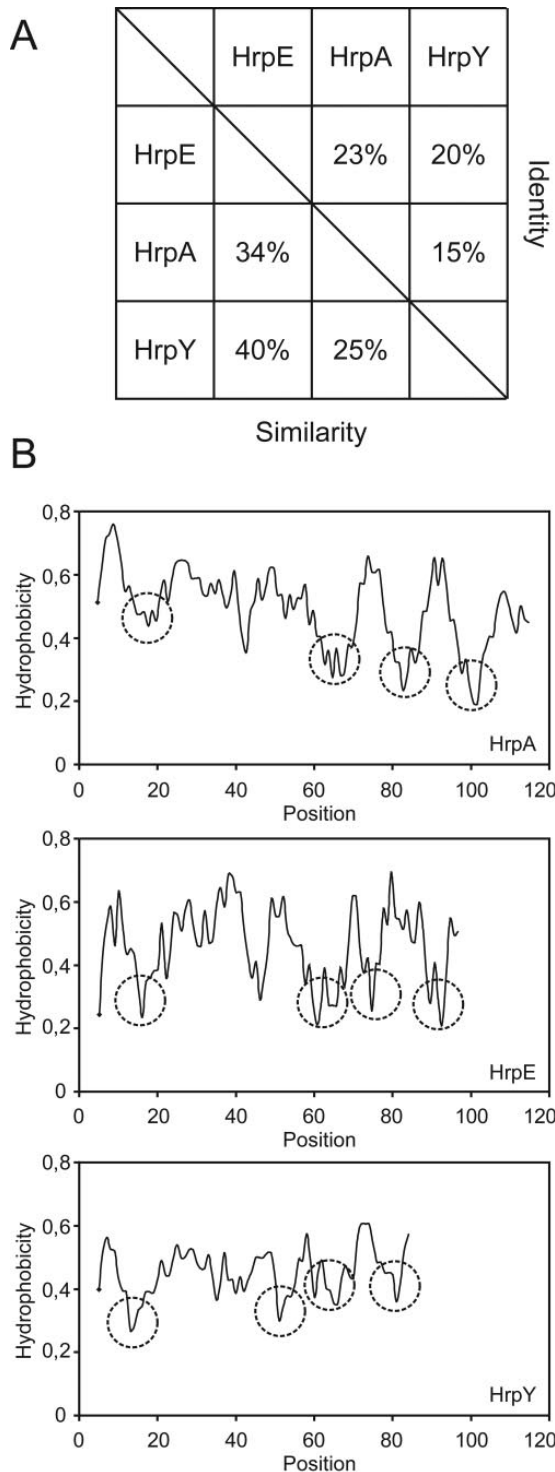
FIG. 5. Secretion and translocation of HrpE_n-AvrBs3ΔN fusions. (A) Analysis of the secretion signal of HrpE. Immunoblot analysis of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) of *X. campestris* pv. *vesicatoria* cells expressing HrpE_n-AvrBs3Δ2 fusion proteins, grown under secretion conditions, is shown. The blot was probed with a polyclonal antiserum directed against AvrBs3. (B) Translocation assay in pepper plant ECW-30R. The translocation of HrpE_n-AvrBs3Δ2 fusions was analyzed in the wild type (85E*) and in an isogenic *hpaB* deletion mutant (85E*Δ*hpaB*). All 85E* derivatives led to water-soaked lesions 2 days after inoculation. In contrast, no reaction occurred when 85E*Δ*hpaB* derivatives were used. The reporter fusion HrpF₂₀₀-AvrBs3Δ2 served as a control, leading to water-soaked lesions when expressed from 85E* or a hypersensitive response when expressed from 85E*Δ*hpaB*. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were inoculated at 5×10^8 CFU/ml. Two days after inoculation, the leaves were bleached with ethanol.

flagellar system (1). As shown in Fig. 6B, all three pilins have very similar hydrophobicity profiles with three rapidly alternating hydrophilic and hydrophobic stretches in the C-terminal half, indicating that this part of the protein contains exposed and embedded regions. Also, the N termini show similar hydrophobicity patterns and a pronounced hydrophilic drop at the end of the presumed secretion signal (Fig. 6B). Also, the instability indices (HrpE, 25.4; HrpA, 18.3; HrpY, 18.3) and aliphatic indices (HrpE, 72.5; HrpA, 85.7; HrpY, 57.4) were similar in all three cases. These findings suggest a common fold of the Hrp pilus subunits of all three plant-pathogenic bacteria.

DISCUSSION

In this work, we studied the domain structure of HrpE, the major pilus subunit of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Intrigu-

ingly, homologs of this protein are only found in other xanthomonads and comparison of the five available sequences shows a variable N-terminal half, in contrast to the highly conserved C-terminal half, where the last 24 amino acids are identical (56). This small 9-kDa protein is fascinating because of its functional versatility. First, as an outer component of the TTS system it has to be secreted and therefore needs a secretion signal. Second, it has to assemble into an extracellular polymeric structure which is stable and flexible enough to pass the plant cell wall (23). Third, an inner channel has to be formed which allows the passage of the Hrp pilus subunit itself, of the HrpF translocon protein, and of more than 20 different type III effectors (F. Thieme and U. Bonas, unpublished data). To fulfill all these tasks, interactions between HrpE and several components of the TTS system have to take place. HrpF, HrpE, HrpB2, and the HrcC



secretin are candidate partners, but up to now there is no experimental proof for any of these interactions (48). In this study, functional domains of HrpE were mapped by linker-scanning mutagenesis and by reporter protein fusions.

We mapped the TTS signal of HrpE by constructing protein fusions between HrpE with the reporter AvrBs3Δ2. HrpE_n-AvrBs3Δ2 fusions containing the first 17, 19, 23, 42, or 50 amino acids of HrpE or the full-length HrpE protein were expressed and secreted into the culture supernatant, whereas the first 10 amino acids allowed the secretion of only small amounts of the fusion protein. Hence, the signal sufficient for efficient secretion of HrpE is localized between the codons for amino acids 1 to 17. This finding is consistent with other studies of the TTS signals of many effector proteins (2, 22, 40, 51).

We also analyzed the competence of the HrpE N terminus to serve as a translocation signal. The inoculation of the 85E* strains expressing HrpE_n-AvrBs3Δ2 fusion proteins into pepper ECW-30R plants revealed that none of the variants was translocated. Interestingly, the noneffectors HrpF and XopA are translocated in a ΔhpaB mutant, showing that HpaB prevents them from being translocated in the wild type (9). In contrast to HrpF and XopA, HrpE is not translocated in a ΔhpaB mutant, indicating that there is no translocation signal in HrpE or that another negative regulator prevents HrpE from translocation. Of special interest is the full-length HrpE fusion to AvrBs3Δ2. This variant was readily detected in culture supernatants in an in vitro secretion assay and did not interfere with pilus assembly of wild-type HrpE, as indicated by the development of disease symptoms on ECW-30R plants (Fig. 5B) or by development of an AvrBs1-induced hypersensitive response in ECW-10R plants (data not shown). This finding indicates that C-terminal extensions to HrpE may prevent incorporation into the growing pilus.

To define the domain structure of HrpE further, linker-scanning mutagenesis was performed. The mutants were characterized with respect to the in vitro secretion of TTS substrates and the elicitation of a hypersensitive response in resistant plants or growth in susceptible plants. Furthermore, the pilus morphology was analyzed by electron microscopy and complementation studies were performed. Based on these assays, we grouped the insertion mutants into six classes, which are summarized in Table 3.

Class I mutant 85E*hrpE(W10) behaved like the wild type except for slightly reduced growth in planta. This is a very sensitive assay and therefore may also reveal subtle distortions of the pilus which were not observable by electron microscopy. Surprisingly, the N-terminal secretion signal of HrpE was not disturbed by the five extra amino acids. We took advantage of this permissive site by inserting two epitope tags. While the hexahistidine epitope did not interfere with HrpE function,

FIG. 6. Hrp pilins show no sequence homology but similar hydrophobicity profiles. (A) Amino acid identities and similarities of Hrp pilin proteins. Pairwise BLAST analyses were performed using the BLOSUM62 scoring matrix. (B) Hydrophobicity plots of Hrp pilins, calculated over a sliding window of five amino acid residues, using the Kyte and Doolittle hydrophobicity scale (33). Conserved peaks of low hydrophobicity are indicated.

TABLE 3. Classes of HrpE insertion mutants

Class	Insertion mutant(s)	Relevant characteristics
I	<i>hrpE</i> (W10)	Pili same as wild type; slightly reduced growth in planta
II	<i>hrpE</i> (M18), <i>hrpE</i> (F21)	Short Hrp pili; secretion and translocation competent; reduced growth in planta, delayed hypersensitive response in old plants
III	<i>hrpE</i> (D53)	No Hrp pili; secretion and translocation competent; strongly reduced growth in planta, delayed hypersensitive response in young and old plants
IV	<i>hrpE</i> (Q56)	No Hrp pili; secretion of HrpF; no secretion of AvrBs1; dying in planta after 48 h
V	<i>hrpE</i> (K62), <i>hrpE</i> (K67), <i>hrpE</i> (K82), <i>hrpE</i> (K88)	No Hrp pili; Hrp phenotype
VI	<i>hrpE</i> (T64), <i>hrpE</i> (N68), <i>hrpE</i> (N73), <i>hrpE</i> (N77)	No Hrp pili; Hrp phenotype, dominant-negative phenotype

introducing the strongly charged FLAG epitope led to a non-functional HrpE variant (E. Weber, unpublished data).

Class II mutations *hrpE*(M18) and *hrpE*(F21) also allowed efficient in vitro secretion of HrpF and AvrBs1. However, with respect to virulence these mutants grew significantly less than the wild type in susceptible pepper plants. This finding may be explained by a reduced stability of the Hrp pili or by a slightly altered effector translocation. EM analyses revealed that these mutants form short and unstable Hrp pili. Two facts are remarkable. First, the uniformity of the Hrp pilus fragments shows that the breaking point is not distributed randomly. Second, the length of Hrp pilus fragments and the maximal length of the attached pili are similar. We assume that the Hrp pili are destabilized at their connection with the base and break if the structure reaches a certain length. Hence, the N terminus of HrpE contributes to the anchorage and stability of the pilus. A candidate interaction partner for the connection to the base is the outer membrane-localized secretin HrcC. In line with the shortened pili, we observed that only in 4-week-old plants did a hypersensitive response occur while no reaction occurred in 12-week-old plants. The continuous hardening process of plant cell walls by an increase in wall cross-linking or an alteration in the structure and composition of cell wall components may explain these findings (12).

Class III mutation *hrpE*(D53) and class IV mutation *hrpE*(Q56) are located at the boundary between the variable N terminus and the highly conserved C terminus. This transition is also reflected by their phenotypes. 85E**hrpE*(D53) was still able to elicit a hypersensitive response in resistant plants and to secrete HrpF and AvrBs1 (Table 2). In contrast, 85E**hrpE*(Q56) was able to secrete HrpF, but no longer AvrBs1. Accordingly, this mutant also failed to elicit a hypersensitive response in ECW-10R pepper plants. Despite their ability to secrete proteins, both mutants did not form Hrp pili in vitro. Probably, HrpE(D53) could form pili that are too fragile to be detected by the method used. In the case of HrpE(Q56), the mutant proteins are probably disturbed in their interaction with each other but can still form a “minimal pilus” in vivo inside the TTS apparatus which is stabilized by the surrounding TTS components. This hypothetical structure would be able to connect the cytoplasm with the outer environment and therefore to perform secretion. The degree of distortion may be larger in *hrpE*(Q56) than in *hrpE*(D53), thus explaining their different behaviors in protein secretion.

Surprisingly, the 85E**hrpE*(Q56) variant died in planta 48 h postinoculation. Its growth in liquid rich medium and in min-

imal secretion medium was not altered, indicating that the toxic effect is not an intrinsic feature of the mutant protein (data not shown). The toxic effect in planta depends on a functional TTS system, since the Δ *hrcV* *hrpE*(Q56) double mutant survived. However, translocation of effector proteins—even in very small amounts—was not required for the toxic effect since also a Δ *hrpF* Δ *hrpE*(Q56) double mutant died. We do not know if pathogen-associated molecular patterns are involved in this process or if even the HrpE(Q56) variant acts as a pathogen-associated molecular pattern (43). We consider this possibility unlikely, since no reaction occurred after inoculation of 85E**hrpE*(Q56) in susceptible ECW plants (data not shown). Alternatively, different gating behaviors of the TTS system under in vitro and in planta conditions may be the reason for this phenotype. An “open”-state TTS system may lead to leakage of protons into the environment.

In the highly conserved C terminus, all insertion mutations (class V and class VI) show much more drastic effects. The mutants did not elicit any reaction in plants, neither a hypersensitive response in resistant plants nor water-soaked lesions in susceptible ones. They also failed to secrete proteins and were not able to form pili. This complete loss of function shows the key importance of the C-terminal domain for function, which is also reflected by its sequence conservation among the five HrpE proteins. The four C-terminal mutants of class VI are of special interest since they could not be complemented. Such dominant-negative effects have also been described for other proteins where polymerization is indispensable for function (26). Therefore, it is most likely that the highly conserved C terminus acts as the polymerization domain of HrpE. For the HrpA pilin from *P. syringae* pv. tomato, it was shown that purified pilins polymerized in vitro (45). From this point of view, a polymerization-deficient but folding-competent protein variant may be instrumental for nuclear magnetic resonance spectroscopy or X-ray crystallography of HrpE.

Taken together, our results suggest a three-domain organization of HrpE (Fig. 7). The N-terminal 17 codons account for the TTS signal, as demonstrated by our reporter protein fusions. We found, however, that this signal is tolerant of mutations since two of three insertions behind tryptophan 10 did not disturb the TTS signal. A FLAG epitope was not tolerated, which may be due to its highly charged character. Other work with synthetic TTS signals has shown that an amphipathic character is required for function as a TTS signal (37). The second domain encloses all insertions (class I to III) up to aspartic acid 53, which were at least partially tolerated (Fig. 2;

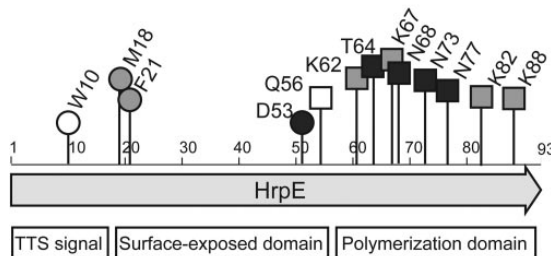


FIG. 7. Proposed domain structure of HrpE. Insertion points are marked as lollipops with mutant numbers above. The six mutant classes are indicated as follows: class I, open circle; class II; gray circles; class III, black circle; class IV, open square; class V, gray squares; class VI, black squares.

Table 2). Therefore, this region cannot be responsible for the polymerization of the HrpE pilin. Instead, we suggest that this region is largely exposed to the exterior of the pilus. This suggestion is supported by the high variability of this region. Nevertheless, this region also contributes to the stability of the Hrp pilus since two of three insertions led to drastically shortened pili. The insertions behind aspartic acid 53 (class IV to VI), which did not allow productive interaction with host plants or production of Hrp pili (Table 2), define the third domain. This proposal is consistent with the high conservation of this region at the level of the primary and secondary structures (56). Interestingly, four mutations were dominant negative. This effect shows that this part is involved in the polymerization process.

Besides HrpE, only the pilus protein HrpA from *P. syringae* pv. tomato has been characterized in detail. Similar to our finding, the first 15 residues are sufficient for secretion of a reporter protein and almost all insertions in the C-terminal half prevent pilus formation (22, 53). Interestingly, the two proteins, and also the HrpY pilin from *R. solanacearum*, do not share any significant sequence homology (Fig. 6A). However, all these proteins share a number of physicochemical features. They are small (HrpE, 9.7 kDa; HrpA, 11.3 kDa; HrpY, 8.7 kDa) and predicted to consist almost exclusively of α -helices (31, 56). Additionally, they show very similar hydrophobicity profiles (Fig. 6B) and resemble each other in their instability and aliphatic indices. It seems as if three bacterial species, all faced with the challenge of overcoming the extraordinary barricade of a plant cell wall, evolved functionally and structurally similar proteins. In future work, the epitope-tagged and dominant-negative HrpE variants will be used for high-resolution structural analyses.

After completing this report, we became aware of a study from the laboratory of Sheng Yang He describing dominant-negative *Pseudomonas hrpA* mutants (34). In addition to our mutant classes, they identified mutants (class IB) which in the presence of the wild-type allele did not interfere with in vitro secretion of two tested type III effectors (AvrPto and HopPtoM) although they did not form Hrp pili. This phenotype is reminiscent of that of our *hrpE*(D53) and *hrpE*(Q56) mutants which, however, are not dominant negative. We believe that in all cases unstable Hrp pili [HrpA hybrid pili, HrpE(D53) pili, or HrpE(Q56) pili] are formed which are

stabilized within the TTS apparatus, thus allowing in vitro secretion. In contrast to the HrpA and HrpE(Q56) pili, HrpE(D53) pili appear to be slightly more stable since residual hypersensitive-response induction was observed. Alternatively, the differences could be due to the different plant assays used in the two studies.

ACKNOWLEDGMENTS

Generous support of this study by Ulla Bonas is highly appreciated. We thank Hannelore Espenhahn for excellent technical assistance and Bianca Rosinsky for greenhouse work. We are grateful to J. Boch, D. Büttner, S. Kay, D. Kühn, D. Philip, and U. Wahren for critical reading of the manuscript.

This work was funded by grant KO 1686/3-2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (R.K.) and Landesstipendium Sachsen-Anhalt (E.W.).

REFERENCES

1. Aizawa, S. I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:157–164.
2. Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind. 1999. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12839–12843.
3. Anton, B. P., and E. A. Raleigh. 2004. Transposon-mediated linker insertion scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* McrA endonuclease. *J. Bacteriol.* **186**:5699–5707.
4. Biery, M. C., F. J. Stewart, A. E. Stellwagen, E. A. Raleigh, and N. L. Craig. 2000. A simple in vitro Tn7-based transposition system with low target site selectivity for genome and gene analysis. *Nucleic Acids Res.* **28**:1067–1077.
5. Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681–683.
6. Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:81–88.
7. Brown, I. R., J. W. Mansfield, S. Taira, E. Roine, and M. Romantschuk. 2001. Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. tomato across the host plant cell wall. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:394–404.
8. Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**:186–192.
9. Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noel, and U. Bonas. 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**:755–768.
10. Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas. 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **184**:2389–2398.
11. Caiazza, N. C., and G. A. O’Toole. 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **186**:4476–4485.
12. Cosgrove, D. J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**:1031–1041.
13. Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyk, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* **3**:3323–3328.
14. Deng, W. L., G. Preston, A. Collmer, C. J. Chang, and H. C. Huang. 1998. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrpC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *J. Bacteriol.* **180**:4523–4531.
15. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7347–7351.
16. Escobar, L., G. Van Den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas. 2001. Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* **2**:287–296.
17. Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas. 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:390–396.
18. Fenselau, S., and U. Bonas. 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which

- encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:845–854.
19. **Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1648–1652.
 20. **Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, T. Minamino, and R. M. Macnab.** 2002. Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **45**:967–982.
 21. **He, S. Y., K. Nomura, and T. S. Whittam.** 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:181–206.
 22. **Hienonen, E., E. Roine, M. Romantschuk, and S. Taira.** 2002. mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Genet. Genomics* **266**:973–978.
 23. **Hu, W., J. Yuan, Q. L. Jin, P. Hart, and S. Y. He.** 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. tomato assembled in minimal medium and in *planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:234–241.
 24. **Huguet, E., and U. Bonas.** 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:488–498.
 25. **Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas.** 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**:1379–1390.
 26. **Ilkovski, B., K. J. Nowak, A. Domazetovska, A. L. Maxwell, S. Clement, K. E. Davies, N. G. Laing, K. N. North, and S. T. Cooper.** 2004. Evidence for a dominant-negative effect in ACTA1 nemaline myopathy caused by abnormal folding, aggregation and altered polymerization of mutant actin isoforms. *Hum. Mol. Genet.* **13**:1727–1743.
 27. **Jin, Q., and S. Y. He.** 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* **294**:2556–2558.
 28. **Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones, and S. Y. He.** 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **40**:1129–1139.
 29. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137–141.
 30. **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.* **173**:7142–7150.
 31. **Koebnik, R.** 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol.* **9**:586–590.
 32. **Krishnan, H. B., J. Lorio, W. S. Kim, G. Jiang, K. Y. Kim, M. DeBoer, and S. G. Pueppke.** 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:617–625.
 33. **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105–132.
 34. **Lee, Y. H., O. O. Kolade, K. Nomura, D. N. Arvidson, and S. Y. He.** 2005. Use of dominant-negative HrpA mutants to dissect Hrp pilus assembly and type III secretion in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J. Biol. Chem.* **280**:21409–21417.
 35. **Li, C. M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk, and S. Taira.** 2002. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J.* **21**:1909–1915.
 36. **Lindgren, P. B.** 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:129–152.
 37. **Lloyd, S. A., M. Sjöström, S. Andersson, and H. Wolf-Watz.** 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol. Microbiol.* **43**:51–59.
 38. **Menard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot.** 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**:5899–5906.
 39. **Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:41–47.
 40. **Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, O. Rossier, U. Bonas, and B. J. Staskawicz.** 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13324–13329.
 41. **Noel, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas.** 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **185**:7092–7102.
 42. **Noel, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas.** 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Mol. Microbiol.* **41**:1271–1281.
 43. **Nürnberg, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**:249–266.
 44. **Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou, and A. Economou.** 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* **278**:25816–25824.
 45. **Roine, E., J. Saarinen, N. Kalkkinen, and M. Romantschuk.** 1997. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.* **417**:168–172.
 46. **Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He.** 1997. Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3459–3464.
 47. **Ronald, P. C., and B. J. Staskawicz.** 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria encodes a 50-kD protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:191–198.
 48. **Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2000. HrpB2 and HrpP from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* **38**:828–838.
 49. **Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9368–9373.
 50. **Schulte, R., and U. Bonas.** 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* **174**:815–823.
 51. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11998–12002.
 52. **Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas.** 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* **46**:13–23.
 53. **Taira, S., J. Tuimala, E. Roine, E. L. Nurmiaho-Lassila, H. Savilahti, and M. Romantschuk.** 1999. Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol. Microbiol.* **34**:737–744.
 54. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadologlou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* **6**:805–816.
 55. **Van Gijsegem, F., J. Vasse, J. C. Camus, M. Marena, and C. Boucher.** 2000. *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* **36**:249–260.
 56. **Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik.** 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**:2458–2468.
 57. **Wengelnik, K., and U. Bonas.** 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **178**:3462–3469.
 58. **Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas.** 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* **178**:1061–1069.
 59. **Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas.** 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* **181**:6828–6831.
 60. **White, F. F., B. Yang, and L. B. Johnson.** 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:291–298.

2.3.2 Ergänzende Ergebnisse

2.3.2.1 Charakterisierung der dominant-negativen HrpE-Insertionsmutanten

Die bisherigen Versuche zur löslichen Expression von HrpE scheiterten an der bereits durch seine Funktion vorgegebenen Fähigkeit zur Aggregation (207). Eine Expression von HrpE in löslicher Form ist allerdings für die Klärung der 3D-Struktur mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie von entscheidender Bedeutung.

Die dominant-negativen Insertionsmutanten HrpE(T64), HrpE(N68) und HrpE(N73) stellen mögliche Kandidaten für HrpE-Varianten dar, die in ihrer Fähigkeit zur Assemblierung gestört sind, und sollten daher überexprimiert werden. *hrpE*(T64), *hrpE*(N68) und *hrpE*(N73) wurden unter Verwendung der Primer *hrpE*-5'NdeI (5'-GCG AAT TCC ATA TGC AAA TTT TTC CTG AAG TAA GCT CG) und *hrpE*-3'pET15 (5'-CGG GGA TCC TTA TTA CTG GCC AAC GAG CTG CTT AGC) amplifiziert. Mittels der in den Primersequenzen enthaltenen *Nde*I- und *Bam*HI-Schnittstellen (unterstrichen) wurden die Fragmente in das Expressionsplasmid pET15b (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kloniert, wobei die HrpE-Varianten N-terminal mit einem His₍₆₎-Tag fusioniert werden. Die resultierenden Plasmide pET15b *hrpE*(T64), pET15b *hrpE*(N68) und pET15b *hrpE*(N73) wurden in JM109(DE3) Zellen transformiert. Alle HrpE-Varianten wurden nach Induktion mit IPTG exprimiert (Abb. 10A). Die Trennung der Totalzellextrakte in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des B-PER[®] Reagenzes (PIERCE, Rockford, IL) (Abb. 10B). HrpE(T64) und HrpE(N73) konnten wie das HrpE-Wildtyp-Protein ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind im Falle von HrpE(N68) zwischen 20 % und 50 % des Proteins löslich. Nach Reinigung mittels "immobilized-metal-affinity-chromatography", Protease-vermittelter Abspaltung des His₍₆₎-Epitops und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie könnte nun die Struktur von HrpE(N68) durch NMR gelöst werden.

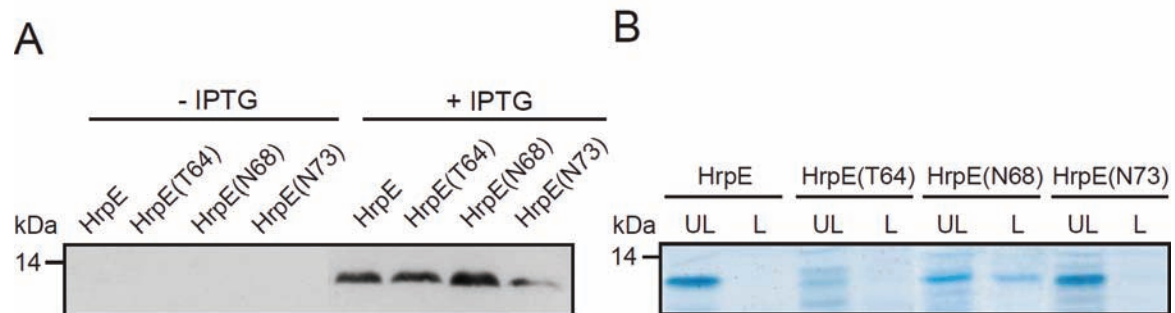


Abbildung 10: Expression der dominant-negativen HrpE-Insertionsmutanten.

(A) *E. coli* JM109(DE3)-Stämme mit den Plasmiden pET15b *hrpE*, pET15b *hrpE*(T64), pET15b *hrpE*(N68) und pET15b *hrpE*(N73) wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und anschließend für vier Stunden mit 0,1 mM IPTG induziert. Gleiche Proteinmengen von uninduzierten und induzierten Kulturen wurden mittels Immunoblotanalysen unter Verwendung eines His₍₅₎-spezifischen Antikörpers (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) analysiert. (B) Die Totalzellextrakte der induzierten Stämme wurden in eine unlösliche (UL) und eine lösliche (L) Fraktion aufgetrennt und anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

2.3.2.2 Generierung einer funktionalen Epitop markierten HrpE-Variante

In bisherigen Arbeiten konnten keine Interaktionspartner von Hrp-Pilinen identifiziert werden. Ein viel versprechender biochemischer Ansatz liegt in der nativen Reinigung von HrpE im Komplex mit interagierenden Komponenten. Um die Funktion von HrpE zu gewährleisten, wurde die permissive Stelle W10 als Insertionsort genutzt, damit weder das Sekretionssignal im N-Terminus noch die Assemblierungsdomäne im C-Terminus zerstört werden. Als möglichst kurze Epitopmarkierungen wurden ein His₍₆₎- und ein FLAG-Epitop ausgewählt, da sie eine Reinigung über entsprechende Affinitätsmatrizen ermöglichen.

Zur Erstellung der HrpE-Variante mit einem His₍₆₎-Epitop wurde der Bereich von *hrpE* bis *hpaE* mittels der Primer *hrpE*-W10-His (5'-GTA AGC TCG TGG GCC GGC CAT CAC CAC CAT CAT CAC AAG AGG TCC CGT GTT GGC CAA G) und *hrpE*-3' *Sall* (5'-ACG CGT CGA CCA AAC ACC GGG AAA GAA CTC) amplifiziert. Im Falle des FLAG-Epitops wurden die Primer *hrpE*-W10-FLAG (5'-GTA AGC TCG TGG GCC GGC GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAG AGG TCC CGT GTT GGC CAA G) und *hrpE*-3' *Sall* genutzt. Die Sequenzen, die für das His₍₆₎- bzw. FLAG-Epitop und den aus den Aminosäuren Alanin und Glycin bestehenden Linker kodieren, sind in der Primersequenz kursiv markiert. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mittels der in den Primersequenzen enthaltenen *Bss*SI und *Sall* Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) in den Vektor pOK-*hrpE* kloniert, der als Insert den Bereich von *hrcD* bis *hpaE* trägt (209). Die resultierenden Plasmide pOK-*hrpE* (W10His) und pOK-*hrpE* (W10FLAG) wurden anschließend in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85E und 85E* konju-

giert. Die chromosomale *hrpE* Wildtyp-Kopie wurde durch zwei aufeinander folgende homologe Rekombinationsereignisse gegen die epitopmarkierten Varianten ausgetauscht (102). Die Kontrolle dieses Ereignisses konnte durch einen Restriktionsverdau erfolgen, da der Alanin-Glycin-Linker durch eine *NaeI*-Restriktionsschnittstelle kodiert wird.

Nach Erstellung der Insertionsmutanten sollte deren Funktionalität überprüft werden. Hierzu wurden die erhaltenen Insertionsmutanten zunächst auf ihre Fähigkeit zur Translokation von Effektoren in pflanzliche Zellen getestet. Als Reporter wurde das von 85E und 85E* kodierte Avirulenzprotein AvrBs1 verwendet, das in Paprikapflanzen des Kultivars ECW-10R („early californian wonder“) vom korrespondierenden Resistenzgen *BsI* erkannt wird und eine HR auslöst. Die Stämme 85E*hrpE*(W10His) und 85E**hrpE*(W10His) lösten eine dem Wildtyp vergleichbare HR aus, wohingegen 85E*hrpE*(W10FLAG) und 85E**hrpE*(W10FLAG) keine HR auslösten (Abb. 11A und nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bildet der Stamm 85E**hrpE*(W10His) Hrp-Pili, die morphologisch dem Wildtyp gleichen (Abb. 11B), während 85E**hrpE*(W10FLAG) keine Hrp-Pili bildet (nicht gezeigt).

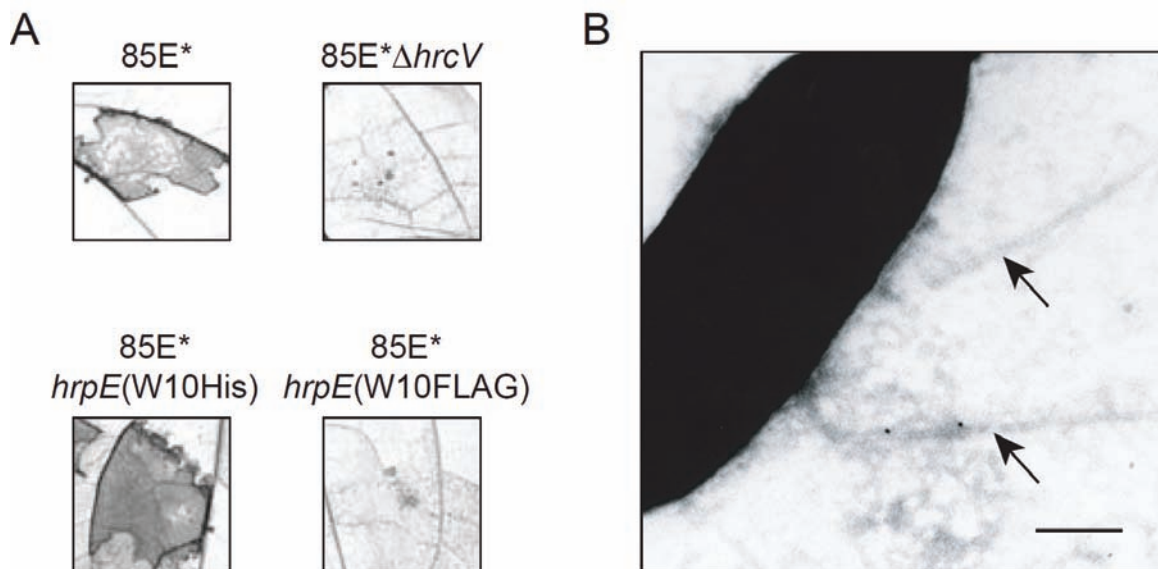


Abbildung 11: Charakterisierung der Epitop-markierten HrpE-Varianten.

(A) Die *Xanthomonas*-Stämme 85E*, 85E* Δ *hrcV*, 85E**hrpE*(W10His) und 85E**hrpE*(W10FLAG) wurden mit einer Dichte von 2×10^8 CFU/ml in fünf Wochen alte ECW-10R Paprikapflanzen inokuliert. Die pflanzlichen Phänotypen wurden nach zwei Tagen ausgewertet. Ausschnitte eines mit Ethanol entfärbten Blattes sind gezeigt. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Stammes 85E**hrpE*(W10His) nach vierstündiger Inkubation in MA 5,2. Die gebildeten Hrp-Pili gleichen denen des Wildtyps und sind durch Pfeile markiert. Der Balken entspricht 200 nm.

2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Sequenzhomologe von HrpE, der Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus in *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurden bisher nur in anderen *Xanthomonas*-Arten identifiziert. Bedingt durch seine Funktion als Hrp-Pilus Untereinheit sollte HrpE Sequenzabschnitte besitzen, die in die Polymerisierung der Untereinheiten, in die Verankerung mit der Basis des TTS-Systems und der Interaktion mit dem Translokon involviert sind. Auch sollte HrpE ein Typ-III-Sekretionssignal kodieren, da es selbst ein Substrat des TTS-Systems darstellt. Der vorangegangene Artikel beschreibt die Funktionszuordnung zu einzelnen HrpE Sequenzabschnitten.

In einer *in vitro*-Transpositionsreaktion wurden dreizehn Peptidinsertionsmutanten von HrpE erhalten, die fünf zusätzliche Aminosäuren kodieren (207). Die Analyse dieser Peptidinsertionsmutanten ermöglichte eine Einteilung in sechs phänotypische Klassen. Drei permissive Insertionsmutanten wurden im gering konservierten N-Terminus kartiert [*hrpE*(W10), *hrpE*(M18), *hrpE*(F21)]. Allerdings scheint bei *hrpE*(M18) und *hrpE*(F21) die Verankerung zur Basis des TTS-Systems gestört zu sein, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen der von diesen Insertionsmutanten gebildeten Hrp-Pili zeigten. Die beiden zentralen Insertionsmutanten *hrpE*(D53) und *hrpE*(Q56) sind in ihrer Interaktion mit der Pflanze stark beeinträchtigt [*hrpE*(D53)] oder nicht pathogen [*hrpE*(Q56)]. Beide Insertionsmutanten formen unter *in vitro*-Bedingungen keine Hrp-Pili, sind jedoch sekretionskompetent, was darauf hindeutet dass der Hrp-Pilus im Inneren der Basis des TTS-Systems fortgesetzt wird. Die vier im hoch-konservierten C-Terminus lokalisierten dominant-negativen Insertionsmutanten deuten an, dass dieser Bereich an der Polymerisierung beteiligt ist.

Die Analysen von HrpE_n-AvrBs3Δ2-Reporterkonstrukten zeigten, dass im HrpE N-Terminus ein Typ-III-Sekretionssignal, jedoch kein funktionelles Translokationssignal vorhanden ist. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für HrpE eine Zweidomänenarchitektur postuliert mit einer schwach konservierten N-terminalen oberflächenexponierten Domäne, die auch das Typ-III-Sekretionssignal beinhaltet, und einer hoch konservierten C-terminalen Polymerisierungsdomäne.

Studien an HrpA zeigten, dass diese beiden zueinander nicht homologen Hrp-Piline eine identische Domänenstruktur zu besitzen scheinen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Hydrophobizitätsprofile mehrerer nicht-homologer Hrp-Piline ein identisches Muster aufweisen. Trotz einer hohen Sequenzvariabilität scheinen die Hrp-Piline eine gemeinsame Architektur zu besitzen.

2.4 Die Hrp-Pilus Untereinheit HrpE von *X. campestris* pv. *vesicatoria* unterliegt einer positiven Selektion

2.4.1 Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Feb. 2006, p. 1405–1410
0021-9193/06/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.188.4.1405–1410.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 188, No. 4

Positive Selection of the Hrp Pilin HrpE of the Plant Pathogen *Xanthomonas*

Ernst Weber and Ralf Koebnik*

Institute of Genetics, Martin-Luther-University, 06099 Halle, Germany

Received 27 September 2005/Accepted 21 November 2005

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* possesses a type III secretion (TTS) system which is encoded by the 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster. The TTS system is necessary for pathogenicity in susceptible hosts and induction of the hypersensitive response in resistant plants. At the cell surface, the TTS system is associated with an extracellular filamentous structure, the Hrp pilus, which serves as a conduit for the transfer of bacterial proteins into the plant cell cytosol. The major pilus component, the HrpE pilin, is unique to xanthomonads. Previous work showed that HrpE contains two regions: a hypervariable surface-exposed domain, including the N-terminal secretion signal, and a C-terminal polymerization domain. In this study, the evolutionary rate of the *hrpE* gene was analyzed. Twenty-one alleles were cloned, sequenced, and compared with five known *hrpE* alleles. The ratio of synonymous (K_s) and nonsynonymous (K_a) substitution rates shows that parts of the HrpE N terminus are subjected to positive selection and the C terminus is subjected to purifying selection. The trade-off between positive and purifying selection at the very-N terminus allowed us to ascertain the amphipathic α -helical nature of the TTS signal. This is the first report of a surface structure from a plant-pathogenic bacterium that evolved under the constraint of positive selection and hints to the evolutionary adaptation of this extracellular appendage to avoid recognition by the plant defense surveillance system.

The type III secretion (TTS) system is a hallmark of many gram-negative bacterial pathogens. This specialized secretion system is responsible for the transport of proteins across the two bacterial membranes, across the host cell plasma membrane, and in some cases across the plant cell wall into the host cell interior. A defect in this system leads to a complete loss of bacterial pathogenicity, as demonstrated for the animal pathogens *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., and enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* and for the plant pathogens *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp., and *Xanthomonas* spp. (10). TTS systems are encoded by approximately 20 genes, 11 of which are conserved between different bacterial species, thus suggesting that they constitute the core of the secretion machinery. While the TTS apparatus is conserved, the secreted substrates differ considerably. The recognition of these proteins by the TTS system is still not well understood. The TTS signal is located in the first 15 to 20 amino acids of the protein and is not conserved on the amino acid level (17, 23). Additionally, the 5' region of the corresponding mRNA may contribute to recognition by the secretion machinery (1).

Our laboratory studies the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *vesicatoria*, which is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato plants. The TTS system of *X. campestris* pv. *vesicatoria* is encoded by the 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster, which is essential to cause disease in susceptible plants as well as to induce the hypersensitive response in resistant plants (9). A key component of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* pathoge-

nicity machinery is the Hrp pilus, which is thought to serve as a conduit for protein translocation between the bacterium and the plant host cell (30). The Hrp pilus is a filamentous structure that extends up to several micrometers from the bacterial cell surface and is mainly composed of a large number of identical pilin subunits, the 10-kDa HrpE protein, which is unique for the genus *Xanthomonas* (30). HrpE itself is a TTS substrate and harbors a secretion signal in the first 17 N-terminal amino acids (29). Sequence alignment and secondary structure predictions of five *hrpE* sequences showed that the very-C terminus is entirely conserved and predominantly α -helical, whereas the N terminus is hypervariable and mostly devoid of regular secondary structure. Reporter protein fusions and pentapeptide insertions demonstrated that HrpE contains two functional domains, a surface-exposed domain, including the TTS signal, and the polymerization domain (29). The sequence hypervariability of the surface-exposed domain prompted us to analyze the evolutionary rate of 26 *hrpE* sequences, representing *Xanthomonas* strains belonging to 14 different pathovars. Our results reveal different modes of selection acting on different portions of the protein. The N terminus of HrpE undergoes positive selection, whereas the C terminus is subjected to purifying selection. Since the positively selected parts are exposed at the surface of the assembled Hrp pilus, the plant pathogen *Xanthomonas* thus generates surface diversity, most probably to evade recognition by the plant perception and defense systems. Furthermore, we propose an amphipathic α -helix as the TTS signal of HrpE which is on one side highly conserved and polar and on the opposite side positively selected and hydrophobic.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The following pathovars/strains of *X. campestris* were used: alfalfae KS, amoraciae XA, begoniae 077-3382, citri 50E, dieffenbachiae 729, glycines 202, malvacearum G-34, phaseoli 85-6, vesicatoria

* Corresponding author. Mailing address: Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany. Phone: 49-345-5526293. Fax: 49-345-5527151. E-mail: koebnik@gmx.de.

56, vesicatoria 85-10, vignicola 81-30, and vitians 164 (4); amoraciae 3838, amoraciae 5 (48A), raphani 23, and raphani 25 (R. E. Stall, University of Florida, Gainesville); and amoraciae LMG535, amoraciae LMG7383, raphani LMG860, raphani LMG7505, and raphani LMG8134 (Belgium coordinated collections of microorganisms, Brussels, Belgium). *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in LB medium, and *Xanthomonas* strains were grown at 30°C in NYG broth (6) or on NYG 1.5% agar. Antibiotics were added to the medium at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml.

Sequence data. The coding regions of 21 *hrpE* alleles were amplified using PCR primers derived from conserved regions of *hrpD6* (*hrpE*_{up}, 5'-CAACATCGTCGCGCACATCGC) and *hpaB* (*hrpE*_{down}, 5'-TCGAATCGCGCGCTGCTCAT) located upstream and downstream of the *hrpE* coding sequence, respectively. For colony PCR, a single colony of each strain was used as the source of template DNA. PCR conditions were an initial 95°C step for 300 s, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 40 s, and a final step at 72°C for 10 min. PCR products were cloned into pCR 2.1-TOPO and transformed into DH10b (Invitrogen, Carlsbad, CA). Five clones of each *hrpE* allele were pooled and sequenced using vector-specific primers (TOPO TA cloning kit; Invitrogen).

Additionally, the *hrpE* nucleotide sequences of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 (GenBank accession number [AC] AF056246), *X. oryzae* pv. oryzae strain KACC 10331 (AC AE013598), *X. axonopodis* pv. glycines strain 8ra (AC AF499777), *X. axonopodis* pv. citri strain 306 (AC AE011665), and *X. campestris* pv. campestris strain ATCC 33913 (AC AE012221) were used for bioinformatic analyses.

Sequence analysis. The nucleotide sequences were translated and aligned using CLUSTAL X (26). The multiple alignment was then manually edited using the BIOEDIT program (11). The amino acid alignments were transposed back to the nucleotide sequence level to gain a codon-based alignment. Mean diversity estimates within sequences were performed with the MEGA 2 software, version 2.1 (15), using the modified Nei-Gajubori method with the Jukes-Cantor corrected distance and the complete-deletion-of-gaps option. Unweighted pair group method with averages (UPGMA) trees were constructed using PAUP 3.1.1 (25). Distances were determined by using the Kimura two-parameter model. Support for nodes was assessed with a bootstrap confidence level using 1,000 replicates.

Calculation of synonymous and nonsynonymous mean pairwise diversities. The method of Comeron, as implemented in the K-Estimator program, version 6.1 (5), was applied to test whether positive or purifying selection has taken place on *hrpE*. K-Estimator takes into account the divergence values, number of nucleotides or codons, the transition/transversion substitution ratio (α/β), the amino acid composition, and the G+C content at the third codon position. The confidence intervals for K_s and K_a were obtained by Monte Carlo simulations (5). Synonymous mean pairwise diversity per synonymous site (K_s) and nonsynonymous mean pairwise diversity per nonsynonymous site (K_a) were calculated with the complete-deletion-of-gaps option and a sliding window of 15 nucleotides with a step size of 9 nucleotides.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences for the 21 *hrpE* alleles were submitted to GenBank (accession numbers DQ286679 to DQ286699).

RESULTS

Rate of synonymous and nonsynonymous substitutions (K_s and K_a). To analyze the general extent of sequence variation in the genus *Xanthomonas*, we analyzed five genes from five *Xanthomonas* strains (Table 1). Generally, a neutral rate test compares the number of synonymous (silent) substitutions per synonymous site (K_s) with the number of nonsynonymous (amino acid-changing) substitutions per nonsynonymous site (K_a) in protein coding sequences. Thus, the ratio K_a/K_s measures the difference between the two rates, in which K_s is often regarded as a value of the underlying mutation rate (19). If an amino acid change is neutral, it will be fixed at the same rate as a synonymous mutation, with K_a/K_s of 1. If the amino acid change is deleterious, purifying selection will reduce its fixation rate, and thus K_a/K_s is <1. However, only if the amino acid change offers a selective advantage will it be fixed at a higher rate than a synonymous mutation, with K_a/K_s of >1 (positive

TABLE 1. Sequence variations of five genes among five *Xanthomonas* strains^a

Gene	Size (bp)	Mean pairwise value (10 ²)		K_a/K_s ratio
		K_s	K_a	
<i>hrpE</i>	279	49.4 ± 6.4	27.8 ± 4.3	0.560
<i>hrcS</i>	261	25.8 ± 4.8	0.80 ± 0.1	0.031
<i>hrcT</i>	828	22.2 ± 2.3	3.90 ± 0.6	0.170
<i>gapA</i> ^b	999	17.2 ± 1.8	0.70 ± 0.2	0.040
<i>mdh</i> ^b	987	18.8 ± 2.0	2.50 ± 0.5	0.130

^a *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3, *X. oryzae* pv. oryzae strain KACC 10331, *X. axonopodis* pv. glycines strain 8ra, *X. axonopodis* pv. citri strain 306, and *X. campestris* pv. campestris strain ATCC 33913.

^b *X. axonopodis* pv. glycines strain 8ra was not included in the analysis.

selection) (31). Three of the analyzed genes (*hrcS*, *hrcT*, and *hrpE*) are located in the *hrp* gene cluster and encode crucial components of the TTS system. For reference, two housekeeping genes, malate dehydrogenase (*mdh*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*), were used. The most notable feature is an unusually high level of amino acid substitutions in the *hrpE* gene product, which is reflected by the K_a value of 0.278 (Table 1). In contrast, the K_a values for *hrcT*, *hrcS*, *mdh*, and *gapA* are uniformly low and fall within the narrow range of 0.007 to 0.039. In addition, the K_s value for *hrpE* is strongly elevated (0.494) in comparison with those of *hrcT*, *hrcS*, *mdh*, and *gapA* (0.172 to 0.258) (Table 1). The K_a/K_s ratio, which describes the evolutionary rate of a protein coding sequence, is much higher for *hrpE* than for the other four genes. Although the K_a value does not exceed the K_s value for the full-length coding sequence of *hrpE*, this high value indicates that parts of *hrpE* may be subjected to positive selection.

Comparison of *hrpE* sequences. For a more detailed analysis, the *hrpE* regions of 21 *Xanthomonas* strains belonging to 12 pathovars were cloned and sequenced. The phylogenetic tree of all 26 *hrpE* sequences was constructed using the UPGMA method (Fig. 1). Interestingly, the genealogy revealed two major branches (groups I and II).

Five of 13 *hrpE* sequences in group I and 3 of 13 *hrpE* sequences in group II were identical. These siblings were excluded from further analyses. Figure 2 shows an amino acid sequence alignment of the nonredundant HrpE proteins. The last 24 amino acid residues of HrpE are highly conserved in all xanthomonads, suggesting that this region is crucial for HrpE function. Another conserved sequence motif (PxxxSxxxRxxQxxD) is located at the very-N terminus, whereas the region between the two conserved parts is hypervariable. Intriguingly, the conserved N-terminal amino acid pattern which corresponds to the TTS signal is predicted to form an α -helix (30). A helical wheel plot revealed that the conserved polar residues are located on one side of the helix, whereas the opposite side consists of hydrophobic amino acids (Fig. 3). These findings strongly suggest that the HrpE secretion signal is formed by an amphipathic α -helix.

Whether or not recombination in the *hrpE* sequence has occurred was analyzed by assessing the degree of phylogenetic congruence. Based on the amino acid sequence alignment (Fig. 2), the *hrpE* alleles were split into two halves: a variable region consisting of codons 4 to 50 and the relatively conserved region

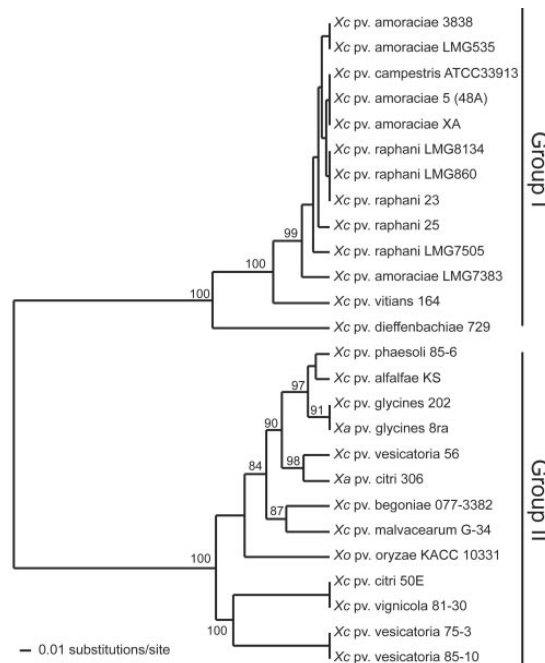


FIG. 1. UPGMA tree of *hrpE* sequences from 26 *Xanthomonas* strains. Numbers on branches indicate the number of times (percent) that the node was supported by 1,000 replicates of the bootstrap analysis (only values greater than 80% are shown).

encompassing codons 51 to 93. Phylogenetic trees were then estimated for each half. No significant differences in topologies of the trees were observed (data not shown), thus indicating that no recombination between *hrpE* alleles belonging to groups I and II had occurred.

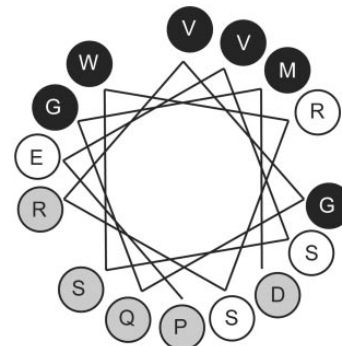


FIG. 3. Type III secretion signal of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 HrpE in a helical wheel representation. Conserved amino acids and hydrophobic residues are shaded in gray and black, respectively. The N-terminal proline residue is oriented to the bottom.

Modes of selection operating on *hrpE*. Using the enlarged set of *hrpE* sequences, we investigated whether certain parts of HrpE show different modes of selection. A sliding window analysis of K_a and K_s values was performed. Since the first amino acid of HrpE from group I and the first four amino acids of HrpE from group II give no substantial information, they were not considered. Windows in which K_a exceeded K_s (one tailed Z-test, $P < 0.05$) (Fig. 4A) were found in the N-terminal and central regions of the protein. This finding shows that diversifying selection had occurred at these regions. In contrast, K_s exceeded K_a in windows 98 and 215 to 266 (one tailed Z-test, $P < 0.05$ [Fig. 4A]; the number indicates the central nucleotide of the window), indicating that these regions evolved under purifying selection.

The observation that the *hrpE* sequences belong to two clearly distinct phylogenetic groups prompted us to analyze whether different modes of selection operated after separation

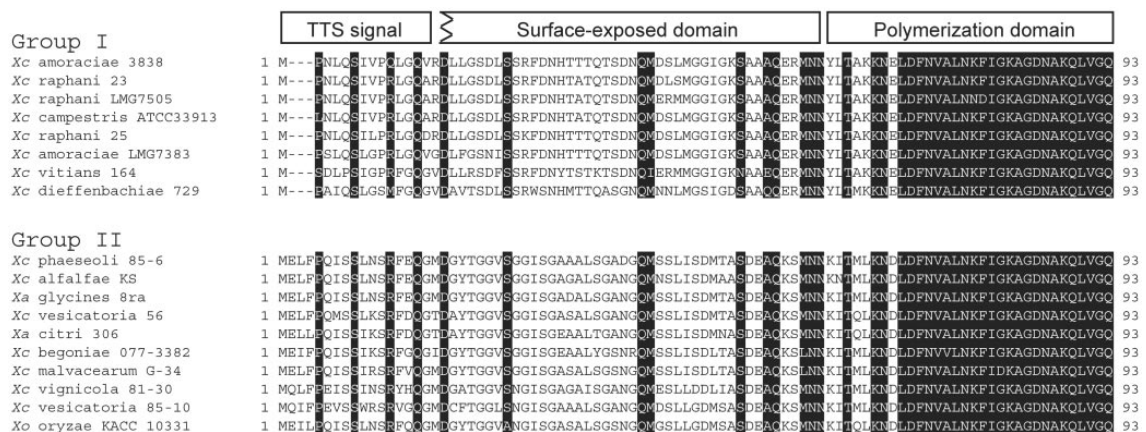


FIG. 2. Nonredundant amino acid sequence alignment of HrpE. HrpE sequences of group I and II xanthomonads were aligned using CLUSTAL X (26). Residues which are identical in at least 90% of the sequences are shown in white on a black background. Proposed functional domains are indicated on top of the alignment (29).

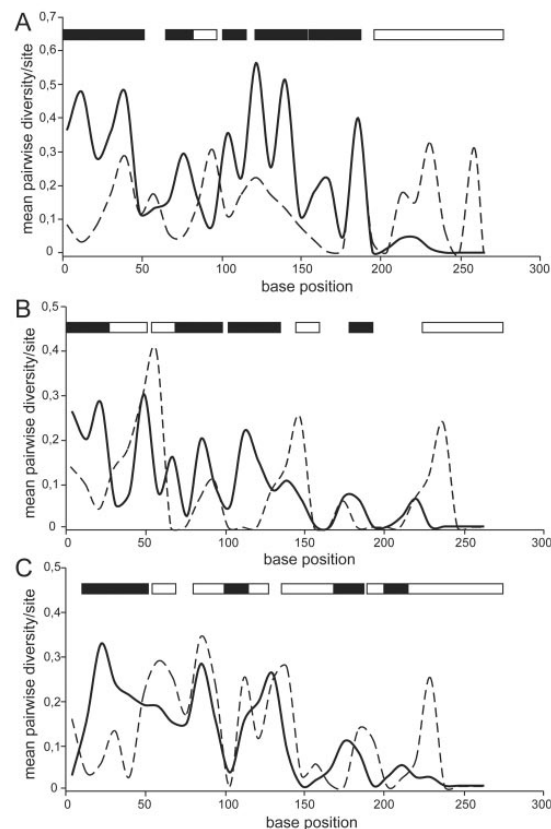


FIG. 4. Mean pairwise diversity plots of K_p and K_a values. The plots were constructed for windows of 15 nucleotides sliding along the *hrpE* sequence alignment. The first codon of group I and the first four codons of group II sequences are not included. (A) Comparison of all *hrpE* sequences. (B) Group I sequence comparison. (C) Group II sequence comparison. Filled boxes indicate the windows (step size of 9 nucleotides) in which nonsynonymous differences significantly exceed synonymous differences (one-tailed Z test, $P < 0.05$). White boxes indicate positions in the sequence where the reverse condition applies ($K_a > K_p$; $P < 0.05$) or sequences which are identical. Solid line, mean K_a ; dashed line, mean K_p .

of groups I and II. Individual analyses of group I and II sequences showed that positive selection occurred at the very-N terminus in both groups (group I, 8 to 26; group II, 17 to 44), whereas the C terminus was subjected to purifying selection (group I, 224 to 266; group II, 242 to 266) (Fig. 4B and C). Intriguingly, the intermediate parts of *hrpE* evolved differently in groups I and II. Most notably, the region between windows 71 and 125 shows strong signatures of positive selection in group I, while in group II this region evolved mainly under purifying constraints.

The positively selected positions are surface exposed. Certain modes of selection act often highly localized within genes. For many plant resistance proteins, plant chitinases, and the outer membrane porin PorB of *Neisseria meningitidis*, positive selection has been detected primarily for solvent-exposed

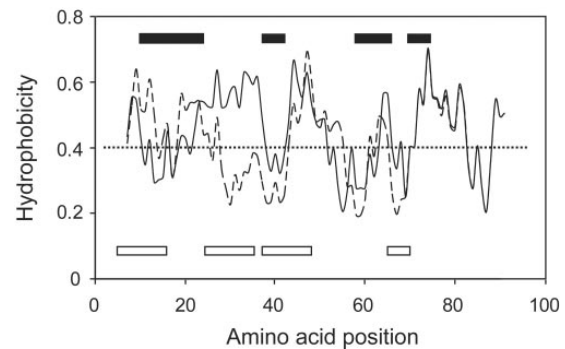


FIG. 5. Positively selected parts of HrpE are surface exposed. Mean hydrophobicity plots of group I (dashed line) and group II (solid line) HrpE proteins were calculated over a sliding window of five amino acid residues, using the Kyte and Doolittle hydrophobicity scale (16). Values below 0.4 are considered hydrophilic. Positively selected parts in groups I and II are indicated by open and filled boxes, respectively.

amino acids (3, 7, 28). Since solvent-exposed parts of a protein are in general rather hydrophilic and core regions of proteins are more hydrophobic, we performed hydrophobicity plot analyses of groups I and II and compared the localizations of positively selected and hydrophilic regions. As shown in Fig. 5, the HrpE regions which are positively selected in group I or II correspond to hydrophilic regions. Of special interest is the region between amino acids 25 and 35, which is hydrophilic in group I and hydrophobic in group II. This different physicochemical character is perfectly reflected by different modes of selection, indicating that this region might be surface exposed and therefore positively selected in group I. Notably, for the C-terminal hydrophilic region an indication of positive selection is missing. This finding may be related to the proposed function of this domain in the polymerization process (29).

DISCUSSION

Many gram-negative plant pathogens possess a surface-exposed Hrp pilus that mediates the long-distance transport of TTS substrates across the plant cell wall. Although the major pilus subunits of different genera do not share sequence homology, they share several features with each other, such as small size (6 to 11 kDa), predominantly α -helical secondary structure, and sequence hypervariability (14). Interestingly, sequence hypervariability is not only observed between different species but also between pathovars of the same species (12). In this study, we analyzed the sequence variability of the *Xanthomonas* Hrp pilus subunit HrpE, showed that the observed sequence hypervariability is caused by positive selection, and speculated about the biological significance of hypervariability.

A sliding window analysis of 18 *hrpE* alleles revealed several regions in the N-terminal two-thirds in which K_a exceeds K_s , thus indicating that these regions are positively selected. In contrast, the far C terminus is almost identical or subjected to purifying selection in all *Xanthomonas* sequences. Positive selection has been reported as a beacon for proteins involved in genetic conflict and has been documented in genes that encode

surface proteins of pathogen (2, 28) and host defense systems, such as the human major histocompatibility complex (13), plant chitinases (3), and plant resistance genes (7). The correlation between positive selection and host-pathogen interactions is particularly strong. For example, a GenBank survey uncovered remarkably few sequences (0.45%) evolving under positive selection, but more than half of these sequences were involved in host-pathogen interactions (8). Only six examples of bacterial surface proteins which have undergone positive selection have been described, but all of them originated from animal pathogens (27). This is the first report of a surface protein from a plant pathogen that is subjected to positive selection. This points to an unexpected analogy between animal and plant pathogenic bacteria in their strategy to avoid recognition by the host.

Despite the lack of an adaptive immune system, plants possess recognition capacities for several microbial compounds often indispensable for the microbial lifestyle. This set of general elicitors are referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and include the eubacterial flagellin, lipopolysaccharide of gram-negative bacteria, fungal cell wall-derived glucans, chitins, mannans, and surface proteins of microbial pathogens (20). An Hrp pilus of 500 nm in length would consist of approximately 1,000 HrpE subunits. As an abundant key component of the TTS system which is crucial for pathogenicity, HrpE would be a prime candidate to act as a PAMP. However, there is no report of a plant species or cultivar which has evolved a mechanism to detect HrpE or Hrp pilins from other plant pathogens as a PAMP.

Diversification of the Hrp pilus surface by positive selection acting on surface-exposed parts of the protein would make perfect sense in order to conceal the attack by *Xanthomonas* spp. Such a surface-limited diversification is a well-known strategy of human pathogenic bacteria (2, 28). Indeed, in both phylogenetic groups of *Xanthomonas* a remarkable correlation between hydrophilic regions and positive selection was found. Notably, only the first four hydrophilic stretches of the HrpE sequence were positively selected, whereas the C-terminal hydrophilic stretch was not. These findings are in perfect agreement with the proposed domain structure of HrpE (29). In this previous work it was found that the N-terminal two-thirds of the protein are tolerant to pentapeptide insertions, whereas the C-terminal third is not. Moreover, we isolated four dominant-negative insertions in the C-terminal third, thus supporting our hypothesis that this domain is conserved due to its function in polymerization. In line with this model, the C-terminal hydrophilic stretch would be hidden within the assembled Hrp pilus, and varying this sequence would give no selective advantage. In conclusion, the N-terminal surface-exposed domain functions as a camouflage suit for the highly conserved assembly domain at the C terminus.

An alternative mechanism to achieve sequence variation is based on a high frequency of recombination, as has been reported for components of the outer membrane or cell surface appendages of mammalian pathogens, such as the outer membrane protein PorB and the pilus protein Pile of *N. meningitidis* and the flagellin FliC of pathogenic *E. coli* (2, 22, 28). However, we did not observe discrepancies in the phylogenies between the full-length sequence and the separately analyzed N-terminal and C-terminal halves, indicating that recombina-

tion is not responsible for the diversification of *hrpE*. This finding is supported by the absence of a second copy of *hrpE*-related sequences in the completely sequenced genomes of five *Xanthomonas* strains. Interestingly however, the plant pathogens *P. syringae* and *R. solanacearum* possess a second copy of their Hrp pilin genes. It has been speculated that these second copies might act as capping or scaffolding proteins (12). Alternatively, one might speculate about a possible role of these extra genes in surface variation.

The very-N terminus of HrpE was shown to serve as a TTS signal (29). Despite 15 years of intense research, and even with the three-dimensional structures of the N termini of TTS substrates at hand, the nature of the TTS signal is still enigmatic (24). The fact that the N termini of these substrates do not share any obvious consensus sequence at the primary sequence level makes it difficult to understand how TTS substrates are recognized and secreted even by heterologous TTS machineries (24). Comparisons of *Yersinia* TTS substrates indicated that a more general property serves as secretion signal. Yersinial secretion signals consist of an amphipathic series of randomly alternating polar and hydrophobic residues, and even synthetic amphipathic signals consisting of serine and isoleucine were able to mediate secretion of a reporter protein (18). Similar biophysical features were identified in TTS substrates from the plant pathogen *P. syringae* (21). However, amphipathic N-terminal sequences derived from cytosolic components of the yersinial Yop regulon did not promote secretion of the reporter protein YopE (17). These findings imply that, in addition to the amphipathic character, there must be a sequence dependence on N-terminal secretion signals that is currently not understood.

While most studies on TTS signals have compared the N termini of distantly related or unrelated TTS substrates or have introduced point mutations into the N terminus of TTS substrates (21, 24), we analyzed a set of naturally occurring HrpE variants. From previous work it is known that the HrpE TTS signal is located in the first 17 amino acids (29). Since all HrpE N termini were obtained from pathogens, it is reasonable to assume that they are all functional TTS signals. The trade-off between sequence diversification (to avoid host recognition) and functional conservation (to allow secretion) operating at the HrpE N terminus offered a unique advantage to identify residues and principles that are of crucial importance for function as a TTS signal. The α -helix that would be formed by the amphipathic N-terminal sequence displays a polar and a hydrophobic side. In addition to the conserved amphipathic character of the α -helix, the five amino acid residues at the polar side seem to be critical for function, as indicated by their strong conservation. Probably, these two features are crucial for function of the HrpE TTS signal. To what extent this rule may apply to other TTS substrates remains to be clarified in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ulla Bonas for generous support of this study, Hannelore Espenhahn for excellent technical assistance, Jens Boch, Daniela Büttner, Sabine Kay, Diana Kühn, and Ute Wahrmond for critical reading of the manuscript, and Martin Beye and Martin Hasselmann for fruitful discussions.

E.W. was supported by a GradFG fellowship from Sachsen-Anhalt.

REFERENCES

1. Anderson, D. M., and O. Schneewind. 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**:1140–1143.
2. Andrews, T. D., and T. Gojobori. 2004. Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the PilE protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics* **166**:25–32.
3. Bishop, J. G., A. M. Dean, and T. Mitchell-Olds. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5322–5327.
4. Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:81–88.
5. Comeron, J. M. 1999. K-Estimator: calculation of the number of nucleotide substitutions per site and the confidence intervals. *Bioinformatics* **15**:763–764.
6. Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyk, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* **3**:3323–3328.
7. Ellis, J., P. Dodds, and T. Pryor. 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci.* **5**:373–379.
8. Endo, T., K. Ikeo, and T. Gojobori. 1996. Large-scale search for genes on which positive selection may operate. *Mol. Biol. Evol.* **13**:685–690.
9. Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas. 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:390–396.
10. Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:771–795.
11. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**:95–98.
12. He, S. Y., K. Nomura, and T. S. Whittam. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:181–206.
13. Hughes, A. L., and M. Nei. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**:167–170.
14. Koebnik, R. 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol.* **9**:586–590.
15. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244–1245.
16. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105–132.
17. Lloyd, S. A., A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and M. S. Francis. 2001. Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**:367–371.
18. Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* **39**:520–531.
19. Miyata, T., T. Yasunaga, and T. Nishida. 1980. Nucleotide sequence divergence and functional constraint in mRNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7328–7332.
20. Nürnberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**:249–266.
21. Petnicki-Owiewja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer, and J. R. Alfano. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7652–7657.
22. Reid, S. D., R. K. Selander, and T. S. Whittam. 1999. Sequence diversity of flagellin (*fljC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:153–160.
23. Schechter, L. M., K. A. Roberts, Y. Jamir, J. R. Alfano, and A. Collmer. 2004. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J. Bacteriol.* **186**:543–555.
24. Sorg, J. A., N. C. Miller, and O. Schneewind. 2005. Substrate recognition of type III secretion machines—testing the RNA signal hypothesis. *Cell. Microbiol.* **7**:1217–1225.
25. Swofford, D. L. 1993. PAUP: phylogeny analysis using parsimony, version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill.
26. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876–4882.
27. Tümmler, B., and P. Cornelis. 2005. Pyoverdine receptor: a case of positive Darwinian selection in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**:3289–3292.
28. Urwin, R., E. C. Holmes, A. J. Fox, J. P. Derrick, and M. C. Maiden. 2002. Phylogenetic evidence for frequent positive selection and recombination in the meningococcal surface antigen PorB. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1686–1694.
29. Weber, E., and R. Koebnik. 2005. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **187**:6175–6186.
30. Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik. 2005. The type III-dependent Hrp Pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**:2458–2468.
31. Yang, Z., and J. P. Bielawski. 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* **15**:496–503.

2.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hrp-Piline verschiedener pflanzenpathogener Bakterien zeigen trotz ihrer Ähnlichkeiten im Bereich der physikochemischen Eigenschaften, der Hydrophobizitätsprofile und der vorhergesagten Sekundärstruktur nur eine geringe Sequenzähnlichkeit auf Primärstrukturebene. Diese hohe Sequenzvariabilität der Hrp-Piline wird bereits zwischen verschiedenen Pathovaren derselben bakteriellen Art beobachtet. Im Falle des Hrp-Pilins HrpE aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist die Sequenz des oberflächenexponierten N-Terminus hypervariabel, wohingegen die C-terminale Polymerisierungsdomäne hoch konserviert ist. In der vorangegangenen Arbeit wurden die evolutionären Einflüsse untersucht, die der Hypervariabilität des *hrpE*-N-Terminus zugrunde liegen. Eine Methode zur Analyse dieser Einflüsse ist die Bestimmung des Verhältnisses der nicht-synonymen Austauschraten (K_a) und der synonymen Austauschraten (K_s). Hierzu wurden 21 *hrpE*-Allele (Haplotypen) 14 verschiedener Pathogen-Varietäten kloniert und sequenziert. Das Verhältnis der K_a - und K_s -Werte belegte, dass Teile des N-Terminus dem Einfluss der Diversifikation der Sequenz unterliegen („positive selection“), der C-Terminus jedoch unter einem die Sequenz bewahrenden Evolutionsdruck steht („purifying selection“). Die positiv selektierten Sequenzbereiche stimmen hierbei mit den hydrophilen Bereichen von HrpE überein. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass präferenziell die an der Oberfläche des Hrp-Pilus zugänglichen Sequenzbereiche variiert werden, um so möglicherweise der Erkennung des extrazellulären Hrp-Pilus durch pflanzliche Abwehrsysteme zu entgehen.

Der Sequenzvergleich der HrpE-Varianten zeigte neben dem nahezu identischen C-Terminus ein weiteres konserviertes Muster, das im N-Terminus lokalisiert ist. Dieses Muster ist nahezu deckungsgleich mit dem identifizierten Sekretionssignal von HrpE. In Sekundärstrukturvorhersagen erscheint dieser Bereich α -helikal. Die Projektion dieser Sequenz in eine α -helikale Darstellung zeigte, dass das HrpE-Sekretionssignal wahrscheinlich eine amphipathische α -Helix bildet. Die eine Seite der α -Helix wird von den konservierten polaren Resten gebildet, während die andere aus hydrophoben Resten besteht. Trotz der positiven Selektion der hydrophoben Aminosäuren ist der amphipathische Charakter des HrpE-Sekretionssignals konserviert.

2.5 Verfeinerung der *hrpD* und *hrpE* Operonstruktur von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

2.5.1 **Manuskript:** Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrpD* and *hrpE* operon structure.

(zur Veröffentlichung in *Molecular Plant-Microbe Interactions*)

Ernst Weber^{*}, Carolin Berger[†], Ulla Bonas and Ralf Koenig

Institute of Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg, D-06099 Halle, Germany

^{*} Corresponding author. Mailing address: Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany. Phone: +49-345-5526296. Fax: +49-345-5527151. E-mail: Ernst.weber@gmx.de.

[†] Present address: Institute of vegetable and ornamental crops, Department of Plant Health, 14979 Großbeeren, Germany

Running title: *hrpD* and *hrpE* operon structure

ABSTRACT

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* possesses a type III secretion (TTS) system which is encoded in the 23-kb *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster. The TTS system is essential for pathogenicity in susceptible hosts and the induction of the hypersensitive response in resistant plants. In this study, we revisited the operon structure of the right part of the *hrp* gene cluster. Based on complementation experiments of transposon insertions and RT-PCR analyses the *hrpD* operon contains *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS* and *hpaA*, whereas *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* belong to the *hrpE* operon. We show that there is a PIP box containing promoter upstream of *hrcD* and determine the transcriptional start site of the *hrpE* operon. Conserved secondary mRNA structure in the intergenic region between *hrpD6* and *hrpE* suggests a posttranscriptional regulatory mechanism. Comparison of different group II *hrp* gene clusters and the analysis of the evolutionary rates suggest that the *hrpE* transcriptional unit was affiliated to the core *hrp* gene cluster at a later time.

INTRODUCTION

The bacterial genus *Xanthomonas* includes a wide range of important plant pathogenic species infecting more than 120 monocotyledonous and 260 dicotyledonous plant species. The different pathovars (pv.) elicit a wide range of disease symptoms, like leaf spots and necrosis in host plants, and a hypersensitive response (HR) in resistant plants (Chan and Goodwin, 1999). The hypersensitive response is a rapid, local, programmed cell death that is induced upon recognition of the pathogen and is concomitant with the inhibition of pathogen growth within the infected plant tissue (Klement, 1982).

X. campestris pv. *vesicatoria* is the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato plants and represents a model organism for the study of plant-pathogen interactions. The bacterial ability to grow and to cause disease on host plants, as well as to elicit the HR in resistant hosts, is dependent on the *hrp* genes (hypersensitive response and pathogenicity) which are organized in a contiguous 23-kb *hrp* gene cluster (Bonas et al., 1991). *hrp* gene clusters have been identified in most Gram-negative plant pathogenic bacteria, including *Erwinia chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (AC AY898625), and pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas* (Bauer et al., 1994, Boucher et al., 1987, Frederick et al., 2001, Gürlebeck et al., 2006, Lindgren et al., 1986). Based on common regulatory components and the genetic organisation of the respective *hrp* gene clusters, they were classified into two main groups. *Erwinia* spp., *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, and *P. syringae* form group I, while *Xanthomonas* spp., *A. avenae*, and *R. solanacearum* constitute group II (Alfano and Collmer, 1997). The classification does not reflect the evolutionary relationship of the species; and suggests that the *hrp* gene cluster has been transferred horizontally among phylogenetically unrelated bacteria (Gophna et al., 2003).

The 23-kb *hrp* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria* contains at least six transcriptional units designated *hrpA* to *hrpF* (Bonas et al., 1991). The majority of the gene products in the *hrp* gene cluster are involved in the assembly of a type III secretion (TTS) system. The TTS system is a specialized secretion system that transports proteins across the two bacterial membranes, the plant cell wall, and the host cell plasma membrane into the host cell cytoplasm. Eleven genes of the *hrp* gene cluster are conserved among plant and animal pathogens and, therefore, have been renamed *hrc* (hrp conserved) genes (Bogdanove et al., 1996, Weber et al., 2005). Eight *hrc* gene products are associated with bacterial membranes and build up a trans-envelope multiprotein complex (He et al., 2004). The remaining three Hrc proteins, predicted to be localized in

the bacterial cytoplasm, are probably involved in energizing the transport process (Gonzalez-Pedrajo et al., 2002, Pozidis et al., 2003). While the *hrc* gene products are encoded by the *hrpA*, *hrpB*, *hrpC* and *hrpD* operons, the *hrpE* and *hrpF* transcriptional units encode *hrp* and *hpa* genes (*hrp* associated) which are only found in other *Xanthomonas* strains. HrpE is encoded by the first ORF of the *hrpE* operon and is the major subunit of a filamentous structure, the Hrp pilus. The Hrp pilus extends up to several micrometers from the bacterial cell surface and is thought to serve as a conduit for protein translocation from the bacterium into the plant host cell (Weber et al., 2005). The second and third ORF in the *hrpE* operon correspond to *hpaB* and *hpaE*, respectively. HpaB acts as a general chaperone for TTS system-dependent secreted proteins, while the role of *hpaE* in pathogenicity is unclear (Büttner et al., 2004, Büttner et al., 2006). HrpF, encoded by the only gene in the *hrpF* transcriptional unit, presumably inserts into the host plasma membrane as part of a channel-like protein complex, which is essential for the translocation of effector proteins across the plant plasma membrane (Büttner et al., 2002, Rossier et al., 2000).

The expression of the genes in the *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* region is regulated by environmental signals. During bacterial growth in complete media the *hrp* regulon is expressed at a very low level, however expression is induced in plant tissue or in specific minimal media that are probably mimicking *in planta* conditions (Schulte and Bonas, 1992). *hrp* gene expression is controlled by two regulatory genes, *hrpG* and *hrpX*. HrpG is a member of the OmpR family of two-component response regulators and activates, in most cases via the AraC-type regulator HrpX, a large regulon including the *hrp* operons and genes for type III effector proteins (Noel et al., 2001, Wengelnik and Bonas, 1996, Wengelnik et al., 1999). A conserved DNA motif (TTCGC-N₁₅-TTCGC), designated as PIP box (plant inducible promoter), has been identified in several *hrp* promoters and was therefore proposed to act as a *cis*-regulatory element essential for HrpX-dependent regulation (Fenselau and Bonas, 1995). Indeed, base substitutions in the PIP box resulted in a reduction of the HrpX-dependent gene expression in *X. oryzae* pv. *oryzae* (Tsuge et al., 2005). PIP box promoters have been described upstream of the *hrpB*, *hrpC*, and *hrpD* transcriptional units. However, no PIP box-like element is present in a reasonable distance of the transcriptional start site of the *hrpE* operon, although it is also HrpX-dependent regulated (Weber et al., 2005, Wengelnik and Bonas, 1996). Furthermore no promoter activity could be identified in the region 1.2 kb upstream of *hrpE*, which encompasses *hrcD* and *hrpD6*. These findings suggested that the *hrpE* promoter is situated further upstream and that *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* may be located on the same

transcriptional unit. However, in the initial complementation analyses based on Tn3-*gus* insertions, no insertions were obtained in the genes *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* (Bonas et al., 1991).

These results encouraged us to revisit the operon structure of the *hrpD* and *hrpE* region. In this work we assign the genes *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* to the *hrpE* operon and identify its promoter harbouring an yet not considered PIP box which is conserved in all *Xanthomonas* strains.

RESULTS

Complementation analysis of the right region of the *hrp* gene cluster.

The operon structure of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster was determined by complementation analyses of Tn3-*gus* mutants (Bonas et al., 1991). A well-validated operon structure was obtained for the operons *hrpA* to *hrpC*. For the *hrpD* and *hrpE* operons, no transposon insertion had been isolated in the genes *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE*, which made it difficult to allocate these genes to their corresponding operons. However, detailed sequence analyses suggested the assignment of *hrcD* and *hrpD6* to the *hrpD* operon, because they appeared to have overlapping translational start codons with their upstream genes *hpaA* and *hrcD*, respectively. The end of the *hrpD6* CDS and the start of the *hrpE* CDS are separated by 82 bp. Therefore, *hrpE* was assigned with *hpaB* and *hpaE* to the *hrpE* operon.

To revisit the organization of the transcription units present in the right *hrp* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria* we performed complementation analyses with strains carrying transposon insertions in the promoter region upstream of *hrcQ* (strain 85-10::D140), in *hpaA* (strain 85-10::D29), and *hpaB* (strain 85-10::E75), as used in our previous study (Bonas et al., 1991) (Fig. 1A). Here, we also included transposon insertions in *hrcD* (strain 85-10::D506), *hrpD6* (strain 85-10::DGPS), and *hrpE* (strain 85-10::E84) (Table 1). The insertion sites were mapped by DNA-sequencing or restriction enzyme analysis. For complementation, the non-pathogenic chromosomal transposon mutants were supplemented with cosmids carrying transposon insertions in the promoter region upstream of *hrcQ* (pD140), in *hrcD* (pD506), in *hrpE* (pE84) or *hpaB* (pE75) (Fig. 1B). From each experiment, two transconjugants were inoculated into pepper cultivar ECW-10R to test for their ability to elicit an HR. Transposon insertions that failed to

complement each other *in trans* were considered to be in the same complementation group. The results of the complementation experiments show that *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* belong to the same operon, hereafter referred to as the *hrpE* operon, distinct from *hpaB* (Fig. 1A).

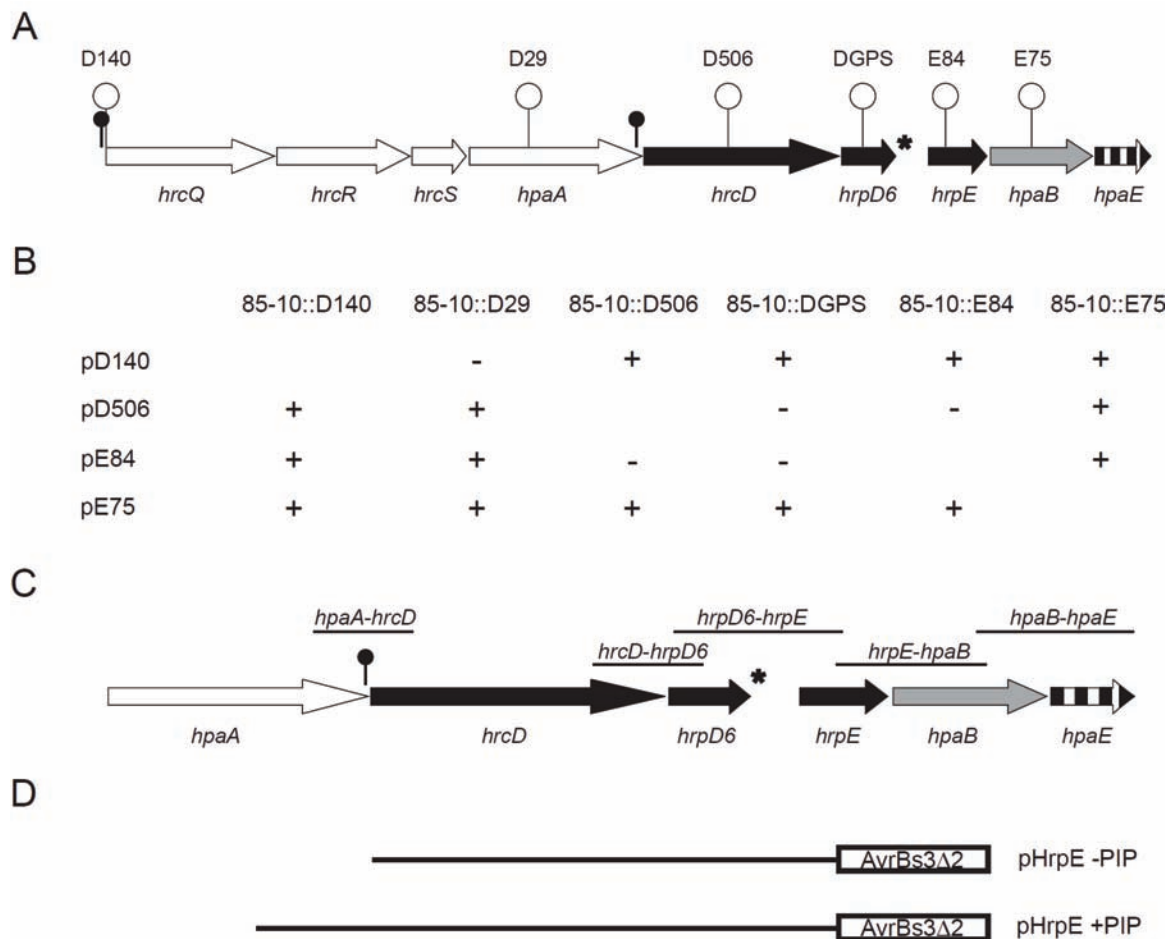


Fig. 1. Transcriptional organization and complementation analysis of the *hrpD* to *hrpE* region from *X. campestris* pv. *vesicatoria*. (A) Operon structure based on the complementation data presented in (B). *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* constitute the *hrpE* operon (filled arrows), which is located between the *hrpD* operon, formed by *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, and *hpaA* (open arrows), and *hpaB* (grey arrow). Open lollipops represent transposon insertions, small filled lollipops label predicted PIP boxes, the asterisk refers to the putative transcriptional start site upstream of the *hrpE* gene (Weber et al., 2005). (B) Cosmids carrying the *hrp* gene cluster with transposon insertions in the promoter upstream of *hrcQ* (pD140), in *hrcD* (pD506), in *hrpE* (pE84) and *hpaB* (pE75) were conjugated into the indicated strains carrying chromosomal transposon insertions. The transconjugants were tested on pepper cultivar ECW-10R for induction of an HR. + HR induction; - no HR induction. (C) Localization of the RT-PCR fragments spanning the intergenic regions of the indicated genes. (D) *hrpE* promoter-HrpE-AvrBs3 Δ 2 fusions in plasmid pL6GW356.

Identification of transcripts in the *hrpD* and *hrpE* region.

The surprising fact that *hrpD6* and *hrpE*, separated by 82 bp, belong to the same operon prompted us to confirm the complementation data by RT-PCR. Furthermore, we tested whether *hpaE*, the former third gene of the original *hrpE* operon, is transcribed together with *hpaB*. RT-PCR analyses were performed using cDNA derived from RNA isolated from strains 85-10 and 85* as templates. 85-10 and its derivative 85* differ in their *hrp* gene expression status. Strain 85* expresses a mutated form of the key regulatory gene *hrpG* (*hrpG**) leading to constitutive expression of the *hrp* genes under normally non-inducing conditions (Wengelnik et al., 1999). The oligonucleotides were designed in such a way that each primer pair anneals to two neighbouring genes, thus creating only a PCR product when the gene pairs were transcribed together (Fig. 1C). In the case of cDNA from 85*, PCR products spanning *hrcD-hrpD6* and *hrpD6-hrpE* were obtained, whereas no signal were detectable for *hpaA-hrcD*, *hrpE-hpaB*, and *hpaB-hpaE* (Fig. 2). As expected, no transcripts were detectable for 85-10. These data support the presence of a transcript spanning the genes *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE* under *hrp* gene inducing conditions. This result confirms the *hrpE* operon structure and suggests that *hpaB* and *hpaE* are transcribed independently from *hrpE*.

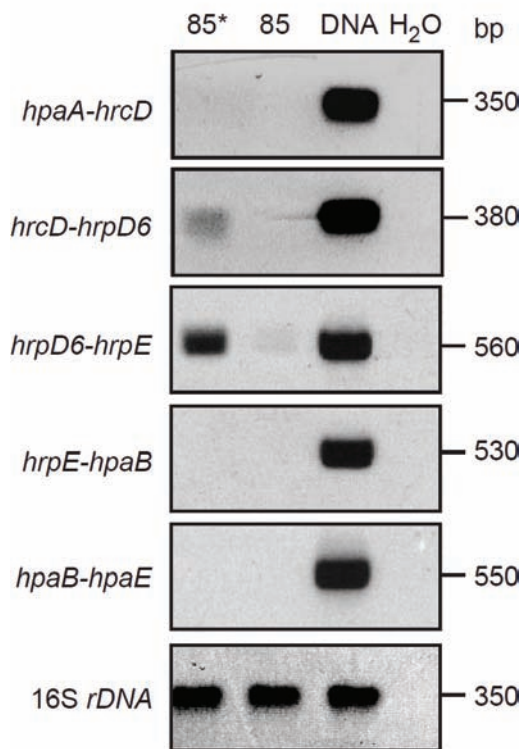


Fig. 2. Expression profiles of the *hpaA* to *hpaE* region. Neighbouring genes were analysed for common transcripts by RT-PCR analysis of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10 and 85* grown in NYG. Genomic DNA and water serves as positive and negative control of the PCR, respectively. 16S ribosomal DNA was used as a standard (*rDNA*). RT-PCR samples were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

Mapping of the transcriptional start site of the *hrpE* operon.

From promoter studies with *hrp::Tn3-gus* (β -glucuronidase) fusions it was known that the *hrpE* gene has a basal transcription level in complete medium which is up-regulated in XVM2 minimal medium and *in planta* (Wengelnik and Bonas, 1996). Primer extension analysis defined the transcriptional start site of *hrpE*, but no regulatory sequences like a PIP box or canonical sequence elements of σ 70-regulated promoters were found in a reasonable distance (Weber et al., 2005). Based on the new *hrpE* operon structure we scrutinized the *hrcD* region and found a perfect PIP box overlapping with the predicted translational start of *hrcD*. Interestingly, this PIP box is conserved between all six sequenced *Xanthomonas* strains. This finding directed us to perform 5'-RACE experiments to define the transcriptional start site of the *hrpE* operon (Fig. 3A). DNA-sequencing of the RACE clones indicated that *hrpE* transcription starts at the adenosine 44 bp downstream of the PIP box, preceded by a possible -10 region (Tsuge et al., 2005). For this reason the translational start of *hrcD* had to be relocated. A potential translational start codon with a reasonable Shine-Dalgarno sequence is located 91 codons downstream of the previously predicted translational start and would result in a smaller HrcD protein consisting of 221 amino acids (24 kDa).

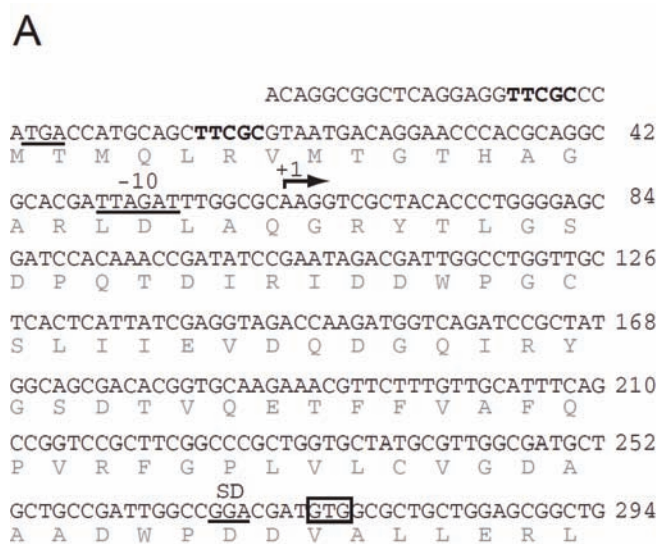
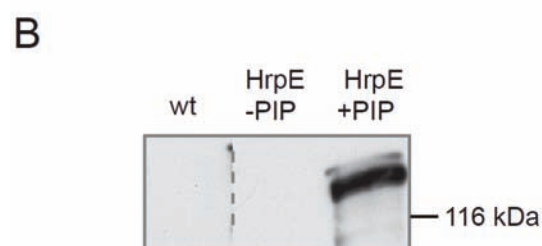


Fig. 3. DNA sequence of the region between *hpaA* and *hrcD*. The sequence presented starts 24 bp upstream of the predicted *hrcD* start codon. The TGA stop codon of *hpaA* is underlined and the predicted PIP box is shown in bold. An arrow indicates the transcriptional (+1) start site of the *hrpE* transcriptional unit, as identified by 5'-RACE, preceded by a possible -10 region. The first possible translational start codon is boxed, SD (Shine-Dalgarno) refers to a putative ribosome binding site. The sequence of the deduced translation product is given in the single-letter code below the DNA sequence. (B) Expression of the HrpE-AvrBs3 Δ 2 fusion protein. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E* (wt) containing pHrpE -PIP or pHrpE +PIP was incubated in MA medium. Total protein extracts were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and analysed by immunoblotting using an antiserum directed against AvrBs3.



The PIP box promoter upstream of *hrcD* is responsible for HrpE expression.

To clarify the point whether the PIP box promoter upstream of *hrcD* is essential and sufficient for the expression of HrpE, or whether another internal promoter localized between *hrcD* and *hrpE* might drive the expression of HrpE, a translational fusion between HrpE and the reporter protein AvrBs3 Δ 2 was constructed. This N-terminal deletion derivative of the *X. campestris* pv. *vesicatoria* effector protein AvrBs3 serves as an established translational reporter in our group. The expression of the fusion protein was under control of 1.7 or 1.2 kb *hrpE* upstream sequence, harbouring or not the PIP box promoter in front of *hrcD* (pHrpE +PIP, pHrpE –PIP) (Fig. 1D). The AvrBs3 Δ 2 fusion constructs were introduced into *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E*, which lacks the *avrBs3* gene. Western blot analysis of total protein extracts demonstrated that HrpE-AvrBs3 Δ 2 was expressed only under control of 1.7 kb *hrpE* upstream sequence, but no signal was detected in case of the 1.2 kb fragment (Fig. 3B). This result clearly shows that the promoter, which controls the expression of the *hrpE* gene is located upstream of *hrcD* and that no additional internal promoter exists.

Secondary structure of the intergenic *hrpD6-hrpE* region

Based on the absence of a promoter immediately upstream of the *hrpE* gene it seems unlikely that the mRNA termination site in the intergenic region between *hrpD6* and *hrpE*, as revealed by primer extension experiments, represented a transcriptional start site. Interestingly, in many fimbrial gene clusters mRNA processing has been described as part of a posttranscriptional regulatory mechanism (Balsalobre et al., 2003, Nilsson and Uhlin, 1991). Since mRNA secondary structures are often involved in the stabilization of the resulting mRNAs we compared the intergenic region of *hrpD6* and *hrpE* for conserved mRNA secondary structures. Therefore, we analysed the intergenic regions of the two sequenced *Xanthomonas* strains that are most divergent, *X. campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*, and which share only 69 % of sequence identity (Weber and Koebnik, 2006). To find the lowest free energy structure common to these two unaligned RNA sequences, we applied the Dynalign algorithm. The advantage of this approach is the significant improvement in accuracy of structure prediction by finding shared structural elements. Since Dynalign minimizes a free energy equation that does not depend on the sequence identity, common secondary structures can be found for homologous sequences which are phylogenetically widely separated (Mathews, 2005). The computational analyses of the intergenic regions revealed a conserved secondary structure formed by three stem-loops (labelled I-III) (Fig. 4). In contrast to the conserved

position and length of the stems, the loops, especially loop I and III, exhibit a higher sequence divergence. Interestingly, the identified mRNA termination point is located in the single-stranded region immediately upstream of loop I and may therefore represent an mRNA processing site, resulting in a transcript of the *hrpE* gene which is stabilized by three conserved mRNA stem-loops in its 5'-untranslated region.

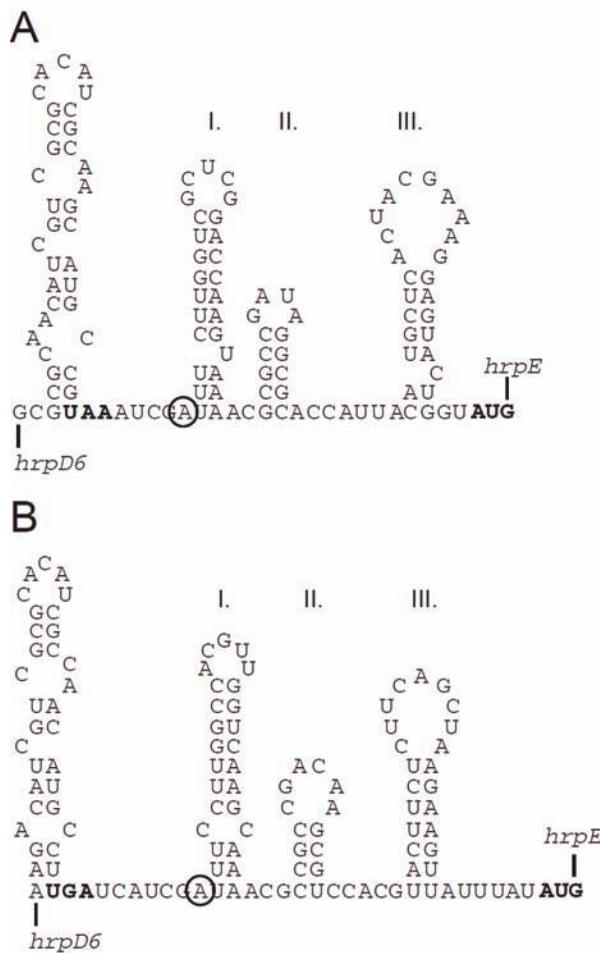


Fig. 4. Predicted RNA structures of the *hrpD6-hrpE* intergenic region. RNA sequences of (A) *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 and (B) *X. campestris* pv. *campestris* ATTC33913 were subjected to folding analysis using the Dynalign algorithm, as implemented in the RNAstructure program (Mathews, 2005). The displayed structures are predicted for the 120 bp upstream of the *hrpE* translational start codon. ΔG_0 value (Gibbs free energy) for both sequences is -49.1 kcal/mol. The putative processing site identified in *X. campestris* pv. *vesicatoria* is encircled. The stop codon of *hrpD6* and the start codon of *hrpE* are shown in bold.

Genetic organization and evolution of the *hrpE* operon

To investigate whether the genetic organization of the *hrpE* transcriptional unit is conserved in group II *hrp* gene clusters we compared the operon structures of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *R. solanacearum* and *A. avenae* (Fig. 5A). While the *hrpA* and *hrpB* operons show different organizations in the three species, the genes of the *hrpC* and *hrpD* operons are arranged in the same order and transcribed in the same direction in the three bacterial genera. The *hrpC* and *hrpD* operon encode the most conserved inner membrane components of the TTS system, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR* and *hrcS*, indicating that they represent the conserved core of the *hrp* gene cluster. Intriguingly, the conservation in terms of gene arrangement includes only the first four genes in the *hrpD*

operon up to *hpaA*, thus supporting our proposed end of the *hrpD* operon. The only gene common to *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *R. solanacearum* and *A. avenae* downstream of *hpaA* is *hpaB*. Interestingly, in *A. avenae* *hpaA* is followed immediately by *hpaB*, while in *X. campestris* pv. *vesicatoria* the *hrpE* operon and in *R. solanacearum* four functionally related genes are interspersed. This arrangement suggests that the additional genes were acquired later.

To test this hypothesis we compared the synonymous (silent) substitutions per synonymous site (K_s) between the *hrpD* and the *hrpE* operon of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The K_s value is commonly regarded as a measure of the underlying mutational rate (Miyata et al., 1980). For reference, two housekeeping genes, malate dehydrogenase (*mdh*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*), were used (Weber and Koebnik, 2006). Most notably, the K_s value of the *hrpE* operon is elevated compared to the housekeeping genes and the genes in the *hrpD* operon, indicating a higher mutational rate for the *hrpE* operon (Fig. 5B). From these results we conclude that the *hrpE* operon may represent a functional unit which was affiliated to the core *hrp* gene cluster at a later time.

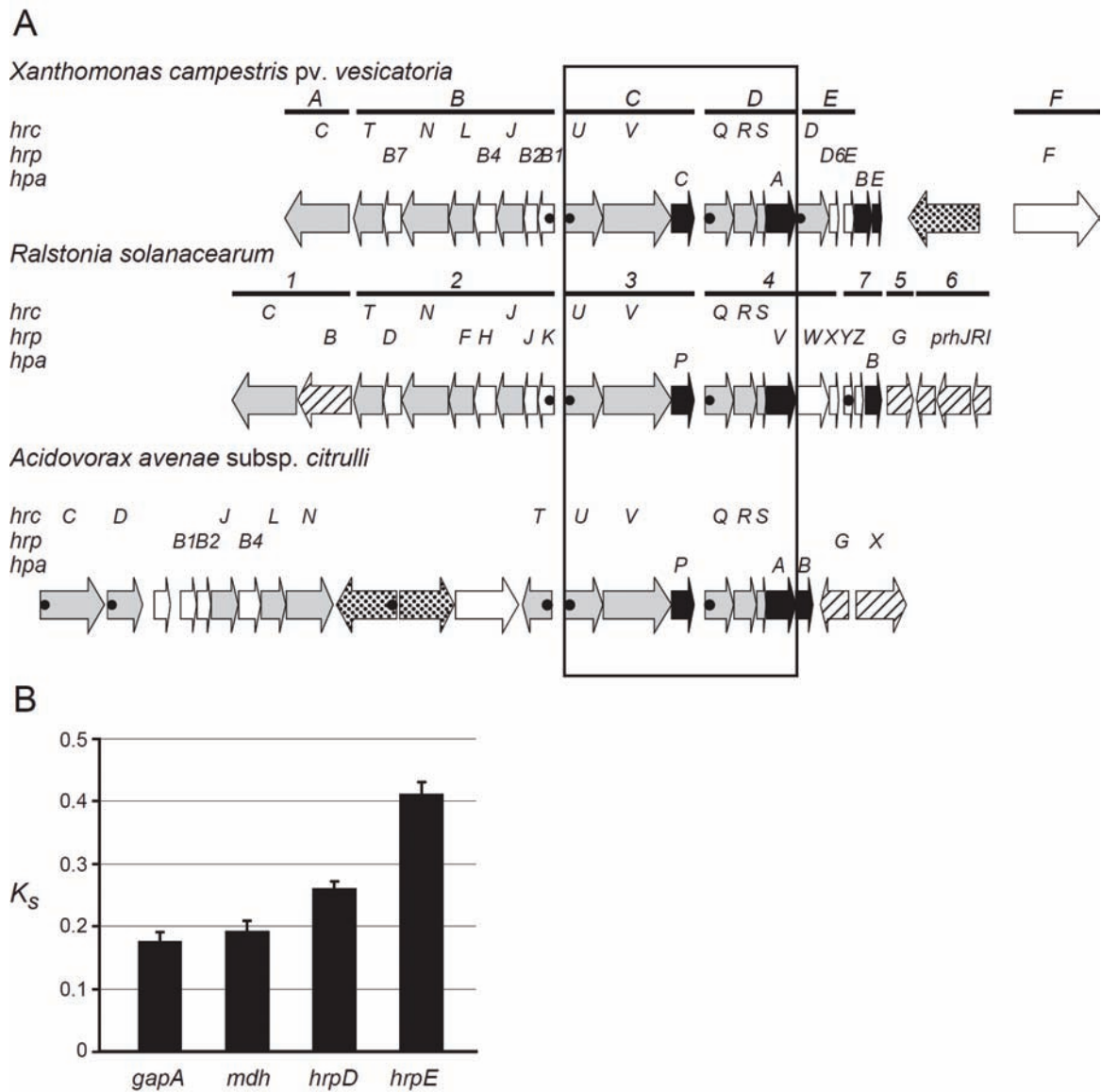


Fig. 5. The *hrpE* transcriptional unit was acquired later to the *hrp* gene cluster. (A) Genetic organization of group II *hrp* gene clusters in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *R. solanacearum*, and *A. avenae* subsp. *citrulli*. Transcriptional units are indicated by a black line. The thick arrows indicate the different genes. Conserved *hrc* genes are represented by filled grey arrows; *hrp* genes by open white arrows, *hpa* genes by filled black arrows, putative type III effectors by dotted black arrows and regulators by hatched white arrows. PIP boxes are indicated by black circles. The conserved core of the *hrp* gene clusters is boxed. (B) Comparison of the synonymous (silent) substitutions per synonymous site (K_s) values between genes encoding the malate dehydrogenase (*mdh*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*), the *hrpD* and the *hrpE* operon. *X. axonopodis* pv. *glycines* strain 8ra was not included in the analysis of *mdh* and *gapA* due to absent sequence information.

DISCUSSION

In this study, we determined the operon structure of the right region of the *hrp* gene cluster from the plant pathogenic bacterium *X. campestris* pv. *vesicatoria*. In contrast to predictions based on sequence analyses, the *hrpD* transcriptional unit encompasses *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS* and *hpaA*, whereas the *hrpE* operon contains *hrcD*, *hrpD6* and *hrpE*. The *hrpE* operon is flanked on the right side by the monocistronic operons *hpaB* and *hpaE*. Deletion mutants in each gene of the *hrpE* operon had a clear Hrp-negative phenotype: non-polar mutants were no longer able to cause disease in susceptible pepper plants or to induce the HR in resistant pepper plants (Huguet et al., 1998, Weber et al., 2005).

The only component of the *hrpE* operon characterized in detail is HrpE, the major subunit of the Hrp pilus (Weber et al., 2005). The 10-kDa HrpE protein, which is unique for the genus *Xanthomonas* possesses a two-domain structure with a surface-exposed positively selected N terminus and a C-terminal polymerization domain (Weber and Koebnik, 2005, Weber and Koebnik, 2006). *hrpD6* is a small and unique gene in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas*. A mutation in the synthetic gene in *R. solanacearum*, *hrpX*, resulted in a loss of Hrp pili but still allowed the transport of the Hrp pilus subunit HrpY (Van Gijsegem et al., 2002). The first ORF in the *hrpE* operon encodes HrcD, a bitopic membrane protein that exhibits a weak homology to the members of the YscD family (Pallen et al., 2005) (C. Berger and R. Koebnik, unpublished). Other members of this protein family are HrpW from *R. solanacearum* and PrgH from *Salmonella typhimurium*. PrgH is an essential component of the needle complex associated with the TTS system and has been co-purified with the needle subunit PrgI (Kubori et al., 1998). The extracellular needle of human pathogens corresponds in function to the Hrp pili of plant pathogenic bacteria. From these observations we conclude that the three genes of the *hrpE* operon form a functional unit involved in a more specialized role in Hrp pilus assembly than the rest of the *hrp* gene cluster which most probably encodes the core components of the TTS system.

Sequence comparisons between the *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *R. solanacearum* and *A. avenae* *hrp* gene clusters reveal that the *hrpC* and *hrpD* operons exhibit an identical gene arrangement in all group II *hrp* gene clusters. This conserved core structure is followed by the *hrpE* operon in *Xanthomonas*. Intriguingly, genes corresponding to components of the *hrpE* operon in terms of gene synteny and homology are only present in *R. solanacearum* but are missing in *A. avenae*. In line with this observation we observed an elevated mutational rate as indicated by the K_s values of the *hrpE* operon,

which let us speculate about a subsequent affiliation to the core *hrp* gene cluster. This increased mutational rate may be an indication of a ‘species-adaptive’ process in which the acquired DNA gradually becomes indistinguishable from the rest of the genome in terms of G+C content and codon usage. We do not know if a pilus-specific gene cluster is present elsewhere in the *A. avenae* genome or if the region between *hrcC* and *hrpB1* encodes a weakly conserved functional unit.

The data obtained from Tn3-*gus* insertions in *hrpE* and RT-PCR experiments of the *hrpE* transcription unit presented here, show that *hrpE* is up-regulated under *hrp* inducing conditions, but no promoter could be identified within 1.2 kb sequence upstream of its translational start (Wengelnik and Bonas, 1996)(K. Wengelnik and U. Bonas, unpublished). In this study we identified a promoter more than 1.2 kb upstream of the *hrpE* translational start codon harbouring a canonical PIP box which would allow the co-regulation of this operon with the remaining *hrp* gene cluster. The identified PIP box in front of *hrcD* is positioned 44 bp upstream of the mapped transcriptional start of the *hrpE* operon. A similar spacing of 45 ± 2 bp between the last conserved guanine residue of the second PIP half-box and the mapped transcriptional start sites, as well as sequence and position of the -10 region are in concordance with the functional characterized PIP box promoters (Fenselau and Bonas, 1995, Tsuge et al., 2005)(Bonas et al., unpublished). The reason why this PIP box promoter was not considered previously may be due to its localization in the supposed *hrcD* coding region. The translational start of *hrcD*, redefined in this study, does not affect the predicted HrcD transmembrane helix. The expression of a C-terminally hexahistidine-tagged HrcD in *X. campestris* pv. *vesicatoria* led to the purification of a 25-kDa protein, which perfectly corresponds to the expected size of HrcD starting at the suggested start codon. However, determination of the N-terminal amino acid sequence was not possible due to the N-terminal modification of the protein (C. Berger and R. Koebnik, unpublished).

Beside PIP boxes other elements may be important for the regulation of *hrp* gene expression. By comparisons with a more distantly related *Xanthomonas* species we found conserved stem-loops in the mRNA located in front of the *hrpE* gene. These secondary structures could be involved in the posttranscriptional regulation of the *hrpE* operon. Such a regulation would allow a differential expression of individual genes in the polycistronic *hrpE* operon, since the Hrp pilus subunit HrpE and the TTS system components HrpD6 and HrcD are certainly required in nonstoichiometric amounts. A well-studied example of

how differential expression of individual genes in polycistronic transcripts can be achieved is the *pap* gene cluster of uropathogenic *Escherichia coli* strains encoding pyelonephritis-associated pili (Nilsson and Uhlin, 1991). In this case, the mRNA is subjected to several processing events resulting in a variety of transcripts with different stabilities. The most stable transcript generated during RNase E-dependent processing corresponds to the *papA* transcript which encodes the major fimbrial component PapA. Interestingly, the *papA* transcript includes a stem-loop located at the 5' end which stabilizes the transcript by protecting it from degradation (Bricker and Belasco, 1999). Based on this data we assume that the previously identified transcriptional start in the intergenic region is instead a processing site resulting in a *hrpE* transcript that is stabilized by stem-loop structures at its 5' end. In accordance with these speculations, the *hrpA* transcript, which encodes the Hrp pilus subunit HrpA of *P. syringae*, shows an unusually long mRNA half-life and its 5' non-translated region strongly increases the stability of the *hrpA* transcript and the amount of HrpA protein (Hienonen et al., 2002, Hienonen et al., 2004). To gain further insight into this potential parallel between the regulatory principles of fimbrial gene clusters and *hrp* gene clusters it will be interesting to determine the biological significance of the proposed stem-loop structures and to address the probable mRNA processing.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hannelore Espenhahn for excellent technical assistance, Kai Wengelnik und Elisabeth Huguet for the generation, mapping and sequencing of transposon insertions, Daniela Büttner, Diana Kühn, and Ute Wahrmund for critical reading of the manuscript. E.W. was supported by a GradFG fellowship from Sachsen-Anhalt. This work was funded in part by grants from the DFG (DFG BO 790/7-1) and the BMBF (GenoMik) to U.B.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.

The bacterial strains and plasmids used are described in Table 1. Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. *vesicatoria* by conjugation with pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (Ditta et al., 1980). *E. coli* cells were cultivated at 37 °C in Luria-Bertani medium, and *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were cultivated at 30 °C in NYG (Daniels et al., 1984), or in MA minimal medium (Rossier et al., 1999). Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; tetracycline, 10 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml.

Plant material and plant inoculations.

The near isogenic line ECW-10R of pepper cultivar ECW carrying the resistance gene *BsI*, was described previously (Minsavage et al., 1990). Inoculation of plant leaves was performed as described previously (Bonas et al., 1991).

Generation of transposon insertion mutants.

The GPS-LS mutagenesis kit was used to create a transposon insertion mutant in *hrpD6* according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Beverly, MA). Briefly, the mobilizable suicide vector pOK-hrpE was used as the target DNA for mutagenesis (Weber et al., 2005). *E. coli* DH5α λ_{pir} transformants were selected for spectinomycin and kanamycin resistance. Insertions in *hrpD6* were mapped by colony PCR using a transposon border primer contributed by the manufacturer and the plasmid-specific primer hrpE(-200) (5'-GCA TGA GCT CGA AAT CCC AAG CAC ATG ACA TCC CTG C). To determine the exact insertion site, positive clones were sequenced using the transposon border primer. The chromosomal wild-type copy of *hrpD6* was replaced by the transposon insertion mutants by two consecutive crossover events as described previously (Kaniga et al., 1991). The replacement was confirmed by PCR analysis.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Pepper race 2; wild type; Rif ^r	(Bonas et al., 1989)
85*	85-10 carrying <i>hrpG</i> * leading to constitutive <i>hrp</i> gene expression	(Wengelnik et al., 1999)
85E*	<i>eps</i> ::Tn3- <i>gus</i> insertion mutant of 85*, <i>hrp</i> ⁺	(Wengelnik et al., 1996)
85-10::D140	Tn3- <i>gus</i> insertion in the promoter of <i>hrpD</i>	(Bonas et al., 1991)
85-10::D29	Tn3- <i>gus</i> insertion in <i>hpaA</i>	(Bonas et al., 1991)
85-10::D506	Tn3- <i>gus</i> insertion in <i>hrcD</i>	(Huguet et al., 1998)
85-10::E75	Tn3- <i>gus</i> insertion in <i>hpaB</i>	(Bonas et al., 1991)
85-10::E84	Tn5 insertion in <i>hrpE</i>	(Bonas et al., 1991)
85-10::DGPS	Tn7 insertion in <i>hrpD6</i>	This study
<i>E. coli</i>		
DH10b	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ nupG rpsL</i> (Sm ^r)	Invitrogen, Carlsbad, CA
DH5α λ _{Pir}	F ⁻ φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15(λ _{Pir}) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 deoR hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> , Nal ^r ; host for propagation of pOK and pLAFR3 derivatives	(Menard et al., 1993)
Plasmids		
pOK1	Suicide vector; <i>sacB sacQ mobRK2 oriR6K</i> ; Spc ^r	(Huguet et al., 1998)
pXV4	pLAFR3 clone from <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 75-3 genomic library, containing <i>hrcV</i> to <i>hrpF</i> ; Tc ^r	(Wengelnik and Bonas, 1996)
pXV9	pLAFR3 clone from <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 75-3 genomic library, containing <i>hrcC</i> to <i>hpaE</i> ; Tc ^r	(Bonas et al., 1991)
pRK2013	Helper plasmid for triparental matings; <i>traRK</i> ⁺ <i>Mob</i> ⁺ ; Km ^r	(Figurski and Helinski, 1979)
pCR2.1	Ap ^r , Km ^r	Invitrogen
pENTR/D-TOPO	Cloning vector; <i>attL</i> recombination sites; pUC- <i>ori</i> , Km ^r	Invitrogen
pL6GW356	pLAFR6 derivative containing Gateway TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) <i>attR</i> reading frame B cassette; Cm ^r , Spc ^r	(Noel et al., 2003)
pGPS5	Transprimer donor; Km ^r , Ap ^r	New England Biolabs, Beverly, MA
pD140, pE75	pXV9::Tn3- <i>gus</i> derivatives	(Schulte and Bonas, 1992)
pE84	pXV9::Tn5 derivative	(Bonas et al., 1991)
pD506	pXV4::Tn3- <i>gus</i> derivatives	(Huguet et al., 1998)
pOK- <i>hrpE</i>	pOK1 <i>hrcD</i> to <i>hpaE</i> in pOK1	(Weber et al., 2005)
pHrpE+PIP/-PIP	pLAFR6 expressing a translational fusion protein between HrpE and AvrBs3Δ2. For details see material and methods.	This study

Construction of HrpE-AvrBs3 Δ 2 fusion proteins and immunoblot analyses.

To create protein fusions of HrpE with the reporter protein AvrBs3 Δ 2, plasmid pL6GW356 (Noel et al., 2003) containing the Gateway *attR* reading frame B cassette (Invitrogen, Carlsbad, CA) in front of *avrBs3 Δ 2* was used. Fragments containing 1.7 kb or 1.2 kb sequence upstream of the translational start of *hrpE*, including or not the PIP box in *hrcD*, as well as the first 150 bp of the *hrpE* CDS were PCR amplified from genomic DNA of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 and cloned into the entry vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primer sequences are available upon request. Recombination into the destination vector pL6GW356 created the expression plasmids pHrpE +PIP and pHrpE -PIP. To analyse the expression of the HrpE-AvrBs3 Δ 2 fusion proteins, *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were grown at 30 °C for 16 h in MA medium. Total cell extracts were separated by SDS-PAGE, followed by Western blotting. Western blots were incubated with an AvrBs3-specific polyclonal antiserum (diluted 1:1,000) (Knoop et al., 1991) and with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), which was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences).

Reverse transcription (RT)-PCR analyses.

Bacteria were harvested by centrifugation at an optical density at 600 nm of 0.6. RNA was extracted by the hot phenol procedure (Aiba et al., 1981). 5 μ g RNA and 150 ng random oligonucleotide hexamers were used to generate cDNAs using the TimeSaver cDNA Synthesis kit (Amersham Biosciences). RT-PCR analysis was performed with diluted cDNA (1:100) as template and 34 PCR-amplification cycles. 16S rDNA served as a constitutive control. Primer sequences spanning *hpaA* and *hrcD* are hrpD4D5-5' (5'-TTG ATG CCA TCG GAG TTG) and hrpD4D5-3' (5'-CGT TTC TTG CAC CGT GTC); *hrcD* and *hrpD6* are hrpD5D6-5' (5'-TCC GTT ACG AGG GCA ATG) and hrpD5D6-3' (5'-CGA ATC TGT TGC GCA GTG); *hrpD6* and *hrpE* are hrpD6E1-5' (5'-CGA GGC CTC ATA TGA GAG ATC ACA CCA TGT TCG ATG) and hrpD6E1-3' (5'-GTG CCA CGT TGA AGT CC); *hrpE* and *hpaB* are hrpE1E2-5' (5'-TGA CAT GTC GCC GAG TAG CG) and hrpE1E2-3' (5'-GTA CCC GCA CAA TCA G); *hpaB* and *hpaE* are hrpE2E3-5' (5'-CTG CTC GAA GCC AAT C) and hrpE2E3-3' (5'-CGG GGA TCC TTA TCA GCT GCC GTC GCG GGT GTG CAC G).

Mapping of the transcriptional start site of *hrcD* by 5'-RACE.

Total RNA was extracted from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85E* grown for 16h in NYG using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). 5'-RACE was performed with the SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), following the manufacturer's instructions. First-strand synthesis was carried out with the gene specific primer *hrpD5-256* (5'-CAG CAG CAT CGC CAA CGC ATA GCA C), annealing 256 bp downstream of the proposed translational start, and the SMART II oligo (5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG). The product of reverse transcription was amplified in a second PCR reaction using an adapter-specific forward primer UPM (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C) and gene-specific reverse primer *hrpD5-186* (5'-TTG CAC CGT GTC GCT G). 5'-RACE products were cloned in the pCR2.1® vector following TOPO-TA cloning protocols (Invitrogen, Carlsbad, CA). The nucleotide sequences of the cloned inserts were determined by DNA sequencing.

Bioinformatic analyses.

The Dynalign algorithm, as implemented in the RNAstructure program (Mathews, 2005), version 4.2 (available at <http://rna.urmc.rochester.edu>), was applied using default parameters. The calculations of synonymous substitutions per synonymous site (K_s) were performed with the MEGA 2 software (Kumar et al., 2001), version 2.1, using the modified Nei-Gojobori method with the Jukes-Cantor corrected distance and the complete-deletion-of-gaps option. The sequences of single CDS encoded in the *hrpD* and the *hrpE* transcriptional unit were aligned using CLUSTAL X and combined to one contiguous sequence prior to the analyses (Thompson et al., 1997). The sequences originated from *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 (GenBank accession number [AC] AM039948), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC 10331 (AC AE013598), *X. axonopodis* pv. *glycines* strain 8ra (AC AF499777), *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 (AC AE011665), and *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 (AC AE012221).

REFERENCES

- Aiba, H., Adhya, S. and de Crombughe, B. (1981). Evidence of two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11905-11910
- Alfano, J. R. and Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-5662
- Balsalobre, C., Morschhäuser, J., Jass, J., Hacker, J. and Uhlin, B. E. (2003). Transcriptional analysis of the *sfa* determinant revealing multiple mRNA

- processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185: 620-629
- Bauer, D. W., Bogdanove, A. J., Beer, S. V. and Collmer, A. (1994). *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 573-581
- 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. and Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20: 681-683
- Bonas, U., Stall, R. E. and Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. 218: 127-136
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J. and 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: 81-88
- Boucher, C. A., Van Gijsegem, F., Barberis, P. A., Arlat, M. and Zischek, C. (1987). *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. J. Bacteriol. 169: 5626-5632
- Bricker, A. L. and Belasco, J. G. (1999). Importance of a 5' stem-loop for longevity of *papA* mRNA in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 3587-3590
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B. and Bonas, U. (2002). Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J. Bacteriol. 184: 2389-2398
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D. and Bonas, U. (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. Mol. Microbiol. 54: 755-768
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E. and Bonas, U. (2006). Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. 59: 513-527
- Chan, J. W. and Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Adv. 17: 489-508
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyk, M. K., Byrde, R. J. W. and Fielding, A. H. (1984). Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. Embo J. 3: 3323-3328
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351
- Fenselau, S. and Bonas, U. (1995). Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 845-854
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652
- Frederick, R. D., Ahmad, M., Majerczak, D. R., Arroyo-Rodriguez, A. S., Manulis, S. and Coplin, D. L. (2001). Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 1213-1222

- Gonzalez-Pedrajo, B., Fraser, G. M., Minamino, T. and Macnab, R. M. (2002). Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 45: 967-982
- Gophna, U., Ron, E. Z. and Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312: 151-163
- Gürlebeck, D., Thieme, F. and Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant. Physiol.* 163: 233-255
- He, S. Y., Nomura, K. and Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694: 181-206
- Hienonen, E., Roine, E., Romantschuk, M. and Taira, S. (2002). mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Genet. Genomics* 266: 973-978
- Hienonen, E., Rantakari, A., Romantschuk, M. and Taira, S. (2004). The bacterial type III secretion system-associated pilin HrpA has an unusually long mRNA half-life. *FEBS Letters* 571: 217-220
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U. (1998). *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* 29: 1379-1390
- Kaniga, K., Delor, I. and Cornelis, G. R. (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137-141
- Klement, Z. (1982). Hypersensitivity. In *Phytopathogenic prokaryotes*, M. S. Mount and G. H. Lacy, eds. (New York, Academic Press), pp. 149-177.
- Knoop, V., Staskawicz, B. and Bonas, U. (1991). Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.* 173: 7142-7150
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. and Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245
- Lindgren, P. B., Peet, R. C. and Panopoulos, N. J. (1986). Gene-cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168: 512-522
- Mathews, D. H. (2005). Predicting a set of minimal free energy RNA secondary structures common to two sequences. *Bioinformatics* 21: 2246-2253
- Menard, R., Sansonetti, P. J. and Parsot, C. (1993). Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175: 5899-5906
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J. and Stall, R. E. (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 41-47
- Miyata, T., Yasunaga, T. and Nishida, T. (1980). Nucleotide sequence divergence and functional constraint in mRNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7328-7332
- Nilsson, P. and Uhlin, B. E. (1991). Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol. Microbiol.* 5: 1791-1799

- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* 41: 1271-1281
- Noël, L., Thieme, F., Gäbler, J., Büttner, D. and Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 185: 7092-7102
- Pallen, M. J., Beatson, S. A. and Bailey, C. M. (2005). Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* 5: 9
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A. P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A. S., Engel, A., *et al.* (2003). Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278: 25816-25824
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. and Bonas, U. (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9368-9373
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* 38: 828-838.
- Schulte, R. and Bonas, U. (1992). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* 174: 815-823
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
- Tsuge, S., Terashima, S., Furutani, A., Ochiai, H., Oku, T., Tsuno, K., Kaku, H. and Kubo, Y. (2005). Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 187: 2308-2314
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P. and Boucher, C. (2002). Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* 44: 935-946
- Weber, E. and Koebnik, R. (2005). Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 187: 6175-6186
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T. K., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* 187: 2458-2468
- Weber, E. and Koebnik, R. (2006). Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* 188: 1405-1410
- Wengelnik, K. and 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*. *J. Bacteriol.* 178: 3462-3469
- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M. and Bonas, U. (1996). Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* 178: 1061-1069.
- Wengelnik, K., Rossier, O. and Bonas, U. (1999). Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* 181: 6828-6831

2.5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Operone stellen Transkriptionseinheiten bakterieller Gene dar, die häufig verschiedene Reaktionen innerhalb eines Stoffwechselwegs katalysieren oder aber an einem gemeinsamen biologischen Prozess beteiligt sind. Die Aufklärung der Organisationsstruktur eines Operons erlaubt so häufig Rückschlüsse auf die Regulation sowie die mögliche Funktion der kotranskribierten Gene. Die Vorhersage von Operonstrukturen gelingt allerdings selbst im Modellorganismus *E. coli* nur in unzureichendem Maße, trotz der hier vorliegenden großen Datenmenge, die die Organisation und Regulation der Operone betreffen. Aus diesem Grund ist die experimentelle Bestimmung der Operonstrukturen noch immer essenziell (90, 221).

In der vorangegangenen Arbeit wurde die Operonstruktur der rechten Region des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria* untersucht. Komplementationsexperimente und RT-PCR-Analysen zeigten, dass das *hrpE*-Operon aus den Genen *hrcD*, *hrpD6* und *hrpE* besteht und vom *hrpD*-Operon und dem *hpaB*-Gen flankiert wird. Das *hrpD*-Operon besteht somit aus den Genen *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS* und *hpaA*. Die RT-PCR-Analysen zeigten weiterhin, dass das Operon unter *hrp*-Gen induzierenden Bedingungen exprimiert wird. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis befindet sich der mittels 5'-RACE bestimmte Transkriptionsstart des *hrpE*-Operons in einem perfekten Abstand zu einem bisher nicht beschriebenen PIP-Box-Motiv. Dieser PIP-Box-Promotor ist, trotz einer zuvor beschriebenen mRNA-Abbruchstelle in der Region zwischen den Genen *hrpD6* und *hrpE*, für die Expression des *hrpE*-Gens essenziell. Ein Vergleich dieser intergenen Regionen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und *X. campestris* pv. *campestris* weist darauf hin, dass in diesem Bereich konservierte mRNA-Sekundärstrukturen vorhanden sind.

Ein Vergleich von drei *hrp*-Genclustern der Gruppe II zeigte, dass die Operone *hrpC* und *hrpD* in Bezug auf ihre Transkriptionsrichtung sowie die Anordnung der kodierten Gene den höchsten Grad der Konservierung aufweisen. Im Falle von *X. campestris* pv. *vesicatoria* schließt sich an *hrpD* das Operon *hrpE* an. In *R. solanacearum* werden an dieser Position Funktionshomologe von *hrcD*, *hrpD6* und *hrpE* kodiert, wohingegen diese in *A. avenae* fehlen und sich an das *hrpD* Operon direkt ein *hpaB*-Homolog anschließt. Dies lässt vermuten, dass das *hrpE*-Operon nachträglich zum *hrp*-Gencluster hinzugefügt wurde. Einen weiteren Hinweis stellt der im Vergleich zum *hrpD*-Operon erhöhte K_3 -Wert dar, welcher auf eine Anpassung des *hrpE*-Operons an den G+C Gehalt oder die Codonenverwendung des restlichen Genoms hindeutet.

3 DISKUSSION

3.1 Morphologie des Hrp-Pilus von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Die *hrp*-Genprodukte von *X. campestris* pv. *vesicatoria* bilden ein TTS-System, das essenziell für die bakterielle Pathogenität in Paprika- und Tomatenpflanzen ist. Im Gegensatz zu den zwischen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konservierten Komponenten wurde die Funktion nicht konservierter Hrp-Proteine in *X. campestris* pv. *vesicatoria* bisher nur für wenige Ausnahmen charakterisiert (siehe 1.3.4.4).

In dieser Arbeit konnten Einblicke in die Struktur und Funktion des nicht konservierten Hrp-Proteins HrpE gewonnen werden. HrpE ist die Hauptuntereinheit einer filamentartigen Struktur, die an der Oberfläche von *X. campestris* pv. *vesicatoria* lokalisiert ist. Der unter *hrp*-Gencluster-induzierenden Bedingungen assemblierte Hrp-Pilus ist essenziell für die Sekretion über beide bakterielle Membranen sowie für die Translokation von Effektoren über die pflanzliche Plasmamembran. Der Hrp-Pilus erreicht *in vitro* eine Länge von mehr als 4 μm und besitzt einen Durchmesser von 8-10 nm (209). Die bei den Pflanzenpathogenen *Erwinia* spp., *P. syringae* und *R. solanacearum* sowie dem Pflanzensymbionten *S. fredii* beschriebenen Oberflächenstrukturen besitzen einen vergleichbaren Durchmesser von 6-10 nm und werden ebenfalls mehrere Mikrometer lang (97, 168, 203). Die Pili von *S. fredii* bilden eine Ausnahme, da sie lediglich eine Länge von zirka 500 nm erreichen (115).

Die Länge der Hrp-Pili ist der morphologisch auffälligste Unterschied zu den Nadeln, die bei Tierpathogenen mit dem TTS-System assoziiert sind. Auch scheinen die Nadeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen starr, während Hrp-Pili eine größere Flexibilität aufweisen. Die Länge und die Flexibilität der Hrp-Pili stellen möglicherweise Anpassungen dar, um die 200 nm starke und netzartig aufgebaute pflanzliche Zellwand zu durchqueren (88). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Xanthomonaden mit verkürzten und destabilisierten Hrp-Pili in ihrer Pathogenität und Symptombildung beeinträchtigt sind (208).

Die Idee, dass Hrp-Pili verlängerte Nadeln darstellen, wird neben dem identischen Durchmesser beider Strukturen auch durch Untersuchungen an Längenkontrollkomponenten der Nadeln unterstützt. In *Yersinia* unterliegen der Substratwechsel, von der Nadeluntereinheit YscF hin zu Effektoren, und die Längenkontrolle der Nadeln der Kontrolle von YscP. Eine Deletion von *yscP* führt zu einer Verlängerung der Nadeln von 55 nm auf bis zu 1,5 μm (2, 100). HpaC wird als Homolog von YscP in *X. campestris* pv. *vesicatoria*

angesehen und verfügt über die für den Substratwechsel verantwortliche Domäne, aber nicht über die Längenkontrolldomäne. Die „Weiterentwicklung“ der Nadel zum Hrp-Pilus könnte damit durch den Wegfall der Längenkontrollfunktion von HpaC erreicht worden sein.

Eine weitere Möglichkeit, die den Längenunterschied zwischen dem Hrp-Pilus und den Nadeln erklären könnte ist, dass der Hrp-Pilus eine zusätzliche assoziierte Struktur auf einer bisher nicht beschriebenen Nadel ist. Ein Beispiel für solch eine assoziierte Struktur ist das EspA-Filament von EPEC, das einen Durchmesser von 12 nm und eine Länge von bis zu 600 nm aufweist (49, 181). Im Gegensatz zu den Hrp-Pili und den Nadeln besitzt das EspA-Filament jedoch keinen Einfluss auf die Typ-III-abhängige Sekretion, sondern ist nur essenziell für die Translokation von Effektoren (52). Dieses Ergebnis lässt die Idee, dass der Hrp-Pilus eine assoziierte Verlängerung der Nadel ist, als unwahrscheinlich erscheinen.

3.2 Architektur des von HrpE gebildeten Hrp-Pilus

Die Analyse der gereinigten Hrp-Pili und Immunmarkierungsexperimente zeigten, dass der Hrp-Pilus in *X. campestris* pv. *vesicatoria* aus einer Hauptuntereinheit, dem Hrp-Pilin HrpE, aufgebaut ist (209). Neben den Hrp-Pili der pflanzenpathogenen Bakterien werden auch alle weiteren, mit TTS-Systemen assoziierten extrazellulären Strukturen, wie die Nadeln tierpathogener Bakterien, das EspA-Filament und das Flagellum, durch die schrittweise Polymerisierung einer Hauptuntereinheit aufgebaut (80, 139). Eine Übersicht der Hauptuntereinheiten und ihrer wichtigsten Eigenschaften gibt Tabelle 3. Die verschiedenen Nadel oder Hrp-Pilus-Hauptuntereinheiten haben keine Sequenzähnlichkeiten untereinander und selbst innerhalb einer bakteriellen Gattung zeigen die Hrp-Piline eine auffällig hohe Sequenzdivergenz (80, 210). Allerdings sind allen Hauptuntereinheiten Charakteristika wie ein geringes Molekulargewicht und eine vorwiegend α -helikal vorhergesagte Sekundärstruktur gemein. Die α -helikalen Bereiche sind hierbei vorwiegend am N- und C-Terminus der Untereinheiten lokalisiert und spielen vermutlich bei der Assemblierung der Oberflächenstrukturen eine Rolle (81, 210). Der Vergleich von 26 HrpE-Varianten zeigte, dass die α -helikalen Abschnitte am N- und C-Terminus konserviert sind. Von besonderer Bedeutung sind bei HrpE die C-terminalen α -Helices, da Insertionen in diesen Bereich zum Funktionsverlust des Proteins führen (208).

Im Gegensatz zu den Nadeln von Tierpathogenen, dem EspA-Filament und dem Flagel-

lum, sind für die Hrp-Pili noch keine Informationen darüber vorhanden, wie die Untereinheiten zu einer solch komplexen Struktur assemblieren. Im Falle der Nadeluntereinheit MxiH aus *S. flexneri* zeigten elektronenmikroskopische Analysen und Röntgenbeugungsexperimente eine helikale Anordnung der MxiH Untereinheiten und die Präsenz eines 2-3 nm durchmessenden inneren Kanals (44). Interessanterweise bilden Untereinheiten des Flagellenfilaments sowie des EspA-Filaments ähnliche helikale Strukturen. Die Symmetrieparameter dieser Strukturen und der Durchmesser des inneren Kanals sind trotz des weit geringeren Molekulargewichts von MxiH und EspA im Vergleich zu FliC nahezu identisch (50, 137) (Tab. 3). Röntgenbeugungsexperimente und Elektronenkryomikroskopie von FliC zeigten, dass das Flagellin aus den vier Domänen D0, D1, D2 und D3 aufgebaut ist. Die innere D0-Domäne besteht aus den vorwiegend α -helikalen Bereichen des N- und C-Terminus des Flagellins und bildet eine Struktur von 7 nm Durchmesser und einem 2-3 nm durchmessenden Kanal im Zentrum (137, 222). Die Größenverhältnisse und die Beteiligung der vorwiegend α -helikal organisierten N- und C-terminalen Bereiche des Flagellins deuten darauf hin, dass HrpE und auch die weiteren Hrp-Pilus und Nadel-Hauptuntereinheiten das funktionale Äquivalent der D0-Domäne darstellen. Die bei HrpE nicht vorhandenen Domänen D1, D2 und D3 umschließen die innere D0-Domäne in mehreren Schichten und bedingen so den Außendurchmesser von 25 nm des Flagellums (174).

Die Vorstellung, dass die Effektoren durch einen Kanal im Inneren des Hrp-Pilus von *X. campestris* pv. vesicatoria transportiert werden und er damit direkt in die Translokation involviert ist, wird durch die immunologische Kolo-kalisierung des Effektors AvrBs3 und der ebenfalls Typ-III-abhängig sekretierten Translokonkomponente HrpF mit dem Hrp-Pilus nahe gelegt. Der Beweis, dass die Substrate durch einen inneren Kanal transportiert werden, lieferten Experimente in *P. syringae* pv. tomato. Hier wurden der Effektor AvrPto und eine epitopmarkierte Variante des Hrp-Pilins HrpA unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gestellt (97, 122). Diese regulatorische Entkopplung ermöglichte die zeitlich getrennte Expression dieser beiden Substrate von der des *hrp*-Genclusters. Diese Experimente belegten beeindruckend, dass im Falle eines bereits assemblierten Hrp-Pilus neu synthetisierte Substrate an der Spitze austreten und dass der Hrp-Pilus an der Spitze wächst. In *X. campestris* pv. vesicatoria konnte der Nachweis eines Transports der Substrate durch das Innere des Hrp-Pilus und des damit verbundenen Austritts der Substrate an der Spitze, bedingt durch das Fehlen eines induzierbaren Promotors, noch nicht angetreten werden.

Die Dimensionen des im Inneren des Hrp-Pilus postulierten Kanals von 2-3 nm würden allerdings nur einen Transport von teilweise entfalteten Substraten erlauben, da schon eine α -Helix einen Durchmesser von 1-1,2 nm aufweist (78). Angesichts der Tatsache, dass im teilentfalteten Zustand eine große Anzahl hydrophober Reste exponiert ist, sollte die Innenoberfläche des Kanals wenig Interaktionsmöglichkeiten bieten. Im Falle des Kanals im Inneren des Flagellums wird dies durch polare nicht-geladene Reste realisiert (225).

Tabelle 3: Hauptuntereinheiten der mit TTS-Systemen assoziierten Oberflächenstrukturen.

Name	Herkunft	Abmessungen Durchmesser / Länge ^a	AS	pI ^b	Literatur/ AC/PDB-Nummer ^d
Pilus Untereinheiten					
HrpE	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	8-10 nm / >4 μ m	93	5,1	(209) CAJ22048
HrpE	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	na	90	8,1	AAM40519
HrpY	<i>R. solanacearum</i>	6-7 nm / >2 μ m	82	8,1	(203) CAB58242
HrpA	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	6-8 nm / >2 μ m	113	9,3	(168) AAB00126
HrpA	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	na	108	5,3	AAB00133
HrpA	<i>E. amylovora</i>	8 nm / >2 μ m	75	8,1	(98) AAB49172
HrpA	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	na	77	5,6	(68) AAG01456
NopA	<i>Rhizobium</i> species NGR234	6-8 nm / 500 nm	71	9,5	(115, 131) NC 000914
Nadel Untereinheiten					
YscF	<i>Y. pestis</i>	10 nm / 58 nm	87	6,5	(100) NP 857727
PrgI	<i>S. typhimurium</i>	13 nm / 80 nm	80	4,8	(116) NP 461794
MxiH	<i>S. flexneri</i>	8 nm / 45 nm	83	4,5	(194) NP 858270
PscF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 nm / >1 μ m ^c	85	6,5	(162) NP 250410
EscF	EPEC	9 nm / 50 nm	73	4,3	(181, 220) AF022236
EspA-Filament/Flagellum					
EspA	EPEC	12 nm / 75-600 nm	192	4,8	(49, 223) PDB code: 1XOU
FliC	<i>S. typhimurium</i>	20 nm / 10-15 μ m	494	4,8	(199, 225) PDB code: 1UCU
FlgE	<i>S. typhimurium</i>	20 nm / 55 nm	299	4,6	(84, 175) PDB code: 1WLG

^a na, nicht analysiert.

^b Berechnung des theoretischen pI erfolgte mit dem Programm ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

^c Die Länge wurde für *in vitro* assemblierte Strukturen bestimmt.

^d AC-Nummer, "Accession number" des Datenbankeintrags; PDB-Code, "Protein data bank accession number".

3.3 Einbindung des Hrp-Pilus in den TTS-Apparat

Im Gegensatz zum Nadelkomplex konnte im Falle des TTS-Systems pflanzenpathogener Bakterien bisher nur der extrazelluläre Hrp-Pilus visualisiert werden. Die Art und Weise, wie diese Struktur mit der Basis verbunden ist, ist bisher nicht geklärt. Das einfachste Szenario, das auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nahe gelegt wird, stellt ein direktes Aufsetzen des Hrp-Pilus auf die Sekretinpore dar. Hierbei würde man erwarten, dass der Hrp-Pilus keinen Einfluss auf die Sekretion hätte, womit diese Hypothese dem generellen Sekretionsdefekt von Hrp-Pilin Deletionsmutanten widerspricht (203, 209, 211). Vermutlich reicht daher der Hrp-Pilus durch die Sekretinpore in das Periplasma oder möglicherweise sogar in das Zytoplasma des Bakteriums. Diese Hypothese einer Fortsetzung des Hrp-Pilus im Inneren des TTS-Apparates wird durch HrpE-Insertionsmutanten unterstützt, die *in vitro* keinen sichtbaren Hrp-Pilus bilden aber weiterhin Substrate Typ-III-abhängig sekretieren (208). Im Falle der gereinigten Nadelkomplexe von *S. typhimurium* zeigten Analysen von Proteindichteverteilungen, dass die Nadel wahrscheinlich durch das Sekretin InvC hindurchreicht, die Überbrückung des Periplasmas allerdings durch PrgJ erreicht wird (132). Bisher konnte in *Xanthomonas* kein Homolog von PrgJ identifiziert werden. Ein möglicher Kandidat ist HrpB2, welches ein essentielles *hrp*-Gen darstellt und wie PrgJ selbst Typ-III-abhängig sekretiert wird (108, 172). Neben der Verankerung des Hrp-Pilus im TTS-Apparat ist ebenfalls ungeklärt, wie die Verbindung zwischen dem Hrp-Pilus und dem in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisiertem Translokon hergestellt wird. Eine nahe liegende Möglichkeit ist die direkte Interaktion von HrpE und der Translokonuntereinheit HrpF. Indes wurde in *Yersinia* an der Spitze der Nadel ein Komplex identifiziert, der von LcrV gebildet wird (146). LcrV weist selbst eine porenbildende Aktivität auf und interagiert mit den Translokonkomponenten YopB und YopD (85, 176). Basierend auf diesen Ergebnissen scheint LcrV die Verbindung zwischen der Nadel und der Translokonpore zu sein. In *X. campestris* pv. *vesicatoria* könnte diese Adapterfunktion vom Harpin Homolog XopA übernommen werden, das ebenfalls Typ-III-abhängig sekretiert wird. XopA ist für die volle Virulenz- und Avirulenzaktivität von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, nicht jedoch für die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* essenziell, was auf eine Rolle bei der Translokation hinweist (151). Im Gegensatz zu dem Harpin HrpZ von *P. syringae* wurde bei XopA noch keine porenbildende Aktivität nachgewiesen (119).

Zur Aufklärung der hier postulierten Interaktionen von HrpE mit Komponenten des

TTS-Systemen und weiterer noch unbekannter Komponenten werden die genetischen Standardverfahren wie z. B. das Hefe-Di-Hybrid System wahrscheinlich nicht zum Erfolg führen. Zum einen konnte HrpE in *E. coli* nur in Form unlöslicher Aggregate exprimiert werden, zum anderen sind im Falle dieses Filament-bildenden Proteins vermutlich komplexe Interaktionsoberflächen essenziell, die nur von korrekt assemblierten Hrp-Pili aufgewiesen werden. Aus diesen Gründen sollte die Identifizierung der Interaktionspartner von HrpE auf biochemischem Wege erfolgen. Die gemeinsame Reinigung von HrpE und seiner Interaktoren könnte unter Verwendung der funktionalen His₍₆₎-markierten HrpE-Variante aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* erfolgen (vgl. 2.3.2.2).

3.4 Domänenstruktur von HrpE

Die in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen der HrpE Insertionsmutanten erlauben die Zuordnung von Funktionen zu definierten Bereichen des Proteins. Eine Gegenüberstellung dieser Daten mit Analysen von HrpA aus *P. syringae* pv. *tomato* ermöglicht zum ersten Mal einen Vergleich zweier im Detail charakterisierter Hrp-Piline, die über allgemeine Gemeinsamkeiten wie eine geringe Größe und den vorhergesagten α -helikalen Charakter beider Proteine hinausgehen. Der Vergleich lässt trotz einer Sequenzidentität von nur 23 % eine konservierte Domänenarchitektur vermuten. In beiden Fällen bilden die ersten 15-17 Aminosäuren das Typ-III-Sekretionssignal (82, 208). Weiterhin werden Insertionen, oder im Falle von HrpA sogar Deletionen, innerhalb des N-Terminus toleriert wohingegen Insertionen in den C-terminalen Bereich zu einem vollständigem Funktionsverlust führen (193, 208). Einige dieser Insertionsmutanten zeigen zusätzlich einen dominant-negativen Effekt auf die Pathogenität und die Auslösung einer HR, was die Vermutung nahe legt, dass dieser α -helikale Bereich die Assemblierungsdomäne darstellt (121, 208). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass N-terminal verkürzte HrpA-Varianten *in vitro* zu Hrp-Pili assemblieren, die morphologisch nicht von Wildtyp-Hrp-Pili zu unterscheiden sind (167). Zusätzlich zu diesen gemeinsamen funktionellen Charakteristika sind die Hydrophobizitätsprofile von HrpA und HrpE nahezu identisch, was im Gegensatz zur geringen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz auf eine strukturelle Verwandtschaft hindeutet. Interessanterweise zeigt auch das noch nicht im Detail charakterisierte Hrp-Pilin HrpY aus *R. solanacearum* ein vergleichbares Hydrophobizitätsprofil. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass drei verschiedene bakterielle Spezies funktional und strukturell vergleichbare Proteine entwickelt haben, um das Hindernis der pflanzli-

chen Zellwand zu überwinden. Dieses Prinzip, dass ähnliche Aufgaben erfüllende Proteine trotz einer geringen Sequenzähnlichkeit eine nahezu identische Struktur aufweisen, ist auch bei weiteren in die Pathogenität involvierten Proteinfamilien beschrieben. Die Typ-III-Chaperone SycE, SycH und SycT verfügen ebenfalls nur über eine Sequenzidentität von 14 %, was für die Familie der Typ-III-Chaperone typisch ist (17). Die gelösten 3D-Strukturen weisen jedoch eine bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit auf (73). Die abschließende Beantwortung der Frage, ob die verschiedenen Hrp-Piline ebenfalls eine ähnliche räumliche Struktur aufweisen, kann erst mit der Aufklärung der 3D-Struktur von Hrp-Pilinen erfolgen.

Allerdings ist die Lösung der 3D-Struktur von Filament-bildenden Proteinen eine besondere Herausforderung, da beide standardgemäß angewandten Methoden, die NMR-Spektroskopie und die Röntgenstrukturanalyse, nur bei löslichen Proteinen zum Erfolg führen. Schon der Pionier der Proteinkristallographie, Sir Lawrence Bragg, prophezeite, dass im Falle filamentöser Proteine eine geordnete Kristallisation nicht möglich sei, da sie sehr komplexe Aggregate bilden (28). Trotz dieser pessimistischen Aussage konnten bereits einige Strukturen Filament bildender Proteine aufgeklärt werden. Hierbei wurde in den meisten Fällen ein Bindungspartner kokristallisiert oder das zu untersuchende Protein modifiziert, um die Aggregation zu verhindern. Aktin wurde unter anderem mit den Aktin-bindenden Proteinen Profilin oder Gelsolin kristallisiert (134, 180). Im Falle von Flagellin und Myosin wurden verkürzte Varianten kristallisiert, die im Gegensatz zu den vollständigen Varianten löslich waren (164, 225). Auch für die Strukturbestimmung mittels NMR wurde bei dem Typ-IV-Pilin eine N-terminal verkürzte lösliche Variante verwendet (103). Damit stellt die in dieser Arbeit erhaltene in ihrer Assemblierung gestörte Variante HrpE(N68) einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Lösung der 3D-Struktur eines Hrp-Pilins dar, da diese in löslicher Form exprimiert werden kann (vgl. 2.3.2.1).

3.5 Der N-Terminus von HrpE ist eine multifunktionale Domäne

Im Gegensatz zum konservierten C-Terminus, der vermutlich für die Assemblierung des Hrp-Pilus verantwortlich ist, besitzt der variable N-terminale und zentrale Bereich von HrpE drei unterschiedliche Funktionen. Zum einen kodiert er das Sekretionssignal, das in den ersten 17 Aminosäuren lokalisiert ist. Zum anderen dient er möglicherweise als „Tarnkappe“, die die konservierte Assemblierungsdomäne maskiert. Weiterhin ist er an der Verankerung des Hrp-Pilus am TTS-Apparat beteiligt.

Diese Verankerung ist in den Insertionsmutanten HrpE(M18) und HrpE(F21) vermutlich gestört. Beide Mutationen führen zu verkürzten Hrp-Pili. Weiterhin zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen für HrpE(M18) die Existenz von Hrp-Pilus-Fragmenten. Interessanterweise besaßen diese Hrp-Pilus-Fragmente eine einheitliche Länge, was auf einen definierten Bruchpunkt hindeutet und einer zufälligen Verteilung des Bruchpunkts widerspricht. Weiterhin entspricht die Länge der Hrp-Pilus-Fragmente der maximalen Länge der noch mit der bakteriellen Zelle verbundenen Hrp-Pili. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei Überschreitung einer Länge von zirka 0,5-1 μm die physische Belastung an der Verankerungsfläche zu groß wird und sich die Hrp-Pili vom TTS-Apparat lösen.

Neben seiner Funktion in der Verankerung besitzen die N-terminalen Zweidrittel noch die Rolle einer hochvariablen „Tarnkappe“, die den konservierten inneren Kanal maskiert. Analysen des Verhältnisses der synonymen Austausche je synonyme Position (K_s) und der nicht-synonymen Austausche je nicht-synonyme Position (K_a) von 18 *hrpE* Allelen zeigten, dass große Teile des N-Terminus einer positiven Selektion unterliegen. Im Gegensatz zur bereits beschriebenen Hypervariabilität der verschiedenen Hrp-Piline zeigt die positive Selektion, dass das Hrp-Pilin HrpE unter einem evolutionären Druck zur Diversifikation seiner Aminosäuresequenz steht. Die positive Selektion ist ein deutliches Zeichen, dass sich ein Protein in einem genetischen Konflikt befindet. Neben HrpE wurde die Wirkung der positiven Selektion für eine Reihe von Oberflächenproteinen von Pathogenen (11, 200) sowie von Proteinen, die an der Pathogenabwehr involviert sind, beschrieben. Zu diesen gehören der MHC-Komplex („major histocompatibility complex“) (91), pflanzliche Chitinasen und pflanzliche Resistenzproteine (19, 54). Diese Beispiele weisen bereits darauf hin, dass eine enge Verbindung zwischen positiver Selektion und einer Wirt-Pathogen-Beziehung zu bestehen scheint. Eine Datenbankanalyse zeigte, dass

nur 0,45 % der Sequenzen unter dem Einfluss einer positiven Selektion stehen, hiervon allerdings mehr als die Hälfte in Korrelation zu Wirt-Pathogen-Beziehungen gesetzt werden können (56). Bisher wurden allerdings erst sechs bakterielle Oberflächenproteine beschrieben, die unter dem Einfluss der positiven Selektion stehen. Diese stammen allerdings ausschließlich aus tierpathogenen Bakterien, die mit dieser Strategie vermutlich die Erkennung durch das Immunsystem erschweren (11, 200). Dies wirft die Frage auf, aus welchem Grund das Oberflächenprotein eines Pflanzenpathogens in Analogie zu Oberflächenproteinen von Tierpathogenen der positiven Selektion unterworfen ist.

Trotz des Fehlens eines adaptiven Immunsystems besitzen Pflanzen die Möglichkeit, eine Reihe von Komponenten zu erkennen, die essenziell für die jeweiligen Mikroorganismen sind. Diese oftmals generellen Auslöser der pflanzlichen Abwehr sind unter dem Begriff PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem das bakterielle Flagellin, die Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien, pilzliche Zellwandbestandteile und Oberflächenproteine mikrobieller Pathogene (154). Bisher wurden allerdings erst wenige pflanzliche Rezeptoren beschrieben, die an der Perzeption mikrobieller PAMPs beteiligt sind. In *Arabidopsis* erfolgt die Erkennung des Flagellins durch den Membran-lokaliserten Rezeptor FLS2 (74).

In Anbetracht der Tatsache, dass der Hrp-Pilus einen essenziellen Pathogenitätsfaktor von *X. campestris* pv. *vesicatoria* darstellt und der großen Anzahl von Untereinheiten, die den pflanzlichen Erkennungssystemen präsentiert werden, wäre HrpE ein exzellenter Kandidat für ein PAMP. Allerdings konnte bisher noch keine Pflanzenart bzw. kein Kultivar identifiziert werden, welches HrpE oder ein Hrp-Pilin eines anderen Pflanzenpathogens erkennt. Dieser Umstand könnte natürlich auch ein Zeichen für den Erfolg der hier diskutierten Strategie sein, da die untersuchten HrpE-Varianten aus pathogenen *Xanthomonas*-Stämmen isoliert wurden.

Der Vergleich mit dem Hydrophobizitätsprofil macht dabei deutlich, dass die der Diversifikation unterliegenden Bereiche wahrscheinlich an der Oberfläche des assemblierten Hrp-Pilus lokalisiert sind (210). Eine präferenziell oberflächenlokalisierte positive Selektion wurde auch im Falle des Porins PorB und der Hauptuntereinheit des Typ-4-Pilus Pile von *Neisseria meningitidis* beobachtet (11, 200). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der N-Terminus während der Invasion von *Xanthomonas* als „Tarnkappe“ dient, die den konservierten inneren Kanal für die pflanzlichen Erkennungssysteme maskiert.

Außer der Erkennung durch pflanzliche Perzeptionssysteme könnte diese Maskierung auch zum Schutz vor Bakteriophagen dienen. Bakteriophagen, die Pili als Bindungsstel-

len bei der Infektion nutzen, wurden unter anderem in *X. campestris* pv. *citri* beschrieben. Der filamentöse Bakteriophage Cf interagiert hier mit dem Typ-4-Pilus (186). Hinweise auf Bakteriophagen, die mit dem Hrp-Pilus interagieren, gibt es in *Xanthomonas* bisher allerdings nicht. Neben der hier gezeigten Oberflächenvariabilität könnte das auch in der strikten Regulation des Hrp-Pilus begründet sein, da der Hrp-Pilus vermutlich nur unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen in der Pflanze assembliert wird (209).

Neben seiner hier beschriebenen Beteiligung an der Verankerung des Hrp-Pilus am TTS-Apparat und der Ausbildung einer „Tarnkappe“, kodiert der N-Terminus von HrpE auch das Typ-III-Sekretionssignal. Die Sekretionssignale von HrpE und HrpA stellen die ersten charakterisierten Signale struktureller Komponenten des TTS-Apparates dar. In beiden Fällen sind die N-terminalen 15-17 Aminosäurereste für die Sekretion eines Reporterproteins ausreichend (82, 208). Die Lokalisierung und die Länge der Typ-III-Sekretionssignale von HrpA und HrpE sind somit vergleichbar mit den Minimalsekretionssignalen von Typ-III-Effektoren (182).

Im Gegensatz zur Lokalisierung ist die Natur des Sekretionssignals auch nach nunmehr 15 Jahren intensiver Forschung nicht abschließend geklärt. Die Tatsache, dass die N-Termini der untersuchten Substrate keinerlei Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz aufweisen, erschwert das Verständnis aufgrund welcher Prinzipien diese Substrate selbst von heterologen TTS-Systemen erkannt und sekretiert werden (182). Analysen von Typ-III-Substraten aus *Yersinia* zeigten, dass eine eher generelle Eigenschaft das Sekretionssignal charakterisieren könnte. Das Sekretionssignal scheint hier einen amphipatischen Charakter zu besitzen, der durch eine alternierende Reihe von polaren und hydrophoben Aminosäureresten hervorgerufen wird. Selbst künstliche amphipatische Signale, die nur aus Isoleucinen und Serinen bestehen, sind funktionell (127). Allerdings bilden N-terminale amphipatische Sequenzen zytosolischer Komponenten des *Yersinia* TTS-Systems keine funktionellen Typ-III-Sekretionssignale (125). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem amphipatischen Charakter eine weitere Eigenschaft vorhanden ist, die ein funktionelles Typ-III-Sekretionssignal ausmacht.

Im Falle von HrpE besteht diese zusätzliche Eigenschaft möglicherweise in der räumlichen Anordnung des amphipatischen N-Terminus. Dieser bildet vermutlich eine amphipatische α -Helix, deren eine Seite polar und deren gegenüberliegende Seite hydrophob ist (210). Bisherige Untersuchungen zur Natur des Typ-III-Sekretionssignals verglichen die N-Termini nicht verwandter Effektoren oder analysierten den Einfluss von Punktmu-

tationen auf die Sekretionskompetenz eines einzigen Typ-III-Effektors (159, 182). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit 26 HrpE-Haplotypen verglichen, die aus pathogenen *Xanthomonas*-Stämmen isoliert wurden und somit eine Kollektion funktioneller Typ-III-Sekretionssignale darstellen. Insbesondere die konkurrierenden Einflüsse der Diversifikation und der Konservierung der für die Sekretion essenziellen Sequenzbereiche offenbarten die einzigartige Möglichkeit, Prinzipien und Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Funktion des Typ-III-Sekretionssignals wesentlich sind. Trotz der positiven Selektion sind neben dem amphipathischen Charakter der α -Helix vier polare Aminosäurereste konserviert. Es bleibt daher zu klären, ob diese essenziell für die Funktion des Typ-III-Sekretionssignals sind. Um einen Einblick in ihre Funktion zu erhalten, könnten diese gezielt mutiert werden.

Die wenigen bisher gelösten 3D-Strukturen von Typ-III-Substraten, die auch den N-Terminus umfassen, lassen es allerdings nicht zu, eine amphipathische α -Helix als generelles Typ-III-Sekretionssignal zu postulieren. Diese Annahme wird zwar durch die Struktur des Effektors YopH aus *Yersinia* unterstützt, dessen N-Terminus eine amphipathische α -Helix bildet, jedoch ist der N-Terminus von YopM unstrukturiert (58). Möglicherweise erfolgt die Ausbildung einer α -Helix in diesem Fall erst durch Bindung des Effektors an eine Komponente des TTS-Apparats.

Neben den hoch konservierten Aminosäuren im Typ-III-Sekretionssignal lassen auch strukturelle Überlegungen einen kotranslationalen Transport, und damit ein auf der mRNA basierendes Sekretionssignal unwahrscheinlich erscheinen (182). Unter der Annahme, dass ein Hrp-Pilus von 500 nm Länge aus 1000 Hrp-Pilinen besteht und die Assemblierungsgeschwindigkeit 50 nm pro Minute beträgt, ergibt sich eine erforderliche Syntheserate von 100 Hrp-Pilinen pro Minute (122). Die Synthesegeschwindigkeit eines Ribosoms beträgt jedoch nur 10-20 Aminosäuren pro Sekunde, was zirka 6-12 Hrp-Pilinen pro Minute entspricht. Bei einem kotranslationalen Transport wären somit mehr als 5 Ribosomen vonnöten, um einen Hrp-Pilus in der ermittelten Geschwindigkeit zu assemblieren, was bei einem Durchmesser eines Ribosoms von 20 nm allein schon aus Platzgründen kaum möglich wäre.

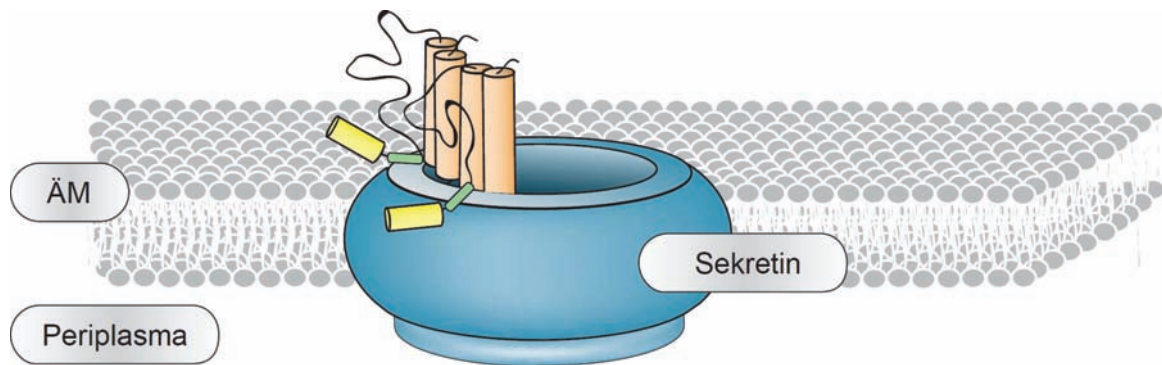


Abbildung 12: Modell der Domänenstruktur von HrpE und vermutliche Anbindung an die Sekretinpore.

Der konservierte, vorwiegend α -helikale C-Terminus bildet den inneren Transportkanal des Hrp-Pilus. Die α -Helices (orange) eines HrpE-Monomers interagieren hierbei mit den α -Helices der benachbarten HrpE-Monomere. Der N-Terminus, der der positiven Selektion unterliegt, ist nach außen gerichtet (schwarze Linie) und maskiert so die α -Helices im Inneren. Neben ihrer Rolle bei dieser Maskierung sind N-terminale Aminosäuren (grün) auch an der Verankerung des Hrp-Pilus am Sekretin beteiligt. Zudem bildet der äußerste N-Terminus das Typ-III-Sekretionssignal (gelb). ÄM, äußere Membran.

3.6 Regulation der Assemblierung von HrpE

Ein bisher nur in Ansätzen verstandener Prozess stellt die Rolle des Hrp-Pilins HrpE in der Regulation des Sekretionsprozesses und der Assemblierung des TTS-Systems dar. Die Typ-III-abhängige Proteinsekretion und auch die Regulation der *hrp*-Gene sind keine konstitutiven Prozesse. *In vivo* findet die Expression der Komponenten des TTS-Apparats und die Sekretion von Substraten nur bei Kontakt des Pathogens mit der Wirtszelle statt. In *R. solanacearum* werden die *hrp*-Gene in Gegenwart pflanzlicher Zellen induziert (129). Die Sekretion bzw. die Translokation sind bei den tierpathogenen Bakterien *S. flexneri* und *Y. pseudotuberculosis* vom Kontakt mit eukaryontischen Wirtszellen abhängig (135, 170). In *Xanthomonas* sind die Regulatoren HrpG und HrpX für die Aktivierung des *hrp*-Genclusters verantwortlich (vgl. 1.3.3). Ein für die HrpX-abhängige Regulation vermutlich essenzielles Promotormotiv, die PIP-Box, befindet sich vor dem *hrpE*-Operon und ermöglicht so eine Koregulation dieser Transkriptionseinheit mit dem restlichen *hrp*-Gencluster. Das *hrpE*-Operon kodiert neben *hrpE* auch *hrcD* und *hrpD6* (vgl. 2.5.1). Interessanterweise zeigte eine *Tn3-gus* Insertion, dass das *hrpE*-Gen im Gegensatz zu allen anderen unter Kontrolle eines PIP-Box Promotors stehenden Genen bereits unter nicht-induzierenden Bedingungen eine hohe basale Transkription aufweist (217). Allerdings konnte neben dem PIP-Box Promotor bisher kein weiterer interner Promotor identifiziert werden, der für das erhöhte Transkriptionslevel unter nicht-induzierenden Bedingungen verantwortlich sein könnte (214) (vgl. 2.5.1). Die erhöhte

Basalaktivität könnte auch auf eine höhere Stabilität eines *hrpE*-kodierenden Transkripts zurückzuführen sein, was eine posttranskriptionale Regulation des *hrpE* Operons andeutet. Eine posttranskriptionale Regulation würde eine differentielle Expression der individuellen Gene des polycistronischen *hrpE*-Operon ermöglichen, was sinnvoll erscheint, da die Untereinheit des Hrp-Pilus und die Komponenten des TTS-Apparates HrcD und HrpD6 in einem nicht-stöchiometrischen Verhältnis gebraucht werden. Ein gut untersuchtes Beispiel, wie die unterschiedliche Expression einzelner Gene eines polycistronischen Transkripts erfolgt, stellt der *pap*-Gencluster dar. Der *pap*-Gencluster kodiert bei uropathogenen *E. coli* den Pyelonephritis-assoziierten Pilus, der zur Klasse der Typ-1-Pili gehört (148). Die *pap*-mRNA ist mehreren Prozessierungsschritten unterworfen, wobei die resultierenden Transkripte unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Das stabilste Transkript, das bei der RNase E abhängigen Prozessierung gebildet wird, ist das *papA*-Transkript, das die Hauptuntereinheit des Pap-Pilus kodiert. Das *papA*-Transkript beinhaltet „stem loops“ am 5'-Ende der mRNA, die das Transkript vor dem Abbau schützen (29).

Der ursprünglich in der intergenen Region von *hrpD6* und *hrpE* identifizierte Transkriptionsstart könnte eine mRNA Prozessierungsstelle darstellen. Diese möglicherweise RNase E vermittelte Prozessierung könnte zu einem *hrpE*-Transkript führen, das durch die konservierten Sekundärstrukturen am 5'-Ende stabilisiert wird (vgl. 2.5.1) (Abb. 13A). Diese Spekulation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Halbwertszeit des *hrpA*-Transkripts, das für die Hrp-Pilus-Untereinheit von *P. syringae* kodiert, ungewöhnlich lang ist. Der untranslatierte Bereich am 5'-Ende ist hier für die Stabilisierung des Transkripts und die Menge an HrpA-Protein verantwortlich (82, 83). Um einen tieferen Einblick in die möglichen regulatorischen Parallelen zwischen den Typ-1-Pilus-Genclustern und dem *hrp*-Gencluster zu erhalten, sind allerdings noch weitergehende Experimente vonnöten. Eine Bestätigung der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen *in vivo* könnte durch RNA Methylierungsexperimente erfolgen. Hierbei wird die RNA mit Dimethylsulfat behandelt, welches Ringstickstoffatome der Basen Adenin, Cytosin und Guanin methylieren kann, die an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. In Abhängigkeit von der chemischen Umgebung der Ringstickstoffatome erfolgt diese Reaktion in unterschiedlichem Ausmaß. Die Effizienz der Methylierung kann entlang der mRNA durch die Anzahl der Methylgruppen-abhängigen Abbrüche bei einer „Primer extension“-Analyse bestimmt werden (213). Weiterhin könnte mittels „Northern-Blots“ oder „Real-time PCR“ die Stabilität der *hrpE*-Wildtyp-mRNA mit der

von Insertionsmutanten in den 5'-untranslatierten Bereich verglichen werden, die die Ausbildung der Sekundärstrukturen beeinflussen könnten (207).

Die konstitutiv aktive Variante des Regulators HrpG, HrpG*, führt zu einer generellen Aktivierung der *hrp*-Gene und verstärkt die bereits vorhandene Basaltranskription von *hrpE* (218). Überraschenderweise ist die hohe Transkriptionsaktivität des *hrpE*-Gens für seine stabile Synthese nicht hinreichend (vgl. 2.2.2.1) (Abb. 13B). Im Unterschied zu allen bisher analysierten Komponenten des TTS-Apparats ist die Translation oder die Stabilität von HrpE an Bedingungen geknüpft, die die Sekretion ermöglichen (171, 172) (vgl. 2.2.2.1). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei der Nadel-Untereinheit PrgI von *S. enterica* beschrieben. Die Deletion einer essenziellen Komponente des TTS-Systems, InvA, führt auch hier zu einem Verlust der Synthese der Nadeluntereinheit (188). Vermutlich wird durch diesen Mechanismus sichergestellt, dass unter nicht-Sekretionsbedingungen die Hauptuntereinheiten der Nadel bzw. des Hrp-Pilus nicht innerhalb der bakteriellen Zelle polymerisieren und womöglich toxische Aggregate bilden. Ob dieser Mechanismus bei *Xanthomonas* auf einer Translationsinhibierung des *hrpE*-Transkripts oder aber auf einer Instabilität von HrpE in einem nicht-assemblierten Zustand beruht, wird in weitergehenden Experimenten aufzuklären sein. Erste Ergebnisse zeigen jedoch, dass translationale Fusionen von HrpE mit AvrBs3 Δ 2, unter Kontrolle des eigenen Promotors bereits bei einem neutralem pH-Wert synthetisiert werden. Dies deutet auf eine Instabilität von HrpE unter nicht-Sekretionsbedingungen hin (Daten nicht gezeigt).

Die genauen molekularen Mechanismen, die der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* zugrunde liegen, bedürfen der weiteren Aufklärung. Insbesondere über die Interaktionen von HrpE mit unterschiedlichen Komponenten und möglicherweise auch Substraten des TTS-Systems ist nichts bekannt. Die Aufklärung dieser Wechselwirkungen und auch der 3D-Struktur von HrpE werden ein tieferes Verständnis der Typ-III-abhängigen Proteintranslokation ermöglichen.

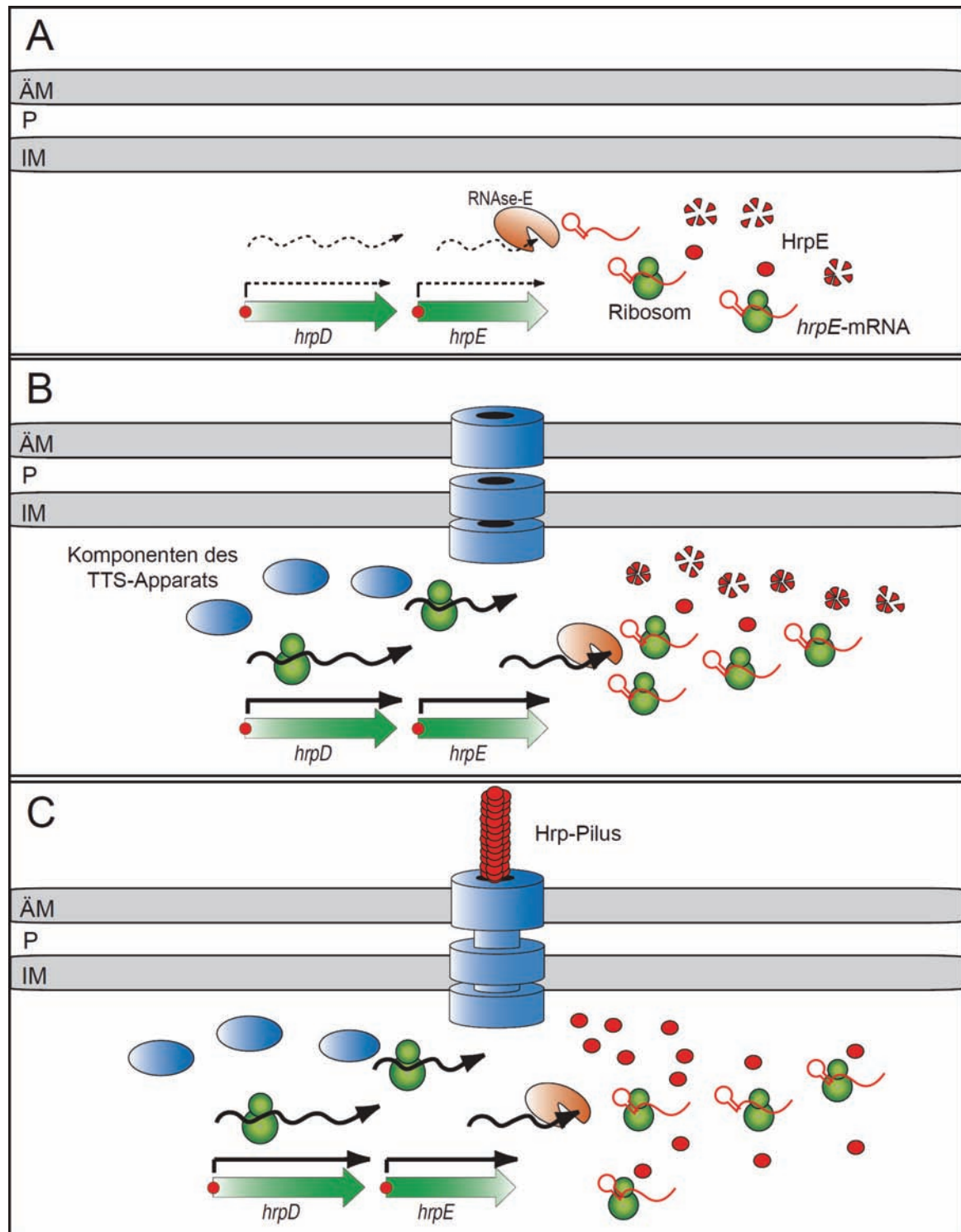


Abbildung 13: Modell der Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

(A) Der *hrp*-Gencluster, beispielhaft für die Operone *hrpD* und *hrpE* gezeigt, wird unter nicht-induzierenden Bedingungen auf einem niedrigen Niveau transkribiert (gestrichelte Linien). Nach Prozessierung des *hrpE*-Transkripts durch die RNase E wird das dank 5'-„stem-loop“-Strukturen stabilisierte Transkript des *hrpE*-Gens angereichert. Allerdings erfolgt noch keine stabile Synthese von HrpE. (B) Nach Induktion des *hrp*-Genclusters beginnen die Transkription und die Translation der *hrp*-Gene (durchgezogene Linie). Auch während des nun folgenden Aufbaus des TTS-Apparats wird HrpE nicht stabil synthetisiert, sondern unterliegt einem raschen Abbau. (C) Erst nachdem ein funktionaler TTS-Apparat aufgebaut wurde, erfolgt die Sekretion und Assemblierung der Hrp-Pilin Monomere, die so vor dem Abbau geschützt werden. IM, innere Membran; ÄM, äußere Membran; P, Periplasma.

4 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker.** 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**:621-628.
2. **Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L. J. Mota, and G. R. Cornelis.** 2005. Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **56**:54-67.
3. **Agrios, G. N.** 1988. *Plant Pathology*, 3rd edition ed. Academic Press, San Diego.
4. **Aizawa, S. I.** 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:157-164.
5. **Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. Ramos, A. C. da Silva, and C. S. Farah.** 2004. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J. Bacteriol.* **186**:6186-6197.
6. **Alfano, J. R., and A. Collmer.** 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**:5655-5662.
7. **Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter, and G. R. Cornelis.** 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J. Bacteriol.* **176**:4534-4542.
8. **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**:1140-1143.
9. **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol. Microbiol.* **31**:1139-1148.
10. **Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind.** 1999b. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12839-12843.
11. **Andrews, T. D., and T. Gojoberi.** 2004. Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the PilE protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics* **166**:25-32.
12. **Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and C. A. Boucher.** 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J.* **13**:543-553.
13. **Astua-Monge, G., G. V. Minsavage, R. E. Stall, M. J. Davis, U. Bonas, and J. B. Jones.** 2000. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:911-921.
14. **Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar.** 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**:726-733.
15. **Bauer, D. W., Z. M. Wei, S. V. Beer, and A. Collmer.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* harpin_{Ech}: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:484-491.
16. **Berger, C.** 2004. Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
17. **Birtalan, S., and P. Ghosh.** 2001. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat. Struct. Biol.* **8**:974-978.
18. **Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* **9**:971-980.
19. **Bishop, J. G., A. M. Dean, and T. Mitchell-Olds.** 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5322-5327.
20. **Blobel, G.** 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1496-1500.
21. **Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiliaux, C. Parsot, and P. Sansonetti.** 1999. The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* **147**:683-693.
22. **Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti, and A. Allaoui.** 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol. Microbiol.* **39**:652-663.
23. **Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa.** 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:3027-3030.
24. **Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H. C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem.** 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*

- 20:681-683.
25. **Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz.** 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **218**:127-136.
 26. **Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:81-88.
 27. **Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo.** 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.* **238**:261-269.
 28. **Bragg, S. L.** 1975. *The Development of X-ray Analysis.* G. Bell, London.
 29. **Bricker, A. L., and J. G. Belasco.** 1999. Importance of a 5' stem-loop for longevity of *papA* mRNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:3587-3590.
 30. **Brown, I. R., J. W. Mansfield, S. Taira, E. Roine, and M. Romantschuk.** 2001. Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:394-404.
 31. **Brown, P. N., M. A. Mathews, L. A. Joss, C. P. Hill, and D. F. Blair.** 2005. Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* **187**:2890-2902.
 32. **Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster.** 2004. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **186**:4645-4654.
 33. **Burns, D. L.** 2003. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:29-34.
 34. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2002. Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**:186-192.
 35. **Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas.** 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **184**:2389-2398.
 36. **Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noel, and U. Bonas.** 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol.* **54**:755-768.
 37. **Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber, and U. Bonas.** 2006. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **59**:513-527.
 38. **Chan, J. W., and P. H. Goodwin.** 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Adv.* **17**:489-508.
 39. **Chang, J. H., A. K. Goel, S. R. Grant, and J. L. Dangl.** 2004. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:11-18.
 40. **Charkowski, A. O., J. R. Alfano, G. Preston, J. Yuan, S. Y. He, and A. Collmer.** 1998. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J. Bacteriol.* **180**:5211-5217.
 41. **Christie, P. J.** 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:219-234.
 42. **Ciesiolka, L. D., T. Hwin, J. D. Gearlds, G. V. Minsavage, R. Saenz, M. Bravo, V. Handley, S. M. Conover, H. Zhang, J. Caporgno, et al.** 1999. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**:35-44.
 43. **Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins, and C. Hughes.** 2003. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol. Microbiol.* **48**:1349-1355.
 44. **Cordes, F. S., K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E. H. Egelman, A. Blocker, and S. M. Lea.** 2003. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* **278**:17103-17107.
 45. **Crago, A. M., and V. Koronakis.** 1998. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol. Microbiol.* **30**:47-56.
 46. **Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell, and G. Frankel.** 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:2093-2106.
 47. **da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, et al.** 2002. Comparison of

- the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-463.
48. **Dale, C., S. A. Young, D. T. Haydon, and S. C. Welburn.** 2001. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:1883-1888.
 49. **Daniell, S. J., N. Takahashi, R. Wilson, D. Friedberg, I. Rosenshine, F. P. Booy, R. K. Shaw, S. Knutton, G. Frankel, and S. Aizawa.** 2001. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **3**:865-871.
 50. **Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy, and G. Frankel.** 2003. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:301-308.
 51. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:414-424.
 52. **Ebel, F., T. Podzadel, M. Rohde, A. U. Kresse, S. Kramer, C. Deibel, C. A. Guzman, and T. Chakraborty.** 1998. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.* **30**:147-161.
 53. **Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and S. A. Lloyd.** 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J. Bacteriol.* **185**:2259-2266.
 54. **Ellis, J., P. Dodds, and T. Pryor.** 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci.* **5**:373-379.
 55. **Emerson, S. U., K. Tokuyasu, and M. I. Simon.** 1970. Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science* **169**:190-192.
 56. **Endo, T., K. Ikeo, and T. Gojobori.** 1996. Large-scale search for genes on which positive selection may operate. *Mol. Biol. Evol.* **13**:685-690.
 57. **Escobar, L., G. Van Den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas.** 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* **2**:287-296.
 58. **Evdokimov, A. G., D. E. Anderson, K. M. Rutzahn, and D. S. Waugh.** 2001. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J. Mol. Biol.* **312**:807-821.
 59. **Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Rutzahn, T. D. Copeland, and D. S. Waugh.** 2001. Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**:793-799.
 60. **Fadoulglou, V. E., A. P. Tampakaki, N. M. Glykos, M. N. Bastaki, J. M. Hadden, S. E. Phillips, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis.** 2004. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:70-75.
 61. **Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas.** 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:390-396.
 62. **Fenselau, S., and U. Bonas.** 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:845-854.
 63. **Fields, K. A., G. V. Plano, and S. C. Straley.** 1994. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **176**:569-579.
 64. **Filloux, A.** 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:163-179.
 65. **Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
 66. **Foultier, B., P. Troisfontaines, S. Müller, F. R. Opperdoes, and G. R. Cornelis.** 2002. Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J. Mol. Evol.* **55**:37-51.
 67. **Fraser, G. M., T. Hirano, H. U. Ferris, L. L. Devgan, M. Kihara, and R. M. Macnab.** 2003. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Mol. Microbiol.* **48**:1043-1057.
 68. **Frederick, R. D., M. Ahmad, D. R. Majerczak, A. S. Arroyo-Rodriguez, S. Manulis, and D. L. Coplin.** 2001. Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1213-1222.
 69. **Frithz-Lindsten, E., R. Rosqvist, L. Johansson, and A. Forsberg.** 1995. The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable

- for targeting to the secretion loci. *Mol. Microbiol.* **16**:635-647.
70. **Galan, J. E., and A. Collmer.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**:1322-1328.
71. **Gauthier, A., and B. B. Finlay.** 2003. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:6747-6755.
72. **Gentschev, I., G. Dietrich, and W. Goebel.** 2002. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* **10**:39-45.
73. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:771-795.
74. **Gomez-Gomez, L., and T. Boller.** 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**:1003-1011.
75. **Gophna, U., E. Z. Ron, and D. Graur.** 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**:151-163.
76. **Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg.** 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**:1722-1726.
77. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
78. **Hamman, B. D., J. C. Chen, E. E. Johnson, and A. E. Johnson.** 1997. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**:535-544.
79. **He, S. Y., H. C. Huang, and A. Collmer.** 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**:1255-1266.
80. **He, S. Y., and Q. Jin.** 2003. The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:15-19.
81. **He, S. Y., K. Nomura, and T. S. Whittam.** 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:181-206.
82. **Hienonen, E., E. Roine, M. Romantschuk, and S. Taira.** 2002. mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Genet. Genomics* **266**:973-978.
83. **Hienonen, E., A. Rantakari, M. Romantschuk, and S. Taira.** 2004. The bacterial type III secretion system-associated pilin HrpA has an unusually long mRNA half-life. *FEBS Letters* **571**:217-220.
84. **Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa, and S. Aizawa.** 1994. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:5439-5449.
85. **Holmström, A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordfelth, J. Pettersson, R. Benz, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg.** 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* **39**:620-632.
86. **Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett.** 2003. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. *Mol. Microbiol.* **50**:377-389.
87. **Hoyos, M. E., C. W. Stanley, S. Y. He, S. Pike, X. A. Pu, and A. Novacky.** 1996. The interaction of harpin_(PSS) with plant cell walls. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:608-616.
88. **Hu, W., J. Yuan, Q. L. Jin, P. Hart, and S. Y. He.** 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:234-241.
89. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
90. **Huerta, A. M., H. Salgado, D. Thieffry, and J. Collado-Vides.** 1998. RegulonDB: a database on transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **26**:55-59.
91. **Hughes, A. L., and M. Nei.** 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**:167-170.
92. **Huguet, E., and U. Bonas.** 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NoIX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:488-498.
93. **Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas.** 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Mol. Microbiol.* **29**:1379-1390.
94. **Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner, and M. A. Schmidt.** 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp

- proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. Cell. Microbiol. **3**:669-679.
95. **Jackson, M. W., and G. V. Plano.** 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. FEMS Microbiol. Lett. **186**:85-90.
 96. **Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan.** 1987. GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. Embo J. **6**:3901-3907.
 97. **Jin, Q., and S. Y. He.** 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. Science **294**:2556-2558.
 98. **Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones, and S. Y. He.** 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. Mol. Microbiol. **40**:1129-1139.
 99. **Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad.** 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Syst. Appl. Microbiol. **27**:755-762.
 100. **Journet, L., C. Agrain, P. Broz, and G. R. Cornelis.** 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. Science **302**:1757-1760.
 101. **Juris, S. J., F. Shao, and J. E. Dixon.** 2002. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. Cell. Microbiol. **4**:201-211.
 102. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. Gene **109**:137-141.
 103. **Keizer, D. W., C. M. Slupsky, M. Kalisiak, A. P. Campbell, M. P. Crump, P. A. Sastry, B. Hazes, R. T. Irvin, and B. D. Sykes.** 2001. Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili. J. Biol. Chem. **276**:24186-24193.
 104. **Kenny, B., C. Chervaux, and I. B. Holland.** 1994. Evidence that residues -15 to -46 of the haemolysin secretion signal are involved in early steps in secretion, leading to recognition of the translocator. Mol. Microbiol. **11**:99-109.
 105. **Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi, and R. M. Macnab.** 2001. Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FlIF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. J. Bacteriol. **183**:1655-1662.
 106. **Kim, J. F., and S. V. Beer.** 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. J. Bacteriol. **180**:5203-5210.
 107. **Kim, J. G., E. Jeon, J. Oh, J. S. Moon, and I. Hwang.** 2004. Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in non-host plants. J. Bacteriol. **186**:6239-6247.
 108. **Kimbrough, T. G., and S. I. Miller.** 2000. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:11008-11013.
 109. **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. **173**:7142-7150.
 110. **Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan, and G. Frankel.** 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. Embo J. **17**:2166-2176.
 111. **Koebnik, R.** 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. Trends Microbiol. **9**:586-590.
 112. **Koehler, C. M., S. Merchant, and G. Schatz.** 1999. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. Trends Biochem. Sci. **24**:428-432.
 113. **Kostakioti, M., C. L. Newman, D. G. Thanassi, and C. Stathopoulos.** 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J. Bacteriol. **187**:4306-4314.
 114. **Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. Mol. Microbiol. **26**:789-797.
 115. **Krishnan, H. B., J. Lorio, W. S. Kim, G. Jiang, K. Y. Kim, M. DeBoer, and S. G. Pueppke.** 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. Mol. Plant-Microbe Interact. **16**:617-625.
 116. **Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science **280**:602-605.
 117. **Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa, and J. E. Galan.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:10225-10230.
118. **Lee, B. M., Y. J. Park, D. S. Park, H. W. Kang, J. G. Kim, E. S. Song, I. C. Park, U. H. Yoon, J. H. Hahn, B. S. Koo, et al.** 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* **33**:577-586.
 119. **Lee, J., B. Klüsener, G. Tsiamis, C. Stevens, C. Neyt, A. P. Tampakaki, N. J. Panopoulos, J. Nöller, E. W. Weiler, G. R. Cornelis, et al.** 2001. HrpZ_(P_{sph}) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:289-294.
 120. **Lee, S. H., and J. E. Galan.** 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **51**:483-495.
 121. **Lee, Y. H., O. O. Kolade, K. Nomura, D. N. Arvidson, and S. Y. He.** 2005. Use of dominant-negative HrpA mutants to dissect Hrp pilus assembly and type III secretion in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Biol. Chem.* **280**:21409-21417.
 122. **Li, C. M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk, and S. Taira.** 2002. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *Embo J.* **21**:1909-1915.
 123. **Lindeberg, M., J. Stavriniades, J. H. Chang, J. R. Alfano, A. Collmer, J. L. Dangl, J. T. Greenberg, J. W. Mansfield, and D. S. Guttman.** 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:275-282.
 124. **Lindgren, P. B.** 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:129-152.
 125. **Lloyd, S. A., A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and M. S. Francis.** 2001. Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**:367-371.
 126. **Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* **39**:520-531.
 127. **Lloyd, S. A., M. Sjöström, S. Andersson, and H. Wolf-Watz.** 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol. Microbiol.* **43**:51-59.
 128. **Lux, R., N. Kar, and S. Khan.** 2000. Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes. *J. Mol. Biol.* **298**:577-583.
 129. **Marenda, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher, and M. Arlat.** 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**:437-453.
 130. **Marie, C., W. J. Broughton, and W. J. Deakin.** 2001. *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:336-342.
 131. **Marie, C., W. J. Deakin, V. Viprey, J. Kopcinska, W. Golinowski, H. B. Krishnan, X. Perret, and W. J. Broughton.** 2003. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:743-751.
 132. **Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan, and V. M. Unger.** 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**:1040-1042.
 133. **Marois, E., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2002. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:637-646.
 134. **McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H. G. Mannherz, and A. G. Weeds.** 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **364**:685-692.
 135. **Menard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot.** 1994. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *Embo J.* **13**:5293-5302.
 136. **Metz, M., D. Dahlbeck, C. Q. Morales, B. Al Sady, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz.** 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **41**:801-814.
 137. **Mimori, Y., I. Yamashita, K. Murata, Y. Fujiyoshi, K. Yonekura, C. Toyoshima, and K. Namba.** 1995. The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **249**:69-87.
 138. **Minamino, T., and R. M. MacNab.** 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol. Microbiol.* **37**:1494-1503.
 139. **Minamino, T., and K. Namba.** 2004. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:5-17.

140. **Minamino, T., and A. P. Pugsley.** 2005. Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol. Microbiol.* **56**:303-308.
141. **Morales, C. Q., J. Posada, E. Macneale, D. Franklin, I. Rivas, M. Bravo, J. Minsavage, R. E. Stall, and M. C. Whalen.** 2005. Functional analysis of the early chlorosis factor gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:477-486.
142. **Morgan, D. G., C. Owen, L. A. Melanson, and D. J. DeRosier.** 1995. Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J. Mol. Biol.* **249**:88-110.
143. **Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama, and C. Sasakawa.** 2005. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J. Biol. Chem.*
144. **Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, O. Rossier, U. Bonas, and B. J. Staskawicz.** 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13324-13329.
145. **Mudgett, M. B.** 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **56**:509-531.
146. **Mueller, C. A., P. Broz, S. A. Müller, P. Ringler, F. Erne-Brand, I. Sorg, M. Kuhn, A. Engel, and G. R. Cornelis.** 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science* **310**:674-676.
147. **Nguyen, L., I. T. Paulsen, J. Tchieu, C. J. Hueck, and M. H. Saier, Jr.** 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:125-144.
148. **Nilsson, P., and B. E. Uhlin.** 1991. Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol. Microbiol.* **5**:1791-1799.
149. **Nishiyama, M., R. Horst, O. Eidam, T. Herrmann, O. Ignatov, M. Vetsch, P. Bettendorff, I. Jelesarov, M. G. Grütter, K. Wüthrich, et al.** 2005. Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *Embo J.* **24**:2075-2086.
150. **Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas.** 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Mol. Microbiol.* **41**:1271-1281.
151. **Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas.** 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* **184**:1340-1348.
152. **Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas.** 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **185**:7092-7102.
153. **Nomura, K., M. Melotto, and S. Y. He.** 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:361-368.
154. **Nürnberg, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**:249-266.
155. **Pallen, M. J., S. A. Beatson, and C. M. Bailey.** 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:201-229.
156. **Pallen, M. J., S. A. Beatson, and C. M. Bailey.** 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* **5**:9.
157. **Parsot, C., C. Hamiaux, and A. L. Page.** 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:7-14.
158. **Pelham, H. R.** 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **15**:483-486.
159. **Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, et al.** 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7652-7657.
160. **Plano, G. V., S. S. Barve, and S. C. Straley.** 1991. LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J. Bacteriol.* **173**:7293-7303.
161. **Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, et al.** 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* **278**:25816-25824.
162. **Quinaud, M., J. Chabert, E. Faudry, E. Neumann, D. Lemaire, A. Pastor, S. Elsen, A. Desse, and I. Attree.** 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*

163. **Ramamurthi, K. S., and O. Schneewind.** 2005. A Synonymous Mutation in *Yersinia enterocolitica yopE* Affects the Function of the YopE Type III Secretion Signal. *J. Bacteriol.* **187**:707-715.
164. **Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, and H. M. Holden.** 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**:50-58.
165. **Roden, J. A., B. Belt, J. B. Ross, T. Tachibana, J. Vargas, and M. B. Mudgett.** 2004. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:16624-16629.
166. **Roggenkamp, A., N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann.** 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J. Bacteriol.* **185**:3735-3744.
167. **Roine, E., J. Saarinen, N. Kalkkinen, and M. Romantschuk.** 1997. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.* **417**:168-172.
168. **Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He.** 1997. Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3459-3464.
169. **Ronald, P. C., and B. J. Staskawicz.** 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria encodes a 50-kD protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:191-198.
170. **Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J.* **13**:964-972.
171. **Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9368-9373.
172. **Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* **38**:828-838.
173. **Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, et al.** 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**:497-502.
174. **Samatey, F. A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba.** 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**:331-337.
175. **Samatey, F. A., H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T. R. Shaikh, D. R. Thomas, J. Z. Chen, D. J. Derosier, A. Kitao, and K. Namba.** 2004. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**:1062-1068.
176. **Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis.** 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* **180**:1207-1214.
177. **Savvides, S. N., H. J. Yeo, M. R. Beck, F. Blaesing, R. Lurz, E. Lanka, R. Buhrdorf, W. Fischer, R. Haas, and G. Waksman.** 2003. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo J.* **22**:1969-1980.
178. **Schuch, R., and A. T. Maurelli.** 2001. MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**:6991-6998.
179. **Schulte, R., and U. Bonas.** 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* **174**:815-823.
180. **Schutt, C. E., J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. Goonesekere, and U. Lindberg.** 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* **365**:810-816.
181. **Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa, and A. Abe.** 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:11638-11643.
182. **Sorg, J. A., N. C. Miller, and O. Schneewind.** 2005. Substrate recognition of type III secretion machines -testing the RNA signal hypothesis. *Cell. Microbiol.* **7**:1217-1225.
183. **Sory, M. P., and G. R. Cornelis.** 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* **14**:583-594.
184. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11998-12002.
185. **Stebbins, C. E., and J. E. Galan.** 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**:77-81.
186. **Su, W. C., S. Y. Tung, M. K. Yang, and T. T. Kuo.** 1999. The *pilA* gene of *Xanthomonas*

- campestris* pv. citri is required for infection by the filamentous phage cf. Mol. Gen. Genet. **262**:22-26.
187. **Subtil, A., C. Parsot, and A. Dautry-Varsat.** 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. Mol. Microbiol. **39**:792-800.
 188. **Sukhan, A., T. Kubori, and J. E. Galan.** 2003. Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. J. Bacteriol. **185**:3480-3483.
 189. **Suzuki, H., K. Yonekura, and K. Namba.** 2004. Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. J. Mol. Biol. **337**:105-113.
 190. **Swords, K. M., D. Dahlbeck, B. Kearney, M. Roy, and B. J. Staskawicz.** 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *avrBs2*. J. Bacteriol. **178**:4661-4669.
 191. **Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken.** 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector *AvrBs3*: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. Plant J. **26**:523-534.
 192. **Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas.** 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* *AvrBs3* protein into the plant cell. Mol. Microbiol. **46**:13-23.
 193. **Taira, S., J. Tuimala, E. Roine, E. L. Nurmiaho-Lassila, H. Savilahti, and M. Romantschuk.** 1999. Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. Mol. Microbiol. **34**:737-744.
 194. **Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai, and C. Sasakawa.** 2000. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. Embo J. **19**:3876-3887.
 195. **Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Büttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, et al.** 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria revealed by the complete genome sequence. J. Bacteriol. **187**:7254-7266.
 196. **Thomas, J., G. P. Stafford, and C. Hughes.** 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:3945-3950.
 197. **Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka, and B. B. Finlay.** 2005. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **57**:1762-1779.
 198. **Tsuge, S., S. Terashima, A. Furutani, H. Ochiai, T. Oku, K. Tsuno, H. Kaku, and Y. Kubo.** 2005. Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. J. Bacteriol. **187**:2308-2314.
 199. **Turner, L., W. S. Ryu, and H. C. Berg.** 2000. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. J. Bacteriol. **182**:2793-2801.
 200. **Urwin, R., E. C. Holmes, A. J. Fox, J. P. Derrick, and M. C. Maiden.** 2002. Phylogenetic evidence for frequent positive selection and recombination in the meningococcal surface antigen PorB. Mol. Biol. Evol. **19**:1686-1694.
 201. **Van Arnam, J. S., J. L. McMurry, M. Kihara, and R. M. Macnab.** 2004. Analysis of an engineered *Salmonella* flagellar fusion protein, FliR-FliH. J. Bacteriol. **186**:2495-2498.
 202. **Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas.** 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein *AvrBs3* occurs inside the host plant cell. Cell **87**:1307-1316.
 203. **Van Gijsegem, F., J. Vasse, J. C. Camus, M. Marena, and C. Boucher.** 2000. *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. Mol. Microbiol. **36**:249-260.
 204. **Van Sluys, M. A., C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. Camargo, C. F. Menck, A. C. Da Silva, J. A. Ferro, M. C. Oliveira, J. C. Setubal, J. P. Kitajima, and A. J. Simpson.** 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. **40**:169-189.
 205. **Vauterin, L., and B. Hoste.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **45**:472-489.
 206. **Veenendaal, A. K., C. van der Does, and A. J. Driessen.** 2004. The protein-conducting channel SecYEG. Biochim. Biophys. Acta **1694**:81-95.
 207. **Weber, E.** 2001. Mutagenese-, Reinigungs- und elektronenmikroskopische Studien zur Rolle von HrpE1 für die Hrp-Pilus Bildung bei *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
 208. **Weber, E., and R. Koebnik.** 2005. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **187**:6175-6186.

209. **Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik.** 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**:2458-2468.
210. **Weber, E., and R. Koebnik.** 2006. Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* **188**:1405-1410.
211. **Wei, W., A. Plovanch-Jones, W. L. Deng, Q. L. Jin, A. Collmer, H. C. Huang, and S. Y. He.** 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:2247-2252.
212. **Wei, Z. M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. Y. He, A. Collmer, and S. V. Beer.** 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**:85-88.
213. **Wells, S. E., J. M. Hughes, A. H. Igel, and M. Ares, Jr.** 2000. Use of dimethyl sulfate to probe RNA structure *in vivo*. *Methods Enzymol.* **318**:479-493.
214. **Wengelnik, K.** 1993. Molekulargenetische Charakterisierung der Region von *hrpD* bis *hrpF* aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und Subklonierung der Promotoren. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin, Berlin.
215. **Wengelnik, K., and U. Bonas.** 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **178**:3462-3469.
216. **Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas.** 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* **178**:1061-1069.
217. **Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:704-712.
218. **Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas.** 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* **181**:6828-6831.
219. **Whalen, M. C., J. F. Wang, F. M. Carland, M. E. Heiskell, D. Dahlbeck, G. V. Minsavage, J. B. Jones, J. W. Scott, R. E. Stall, and B. J. Staskawicz.** 1993. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**:616-627.
220. **Wilson, R. K., R. K. Shaw, S. Daniell, S. Knutton, and G. Frankel.** 2001. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **3**:753-762.
221. **Yada, T., M. Nakao, Y. Totoki, and K. Nakai.** 1999. Modeling and predicting transcriptional units of *Escherichia coli* genes using hidden Markov models. *Bioinformatics* **15**:987-993.
222. **Yamashita, I., K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue, and K. Namba.** 1998. Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. *Nat. Struct. Biol.* **5**:125-132.
223. **Yip, C. K., B. B. Finlay, and N. C. Strynadka.** 2005. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:75-81.
224. **Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller, and N. C. Strynadka.** 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**:702-707.
225. **Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba.** 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**:643-650.
226. **Young, B. M., and G. M. Young.** 2002. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **184**:1324-1334.
227. **Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6456-6461.
228. **Young, M. J., Y. Takikawa, L. Gardan, and D. E. Stead.** 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**:67-105.
229. **Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo, and R. M. Macnab.** 2002. Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochemistry* **41**:9516-9524.

5 ANHANG

5.1 Anhang A: Verwendete Primer

Tabelle 4: In den Publikationen verwendete und nicht beschriebene Oligonukleotide.

Analyse der nicht-polaren Deletionen in Genen des <i>hrp</i> -Genclusters von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (209)													
Name	Sequenz												
Screen A1b-5'	GCC	TGA	TGA	TTG	CCC	AAA	CA						
Screen A1b-3'	TTG	AGA	CAT	TCC	CGG	CTT	TG						
Screen B8-5'	GCC	GAG	CAA	CAT	CAG	CAT							
Screen B8-3'	GAA	GAA	GAC	GCG	ATC	GAG							
Screen B7-5'	CAG	GGT	CAA	CAA	CGA	CAC							
Screen B7-3'	TGC	TCG	CCA	AGT	ACA	ACG							
Screen B5-5'	ACC	TTG	CCG	TAA	CGA	CGA							
Screen B5-3'	GGA	TTG	CGA	TGT	CAT	TCC							
Screen B4-5'	CAA	CCA	CAG	ACG	CAT	GAC							
Screen B4-3'	AGA	GCG	ATG	CGC	AGT	TCA							
Screen B3-5'	GCA	TCA	GCA	GGG	CAA	GTT							
Screen B3-3'	AAC	CCG	AGC	ATG	ATG	AGC							
hrpB2-5' Nde	CGA	GGC	CTC	ATA	TGA	CGC	TCA	TTC	CTC	CTG	TCC		
hrpB2-5' pET15	CGA	TGG	ATC	CTT	ACT	ACT	GGT	TCT	TCA	CCA	GCG	TC	
Screen B1-5'	GGC	TGG	AGG	ATT	GCA	TCA							
Screen B1-3'	ATT	GTG	GGC	AGC	TGT	GGT							
Screen C3b-5'	TGG	ACG	TGC	GCA	GGT	ATG	TG						
Screen C3b-3'	GTT	GGG	CAT	TGC	AGA	ACT	CG						
Screen D1-5'	CAG	CTT	GGC	AGA	GTG	TTC							
Screen D1-3'	AAG	CCC	AGC	ATG	ATG	ACC							
Screen D2-5'	GGC	AGA	TCC	TGG	AGT	TGT							
Screen D2-3'	ATC	CTG	CAG	CGA	CAT	CAC							
Screen D3-5'	GTT	GTT	TGT	CGC	CAT	GGA							
Screen D3-3'	CGT	CGA	ATT	CAT	CCT	CCT							
Screen D4-5'	ATG	CAG	TTC	GGC	CAG	GCA	TT						
Screen D4-3'	CTG	AGC	CGC	CTG	TTG	TGG	TT						
Screen D5-5'	AAC	AGG	CGG	CTC	AGG	AGG	TT						
Screen D5-3'	CTC	TCA	TTG	CGC	CGC	TTG	CT						
Screen D6-5'	CTC	ACC	GTC	CGT	TAC	GA							
Screen D6-3'	GTG	CCA	CGT	TGA	AGT	CC							
hrpE1-5' Nde	GCG	ATT	TCC	ATA	TGC	AAA	TTT	TTC	CTG	AAG	TAA	GCT	CG
hrpE1-5' pET15	CGG	GGA	TCC	TTA	TTA	CTG	GCC	AAC	GAG	CTG	CTT	AGC	
hrpE2-5' Nde	CGA	GGC	CTC	ATA	TGC	ATG	TCT	CAC	CAC	AGA	TGA	GC	
hrpE2-3' pET15	CGG	GGA	TCC	TTA	TCA	GGC	GCG	TAA	CCA	CAG	ATA	GTT	GC
hrpE3-5' Nde	CGA	GGC	CTC	ATA	TGG	CAC	AGC	AAC	TTG	GCT	TGC		
hrpE3-3' pET15	CGG	GGA	TCC	TTA	TCA	GCT	GCC	GTC	GCG	GGT	GTG	GAC	A
Erstellung translationaler Fusionen von HrpE und AvrBs3Δ2 (208) (vgl. 2.5.1)													
MOTSS-5'	CAC	CTG	CAT	CGA	CGC	GAT	TG						
MOTSS-5' -PIP	CAC	CCG	ATC	CAC	AAA	CCG	ATA	TCC					
MOTSS-5' +PIP	CAC	CCA	CGT	GCA	TCG	ACG	CGA	TTG					
MOTSS10-3'	CCA	CGA	GCT	TAC	TTC	AG							
MOTSS17-3'	GCC	TTG	GCC	AAC	ACG	GGA	C						
MOTSS19-3'	ATC	CAT	GCC	TTG	GCC	AAC	AC						
MOTSS23-3'	ACC	GGT	GAA	GCA	ATC	CAT							
MOTSS42-3'	CAT	CTG	GCC	GTT	TGC	ACC							
MOTSS50-3'	TGA	CAT	GTC	GCC	GAG	TAG							
MOTSS93-3'	CTG	GCC	AAC	GAG	CTG	CTT							

5.2 Anhang B: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ÄM	äußere Membran
AS	Aminosäuren
<i>avr</i> , Avr	Avirulenz
bp	Basenpaare
CFU	„colony forming units“
DNA	"deoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
ECW	„Early californian wonder“ Cultivar von <i>Capsicum annuum</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EPS	extrazelluläres Polysaccharid
GUS	β -Glucuronidase
<i>hpa</i> , Hpa	„ <i>hrp</i> associated“
HR	hypersensitive Reaktion
<i>hrc</i> , Hrc	„ <i>hrp</i> conserved“
<i>hrp</i> , Hrp	„hypersensitive response and pathogenicity“
IM	innere Membran
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IS	„insertion sequence“
K_a	nicht-synonyme Austausche je nicht-synonymer Position
K_s	synonyme Austausche je synonymer Position
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
NMR	„nuclear magnetic resonance“
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
<i>pI</i>	isoelektrischer Punkt
PIP	„plant inducible promoter“
PM	Plasmamembran
pv.	Pathovar
R	Resistenz
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RT-PCR	"reverse transcribed PCR", Reverse Transkription und PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spp	„species“
TTS	„type III secretion“
Xop	„ <i>Xanthomonas</i> outer protein“
Tab.	Tabelle
TMH	Transmembranhelix
U	„unit“
ZW	Zellwand

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ralf Koebnik für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung dieser Arbeit, die zahlreichen aufschlussreichen Diskussionen zu theoretischen und praktischen Problemen und das rege Interesse am Fortschreiten der Arbeit.

Prof. Dr. Ulla Bonas danke ich für ihr reges Interesse an meiner Arbeit, ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Für die Möglichkeit der Nutzung des Elektronenmikroskops und des damit verbundenen Vertrauens bedanke ich mich bei Gerd Hause. Shin-Ichi Aizawa und seiner Gruppe danke ich für die Möglichkeit neue Techniken zu erlernen, die herzliche Gastfreundschaft und die Erkenntnis, dass Karaoke mit etwas Sake sehr viel weniger peinlich ist.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern der Abteilung Pflanzengenetik für das angenehme Arbeitsklima und die erhaltene Unterstützung. Besonders danke ich hier natürlich Carolin, meiner Verbündeten gegen die Unbilden des Forscheralltags, für das Ertragen meiner guten und manchmal auch schlechten Launen. Robert danke ich neben seinen lebenserhaltenden Fertiggerichten auch für seine pragmatischen und effizienten Lösungen bei technischen Problemen aller Art. Daniela danke ich für die Diskussionen und Gespräche über Gott und die Welt und Doreen dafür, dass sie einfach grün ist. Für die freundliche Aufnahme in die Kaffeerrunde möchte ich mich bei der „R-Gene-Gang“ bedanken. Hannelore danke ich für die praktische Hilfe im Labor. Oliver, Frank, Jens und Sabine danke ich zusätzlich für die schönen „Daddelabende“ bis in die frühen Morgenstunden und den damit verbundenen Chips und Cola Orgien.

Außerdem sei an dieser Stelle noch den fleißigen Korrekturlesern Daniela, Diana, Susanne, Sabine und Doreen gedankt.

Tilo möchte ich für die gemeinsame Zeit und all die schönen Erlebnisse während des WG-Lebens danken. Allen meinen Freunden danke ich für die schöne und ereignisreiche Zeit in Halle.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und auf deren Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Und nicht zuletzt danke ich Diana, die mir vor allem in der Endphase der Arbeit eine große moralische Stütze war und auf deren Urteilsvermögen ich mich jederzeit verlassen kann.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Halle, März 2006

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Ernst Weber
Geburtsort	Siegburg
Geburtsdatum	03.09.1975
Wohnanschrift	10 Scarsdale Close, Cambridge CB4 1SL, UK
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

1987 - 1995	Besuch des Martin-Butzer-Gymnasium der Evangelischen Kirche im Rheinland Dierdorf
1995 - 1996	Wehrdienst in Nagold (Schwarzwald)
10/1996 – 07/2001	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Diplomarbeit am Institut für Genetik in der Gruppe von PD Dr. Ralf Koebnik Thema: Die Rolle von HrpE1 für die Hrp-Pilus-Bildung bei <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria. Abschluss: Diplom Biochemiker (Note: 1,1)
seit 09/2001	Promotion am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe von PD Dr. Ralf Koebnik Thema: Molekulare Charakterisierung von HrpE, der Hrp-Pilus Untereinheit von <i>Xanthomonas campestris</i>
ab 03/2006	Position am Institut für Zellbiologie des MRC-LMB in Cambridge in der Gruppe von Prof. Dr. Hugh Pelham
03/2003 – 06/2005	Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt
10-12/2003	DAAD Japan Kurzzeit Stipendium
ab 06/2006	EMBO Long Term Fellowship

Halle, März 2006